



Étude des stratégies de mouvement chez les parasitoïdes du genre *Trichogramma* : apports des techniques d'analyse d'images automatiques

Victor Burte

► To cite this version:

Victor Burte. Étude des stratégies de mouvement chez les parasitoïdes du genre *Trichogramma* : apports des techniques d'analyse d'images automatiques. Microbiologie et Parasitologie. COMUE Université Côte d'Azur (2015 - 2019), 2018. Français. ⟨NNT : 2018AZUR4223⟩. ⟨tel-02145220v2⟩

HAL Id: tel-02145220

<https://theses.hal.science/tel-02145220v2>

Submitted on 24 Sep 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



HAL Authorization



THÈSE DE DOCTORAT

Étude des stratégies de mouvement chez les parasitoïdes du genre *Trichogramma* apports des techniques d'analyse d'images automatiques

Victor BURTE

Institut Sophia Agrobiotech

**Présentée en vue de l'obtention
du grade de docteur en** Biologie des
Populations et des Interactions
de l'Université Côte d'Azur
Dirigée par : Ludovic Mailleret
Co-encadrée par : Vincent Calcagno
Soutenue le : 14/12/2018

Devant le jury, composé de :

Vincent Calcagno, Chargé de Recherche, Institut
Sophia Agrobiotech, Co-directeur

Marylène Poirié, Professeur, Université Côte d'Azur,
Présidente

Marlène Goubault, Maître de Conférence, Université
de Tours, Rapporteur

Jacques Brodeur, Professeur, Université de
Montréal, Rapporteur

Résumé

Les parasitoïdes du genre *Trichogramma* sont des micro-hyménoptères oophages très utilisés comme auxiliaires de lutte biologique. Ma thèse a pour objet la caractérisation phénotypique des stratégies de mouvement de cet auxiliaire, spécifiquement les mouvements impliqués dans l'exploration de l'espace et la recherche des œufs hôtes. Ces derniers sont des phénotypes de grande importance dans le cycle de vie des trichogrammes, et aussi des caractères d'intérêt pour évaluer leur efficacité en lutte biologique. Les trichogrammes étant des organismes de très petite taille (moins de 0,5 mm), difficilement observables, l'étude de leur mouvement peut tirer profit des avancées technologiques dans l'acquisition et l'analyse automatique des images. C'est cette stratégie que j'ai suivie en combinant un volet de développement méthodologique et un volet expérimental. Dans une première partie méthodologique, je présente trois grands types de méthodes d'analyse d'images que j'ai mis en œuvre au cours de ma thèse. Dans un second temps, je présente trois applications de ces méthodes à l'étude du mouvement chez le trichogramme.

Premièrement, nous avons caractérisé au laboratoire les préférences d'orientation (phototaxie, géotaxie et leur interaction) lors de la ponte chez 18 souches de trichogramme, appartenant à 6 espèces. Ce type d'étude requérant le dénombrement d'un très grand nombre d'œufs (sains et parasités), il a été développé un nouvel outil dédié, sous forme d'un plugin ImageJ/FIJI mis à disposition de la communauté. Ce plugin flexible automatise et rend plus productible les tâches de dénombrement et d'évaluation de taux de parasitisme, rendant possible des criblages de plus grande ampleur. Une grande variabilité a pu être mise en évidence au sein du genre, y compris entre souches d'une même espèce. Cela suggère qu'en fonction de la strate végétale à protéger (herbacée, arbustive, arborée), il serait possible de sélectionner des souches afin d'optimiser leur exploitation de la zone ciblée.

Dans un second temps, nous avons caractérisé les stratégies d'exploration (vitesses, trajectoires, ...) de 22 souches de trichogramme appartenant à 7 espèces pour rechercher des traits propres à chaque souche ou espèce. Pour cela, j'ai mis en œuvre une méthode de tracking de groupes de trichogrammes sur enregistrement vidéo sur de courtes échelles de temps à l'aide du logiciel Ctrax et de scripts R. L'objectif était de développer un protocole de caractérisation haut-débit du mouvement de souches de trichogrammes et d'étudier la variabilité de ces traits au sein du genre.

Enfin, nous avons conduit une étude de la dynamique de propagation dans l'espace de groupes de trichogrammes chez l'espèce *T. cacoeciae*, en mettant au point un dispositif expérimental innovant permettant de couvrir des échelles de temps et d'espace supérieures à celles habituellement imposées par les contraintes de laboratoire. Grâce à l'utilisation de prises de vue très haute résolution / basse fréquence et d'un pipeline d'analyse dédié, la diffusion des individus peut être suivie dans un tunnel de plus six mètres de long pendant toute une journée. J'ai notamment pu identifier un effet de la densité en individus ainsi que de la distribution des ressources sur la dynamique de propagation (coefficient de diffusion) des trichogrammes testés.

Mots-clés : Analyses d'images, Écologie, Mouvement, Phénotypage, Stratégies de déplacement, Tracking, *Trichogramma*

Abstract

Parasitoids of the genus *Trichogramma* are oophagous micro-hymenoptera widely used as biological control agents. My PhD is about the phenotypic characterization of this auxiliary's movement strategies, specifically the movements involved in the exploration of space and the search for host eggs. These phenotypes have great importance in the life cycle of trichogramma, and also of characters of interest to evaluate their effectiveness in biological control program. *Trichogramma* being very small organisms (less than 0.5 mm), difficult to observe, the study of their movement can take advantage of technological advances in the acquisition and automatic analysis of images. This is the strategy I followed by combining a methodological development component and an experimental component. In a first methodological part, I present three main types of image analysis methods that I used and helped to develop during my thesis. In a second time, I present three applications of these methods to the study of the movement of *Trichogramma*.

First, we characterized in the laboratory the orientation preferences (phototaxis, geotaxis and their interaction) during egg laying in 22 trichogram strains belonging to 6 species. This type of study requires the counting of a large number of eggs (healthy and parasitized), it was developed a new dedicated tool in the form of an ImageJ / FIJI plugin made available to the community. This flexible plugin automates and makes more productive the tasks of counting and evaluation of parasitism rate, making possible screenings of greater magnitude. A great variability could be highlighted within the genus, including between strains of the same species. This suggests that depending on the plant layer to be protected (grass, shrub, tree), it would be possible to select trichogramma's strains to optimize their exploitation of the targeted area.

In a second time, we characterized the exploration strategies (velocities, trajectories, ...) of a set of 22 strains from 7 trichogramma species to look for traits specific to each strain or species. I implemented a method for tracking a trichogramma group on video recorded on short time scales using the Ctrax software and R scripts. The aim was to develop a protocol for high-throughput characterization of trichogramma strains movement and to study the variability of these traits within the genus.

Finally, we conducted a study of the propagation dynamics in trichogramma group from the species *T. cacoeciae*, by developing an innovative experimental device to cover scales of time and space greater than those usually imposed by laboratory constraints. Through the use of pictures taken at very high resolution / low frequency and a dedicated analysis pipeline, the diffusion of individuals can be followed in a tunnel longer than 6 meters during a whole day. In particular, I was able to identify the effect of the population density as well as the distribution of resources on the propagation dynamics (diffusion coefficient) and the parasitism efficiency of the tested strain.

Key words : Displacement strategies, Ecology, Image analysis, Movement, Phenotyping, Tracking, *Trichogramma*

SOMMAIRE

Résumé	p. 3
Abstract	p. 4
Remerciements	p. 9
 I. Introduction Générale	 p. 10
<u>I.1 Mise en contexte de la Thèse</u>	<u>p. 10</u>
I.1.1. La lutte biologique	p. 10
I.1.2. Modèle biologique étudié:le Trichogramme	p. 14
I.1.3. Le projet TriPTIC	p. 17
I.1.4. Le Mouvement chez le Trichogramme	p. 20
<u>I.2. Le Mouvement : un trait complexe à l'interface entre échelles individuelle</u> <u>et populationnelle</u>	 p. 21
I.2.1. Une thématique pluridisciplinaire	p. 21
I.1.2. Les spécificités du mouvement : exploration et orientation	p. 23
I.2.3. Le mouvement comme composante de la fitness	p. 28
I.2.4. Mesurer le mouvement : l'enjeu des mesures phénotypiques à haut-débit	p. 32
<u>I.3. Plan de Thèse</u>	<u>p. 34</u>
 II. Les méthodes d'analyse d'images et leur apport à l'étude du mouvement	 p. 36
<u>II.1. Historique non exhaustif des méthodes d'acquisition de</u> <u>données pour les études de mouvement et de comportement</u>	 p. 37
II.1.1. Les études sans outils informatiques	p. 37
II.1.2. Les premières utilisations vidéo dans l'écologie comportementale	p. 38
II.1.3. Le développement des outils informatiques et des méthodes d'analyses d'image	p. 39
<u>II.2. Dénombrement automatique d'œufs parasités (observation</u> <u>indirecte du mouvement)</u>	 p. 43
II.2.1. Principe de la méthode	p. 44

II.2.2. Acquisition des images	p. 44
II.2.3. Analyse des images	p. 45
II.2.4. Fiabilité de la méthode	p. 51
II.2.5. Limites et améliorations de la méthode	p. 52
<u>II.3. Deuxième approche : Suivi haute résolution / basse fréquence des individus</u>	
<u>adultes (grande échelle spatiale et temporelle)</u>	p. 54
II.3.1. Principe de la méthode	p. 54
II.3.2. Acquisition des images	p. 55
II.3.3. Analyse des images	p. 56
II.3.4. Fiabilité de la méthode	p. 62
II.3.5. Limites et améliorations de la méthode	p. 63
<u>II.4. Troisième approche : Tracking haute fréquence / basse</u>	
<u>résolution d'un groupe d'individus</u>	p. 64
II.4.1. Principe de la méthode	p. 64
II.4.2. Acquisition des vidéos	p. 65
II.4.3. Utilisation du logiciel Ctrax	p. 65
II.4.4. Fiabilité de la méthode	p. 68
II.4.5. Limites et améliorations de la méthode	p. 69
<u>II.5. Comparaison des trois méthodes</u>	p. 70
 III. Étude des réponses géotactiques et phototactiques du genre <i>Trichogramma</i>	p. 72
<u>III.1. Objectifs de l'étude</u>	p. 72
<u>III.2. Matériels et Méthodes</u>	p. 73
III.2.1. Matériel biologique	p. 73
III.2.2. Dispositif expérimental	p. 74
III.2.3. Traitements	p. 76
III.2.4. Acquisition de données	p. 77
III.2.5. Analyses de résultats	p. 78
<u>III.3. Résultats</u>	p. 80
III.3.1. Effet de la lumière	p. 80
III.3.2. Effet de la gravité	p. 81
III.3.3. Interaction des deux facteurs	p. 82
<u>III.4. Discussion</u>	p. 84
III.4.1. Liens entre phototaxie, géotaxie et espèces	p. 84

III.4.2. Taxies et Strates	p. 85
<u>III.5. Conclusion</u>	p. 86

IV. Évaluation de la variabilité des mouvements d'exploration au sein

du genre <i>Trichogramma</i>	p. 87
<u>IV.1. Objectifs de l'étude</u>	p. 87
<u>IV.2. Matériels et Méthodes</u>	p. 88
IV.2.1. Matériel biologique	p. 88
IV.2.2. Dispositif expérimental	p. 89
IV.2.3. Protocole expérimental	p. 90
IV.2.4. Descripteurs du mouvement et analyses statistiques	p. 91
<u>IV.3. Résultats</u>	p. 93
IV.3.1. Contrôle qualité	p. 93
IV.3.2. Analyse qualitative des trajectoires	p. 95
IV.3.3. Taux d'activité	p. 96
IV.3.4. Vitesses de déplacement	p. 97
IV.3.5. Sinuosité	p. 98
IV.3.6. Corrélations entre les différents facteurs	p. 99
IV.3.7. Effet du sex-ratio	p. 101
<u>IV.4. Discussion</u>	p. 102
IV.4.1. Trajectoires, taux d'activité et vitesse	p. 102
IV.4.2. Sex-ratio	p. 103
<u>IV.5. Conclusion</u>	p. 104

V. Effets de la densité initiale des individus et du niveau d'agrégation des ressources sur la dynamique de propagation et le parasitisme

de <i>Trichogramma cacoeciae</i>	p. 106
<u>Abstract</u>	p. 107
<u>Introduction</u>	p. 107
<u>Material and methods</u>	p. 109
<u>Results</u>	p. 111
<u>Discussion</u>	p. 118
<u>References</u>	p. 121

<u>Figure legends</u>	p. 123
VI. Discussion sur l'étude du mouvement au sein du genre <i>Trichogramma</i>	p.125
<u>VI.1. Le mouvement du trichogramme à différentes échelles spatio-temporelles</u>	p. 125
VI.1.1. L'influence environnementale	p. 125
VI.1.2. L'influence génétique	p. 128
<u>VI.2. L'exploration non orientée du trichogramme</u>	p. 129
<u>VI.3. Le mouvement du trichogramme et la lutte biologique</u>	p. 132
VII. Annexes	p. 134
<u>VII.1. Calcul des degrés jour (°D)</u>	p. 134
<u>VII.2. Effet de la paraffine liquide sur le comportement du trichogramme</u>	p. 135
Références Bibliographiques	p. 138

Je tiens à remercier Messieurs Vincent CALCAGNO et Ludovic MAILLERET qui m'ont encadré tout au long de cette thèse et m'ont fait partager leurs brillantes intuitions dans la construction de mes expériences et de mes analyses. Qu'ils soient remerciés pour leur disponibilité et la qualité du suivi qu'ils ont su m'assurer. Il m'est impossible d'oublier Monsieur Guy PEREZ, Technicien de l'équipe M2P2, sans qui la concrétisation expérimentale de ma thèse n'aurait pu aboutir. Je tiens également à remercier Robin Laugier, Aymen Fareh, Laura Pinto et Faten Ayed pour leur aide lors de la réalisation expérimentale de mes études durant leur stage.

Je remercie l'ensemble des collaborateurs du projet TriPTIC financé par l'Agence Nationale de la Recherche et avec qui j'ai pu échanger matériel biologique et connaissances. C'est grâce à la bonne entente entre ces partenaires (équipe RDLB, équipe BPI et équipe M2P2) que peut naître une synergie pour l'avancement et l'accomplissement d'un projet.

J'adresse tous mes remerciements à Madame Marlène GOUBAULT, Maître de Conférence à l'Université de Tours, ainsi qu'à Monsieur Jacques BRODEUR, Professeur à l'Université de Montréal, de l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant d'être rapporteurs de cette thèse. Je remercie également Madame Marylène POIRIE, Professeur à l'Université Côte d'Azur, qui a eu la générosité d'accepter de présider le jury de cette thèse.

Je voudrais remercier l'ensemble de la Direction orchestrée par Monsieur Pierre ABAD et Monsieur Philippe CASTAGNONE, de l'Institut Sophia Agrobiotech pour leur accueil et l'accompagnement qu'ils ont su m'offrir dans les démarches administratives.

Il me sera difficile de remercier tout le monde car c'est grâce à l'aide de nombreuses personnes, dans mon environnement professionnel et personnel, que j'ai pu mener cette thèse à son terme. Je souhaiterai tout de même remercier Lydia, Cécile, Hisham, Ricardo, Louise, Flora, Samuel de l'équipe M2P2, Alexandre, Nicolas R., Nicolas B., Marcel et Anael de l'équipe RDLB, Marjorie, Silène, Margarita et Thibault de l'équipe BPI pour les moments de partages et d'entre-aide dans la bonne humeur. Pour finir je remercie Emmie qui m'a soutenu et également supporté dans tout ce que j'ai entrepris.

I. Introduction générale :

I.1. Mise en contexte de la Thèse

1.1 La lutte biologique :

L'agriculture est une activité ancestrale (Néolithique, les premières traces d'agriculture datent de 8000 ans avant J.-C. : Bellwood 2007) que l'Homme sédentaire pratique pour subvenir à ses besoins alimentaires. La sélection des variétés végétales et les techniques agricoles n'ont cessé de changer depuis cette ère ancestrale. La nécessité d'augmenter les rendements pour des besoins économiques et sociaux ont poussé les agriculteurs à utiliser des intrants chimiques (pesticides, engrais, ...) en grande quantité depuis la révolution verte du XX^{ème} siècle. L'intensification de l'agriculture (augmentation des surfaces cultivées, mécanisation des techniques et mise en place de monocultures) ont permis à certaines espèces de proliférer au détriment d'autres. Les espèces phytophages, involontairement introduites ou déjà présentes, peuvent pulluler ou devenir invasives et impacter fortement la production agricole en diminuant la qualité et la quantité de production.

Pour lutter contre ces ravageurs, l'utilisation de pesticides est très efficace et relativement peu coûteuse mais présente de nombreux risques et effets non désirés. Outre ceux pour la santé humaine et animale (Schiffers & Wainright 2011), cette méthode peut engendrer la sélection d'individus résistants aux produits et perdre ainsi de son efficacité. En effet, les espèces qui sont soumises aux traitements vont subir une sélection sur leur résistance à ces traitements. De génération en génération, les individus les plus résistants vont se reproduire, transmettant leurs gènes de résistance à leurs descendants (Palumbi 2001). Par exemple, un programme d'éradication de la malaria dans les années 1960 n'a pas connu de succès du fait de la résistance au DDT (utilisé comme insecticide depuis 1939) développée par une partie des populations de moustiques (Desowitz 1993). Le traitement chimique sera alors de moins en moins efficace au fur et à mesure des générations du ravageur jusqu'à n'avoir plus d'effet significatif. Par ailleurs, l'augmentation des surfaces cultivées, accompagnée d'une pratique de monoculture et à l'usage de xénobiotiques pour lutter contre les ravageurs de culture, diminuent fortement la richesse spécifique d'un milieu (McLaughlin & Mineau 1995; Tilman 1999). Or, lorsqu'un milieu a une richesse spécifique faible, il est souvent moins robuste vis à vis de perturbations et son fonctionnement peut être compromis. Par exemple, les écosystèmes possédant une plus grande diversité spécifique tendent à mieux assurer une plus large gamme de services écosystémiques (Huston 1979; Isbell et al. 2011; Bommarco et al. 2013). Pour illustrer ce propos, actuellement, les pratiques culturales (utilisation d'intrants chimiques, augmentation des surfaces cultivées) sur les populations d'insectes pollinisateurs (principalement les abeilles) sont directement incriminées pour

la diminution du service écosystémique de pollinisation, pourtant indispensable pour l'agriculture (Foley et al. 2005; Goulson et al. 2015).

La France a récemment adopté le plan ECOPHYTO 2018 incitant à la baisse d'utilisation d'intrants chimiques dans les cultures et favorisant une agriculture raisonnée et biologique. La France est au premier rang européen en terme de production (18,3 %) et de surface cultivée (28,98 millions d'hectares) devant l'Espagne (23,65 millions d'hectares), l'Allemagne (16,7 millions d'hectares) et l'Italie (ECOPHYTO II, 2015). La quantité d'intrants chimiques utilisés est alors suffisamment importante pour impacter l'environnement de manière significative (2,3 kg / ha) pour un achat de plus de 66000 tonnes par an. La France se situe ainsi au deuxième rang en terme de volume et au neuvième rang européen en terme d'utilisation ramenée à la surface d'intrants chimiques. L'utilisation de ces substances actives est ainsi une problématique centrale dans le système agricole du territoire avec un enjeu économique (pour les agriculteurs et les fabricants de ces produits) et environnemental (santé publique, impacts sur la biodiversité).

En conséquence, les alternatives à l'agriculture conventionnelle se multiplient et se développent (on peut citer la permaculture, l'agriculture biologique, ou encore diverses formes d'agriculture « raisonnée »), et les acteurs publics et privés de la recherche se saisissent de la question et étudient les moyens de réduire la dépendance aux pesticides chimiques (citons en France les thématiques de l'agroécologie et du biocontrôle portées par l'INRA). Par exemple, des bactéries sont élevées pour lutter contre les ravageurs dans un cadre de biocontrôle (utilisation de matière biologiquement synthétisée mais non vivante). Les *Bacillus thuringiensis* (Bt) synthétisent une substance active agissant comme un insecticide (la protéine Cry) affectant plus particulièrement les larves de Lépidoptères (Höfte & Whiteley 1989; Bravo et al. 2007; Schnepf et al. 1998). Néanmoins, comme pour les pesticides, le développement d'une résistance aux protéines Cry a été observée (Tabashnik et al. 1990; Tabashnik 1994).

L'une des principales autres alternatives à l'utilisation des pesticides est la lutte biologique. Il s'agit d'utiliser des organismes vivants (tels que : bactéries, champignons, insectes) capables de prédateur ou de parasiter les ravageurs que l'on souhaite contrôler. Ces organismes sont appelés auxiliaires de culture ou agents de lutte biologique. On distingue traditionnellement trois grandes catégories de lutte biologique (Eilenberg et al. 2001) :

→ **La lutte biologique classique** cible les ravageurs exotiques (dont l'aire d'origine diffère géographiquement de l'aire nécessitant son contrôle). Le principe est d'importer un ennemi naturel du ravageur depuis l'aire d'origine de celui-ci pour qu'une fois introduit, une population s'installe et contrôle la population de ravageur. Des tests de spécificité et une évaluation des risques sur la dynamique de l'écosystème d'introduction sont nécessaires avant de relâcher l'agent de lutte

biologique (van Lenteren et al. 2003). Historiquement, à la fin du XIX^{ème} siècle, l'entomologiste Charles Valentine Riley introduit avec succès des coccinelles provenant d'Océanie (Australie et Nouvelle Zélande) pour limiter les populations de cochenilles dans les cultures d'orangers de Californie (Riley 1893). Il s'agirait du premier succès de lutte biologique classique utilisant des insectes.

→ **La lutte biologique par augmentation** consiste à augmenter la densité en auxiliaires naturels (indigènes ou non) pour lutter contre un ravageur. Il existe deux approches principales mais une infinité de variations entre elles. La première dite « par inoculation », consiste à introduire à une certaine fréquence pendant la saison des populations de taille raisonnable (inoculum) d'auxiliaires pour permettre son installation et son développement sur la durée totale de la saison de culture. Par exemple, l'utilisation du champignon entomophage *Beauveria brongniartii* (Petch) a montré des résultats de contrôle à long terme très satisfaisants contre le hanneton *Melolontha melolontha* grâce à son inoculation répétée en Suisse (Keller et al. 1997). La deuxième, dite « inondative », consiste à relâcher en très grande quantité des auxiliaires élevés au laboratoire, pour obtenir un effet de contrôle unique et immédiat, sans velléités particulières que les individus relâchés fondent une population et contrôlent durablement la population de ravageurs. Cette dernière approche se rapproche fortement de la démarche employant les pesticides chimiques, mais en substituant ces derniers par des organismes vivants (« bio-pesticides »). Nous pouvons citer comme exemple l'utilisation massive ponctuelle de *Trichogramma brassicae* pour lutter contre la pyrale du maïs, *Ostrinia nubilalis* (Cônsoли et al. 2010).

→ **La lutte biologique par conservation** n'implique pas d'introduction d'agents exotiques ou indigènes. Cette méthode nécessite d'aménager l'environnement (polyculture, bandes fleuries, pas de désherbage, associations végétales, etc...) pour favoriser l'établissement d'ennemis naturels du ravageur ou bien favoriser leur démographie et ainsi augmenter le niveau de contrôle exercé sur les ravageurs (Karp et al. 2018). Par exemple, l'aménagement de cultures en re-introduisant des communautés d'espèces végétales sauvages natives favorise l'installation d'ennemis naturels des ravageurs et augmente la taille des populations déjà présentes (Fiedler et al. 2008).

En lutte biologique classique ou par augmentation, il est possible d'utiliser différents types d'organismes pour lutter contre les insectes ravageurs (Hajek et al. 2007). Les agents de lutte biologique les plus utilisés peuvent être des insectes, des nématodes et des champignons entomopathogènes. Un des exemples les plus connus en lutte biologique demeure l'utilisation des larves prédatrices de coccinelle pour lutter contre le puceron (Obrycki 1998). Les nématodes sont des vers dont certaines espèces sont largement connues pour faire partie des ravageurs de culture (comme le nématode à galle *Meloidogyne incognita*) mais

d'autres sont utilisées comme agent de lutte biologique appartenant principalement aux familles Steinernematidae et Heterorhabditidae (Kaya 1993). Les champignons entomopathogènes (comme ceux du genre *Beauveria*) sont souvent utilisés en lutte biologique par inoculation pour lutter contre des coléoptères ravageurs comme le montre l'étude de l'activité de *Beauveria bassiana* dans les stocks des récoltes de grains (Rice & Cogburn 1999)

Outre les prédateurs et les agents pathogènes (bactéries, virus, nématodes et champignons), les parasitoïdes demeurent une catégorie d'organismes très utilisée en lutte biologique. Ces organismes parasites sont pondus sur ou dans un hôte et se développent intégralement au détriment de celui-ci, jusqu'à provoquer sa mort (Godfray 1994). La mise en place d'une interaction physiologique étroite s'effectue entre le parasitoïde et son hôte : l'un détourne les défenses immunitaires et s'alimente pour son propre développement, l'autre tente de se défendre en limitant l'action du parasitoïde (par encapsulation, par co-évolution du venin du parasitoïde et des défenses immunitaires de l'hôte). Une femelle parasitoïde peut parasiter plusieurs hôtes au cours de sa vie et augmenter ainsi les effectifs de parasitoïdes de la future génération. Il existe deux types de parasitoïdes : les ectoparasitoïdes (se développant en surface de leur hôte) et les endoparasitoïdes (se développant au sein de leur hôte). La majorité des insectes parasitoïdes auxiliaires appartiennent à l'ordre des Hyménoptères (Greathead 1986; Barbosa 1998) mais il en existe chez les Diptères, comme *Pales pavidus* de la famille des Tachinidae (Cerretti & Tschorsnig 2010), chez les Coléoptères, comme *Aleochara bilineata* de la famille des Staphylinidae (Read 1962) et quelques uns chez les Neuroptères, Lépidoptères et Trichoptères. De nombreux exemples de campagnes d'utilisation d'auxiliaires parasitoïdes se sont avérées payantes pour les agriculteurs et ont permis de réguler fortement les populations de ravageurs (Laing & Hamai 1976). Par exemple, l'utilisation du parasitoïde *Torymus sinensis* (Hym.) pour lutter contre la guêpe à galles de la châtaigne, *Dryocosmus kuriphilus* (Hym.) s'est avérée très efficace avec un établissement durable de l'auxiliaire sur les différents sites de lâchers (Borowiec et al. 2014). Les avantages d'utiliser un parasitoïde plutôt qu'un prédateur viennent du fait que le succès parasitaire conduit directement à la reproduction du parasitoïde. Les parasitoïdes présentent souvent l'avantage supplémentaire d'être de très petite taille et spécifiques d'une ou quelques espèces d'hôtes, là où les prédateurs sont plus facilement opportunistes, pouvant causer des effets non intentionnels importants, voire devenir des espèces invasives. Pour illustrer ce phénomène, Brown et ses collaborateurs publient en 2008 (Brown et al. 2008) une étude sur le caractère invasif d'un agent de lutte biologique prédateur : la coccinelle asiatique *Harmonia axyridis* (Pallas). Depuis sa première introduction comme agent de lutte biologique en 1916 en Amérique du Nord pour contrôler les populations de pucerons, la coccinelle *H. axyridis*, provenant d'Asie, a été ré-introduite à plusieurs reprises et s'est largement installée sur le continent américain (Chapin & Brou 1991). Cette espèce a également été introduite en Europe dans la deuxième moitié du XX^{ème} siècle et s'est également établie durablement. Le caractère invasif de cette espèce a été démontré par son expansion rapide sur les deux continents (van Lenteren et al. 2003).

1.2 Modèle biologique étudié, le trichogramme

1.2.1. Les trichogrammes en lutte biologique

Les organismes parmi les plus utilisés en lutte biologique sont les insectes parasitoïdes du genre *Trichogramma* (Hymenoptera, Apocrita, Chalcidoidea, Trichogrammatidae) depuis le début du XX^{ème} siècle (Marchal 1936). Il s'agit de micro-hyménoptères de moins de 1 millimètre de long (figure 1A) endoparasitoïdes oophages (les femelles pondent leurs œufs dans les œufs des insectes hôtes) largement utilisés selon la méthode de lutte biologique par inondation. Parmi les hyménoptères parasitoïdes oophages, la sous-famille des *Trichogrammatidae* est la plus utilisée en lutte biologique et la plus étudiée depuis le début du XX^{ème} siècle (Salt 1938; Côté et al. 2010).

À ce jour, environ 200 espèces ont été identifiées et sont capables de parasiter plus de 400 espèces d'hôtes différentes (Hawthitzky 1992; Newton 1993; Pintureau 2008; Côté et al. 2010). En France, le trichogramme est déjà utilisé sur plus de 100 000 hectares de maïs (Naïbo & Druesne 2008). L'espèce principalement utilisée est *Trichogramma brassicae* pour lutter contre la pyrale du maïs *Ostrinia nubilalis*. La gamme d'hôtes du genre *Trichogramma* est très large puisqu'elle comprend les lépidoptères principalement, les diptères, les hémiptères et les coléoptères. De nombreuses études visent à caractériser ce genre pour améliorer son utilisation en lutte biologique (Smith 1996; Sithanatham et al. 2001). Il existe deux modes de reproduction au sein du genre *Trichogramma*, selon l'espèce ou la souche considérée. Le premier mode de reproduction se fait par parthénogenèse arrhénotoque (pour les espèces haplo-diploïdes) : les mâles sont issus d'œufs non fécondés et sont donc haploïdes. Ainsi, les femelles non accouplées produisent uniquement des mâles haploïdes, et les femelles accouplées influencent fortement le sex-ratio de leur descendance en contrôlant la fécondation des ovocytes (Suzuki et al. 1984), produisant généralement une majorité de femelles diploïdes. La parthénogenèse thélytoque est le deuxième mode : les femelles non accouplées produisent des femelles diploïdes ayant le même génome que la mère (clones). Enfin certaines populations arrhénotoques sont infestées durablement par la bactérie du genre *Wolbachia*, et ne contiennent ainsi que des femelles (Cook & Butcher 1999).

En lutte biologique, seules les femelles parasitent les hôtes, ce qui en fait le sexe le plus étudié chez le trichogramme. La différence morphologique observable la plus simple entre les mâles et les femelles vient de leurs antennes. En effet les femelles ont des antennes sous forme de « massues » alors que les mâles ont les antennes plus filiformes avec des poils plus longs et nombreux que les femelles (figure 1B).

1.2.2. Les traits d'histoire de vie

La caractérisation des traits d'histoire de vie est cruciale pour comprendre le développement d'une espèce et son cycle de vie. Celui-ci est assez rapide (de 9 à 18 jours à 25°C, selon les espèces) pour le genre *Trichogramma* (figure 1C). Les trichogrammes étant des organismes poïkilothermes, la température a un

effet majeur sur leur physiologie. Il s'agit d'un élément important dans le choix du trichogramme comme agent de lutte biologique (Zaslavski & Umarova 1990). En effet, la réponse physiologique du trichogramme aux saisons froides (automne, hiver) porte sur la mise en diapause de l'organisme, c'est à dire un arrêt de développement au stade larvaire jusqu'à une remontée des températures. Ce phénomène est notamment intéressant pour planifier les lâchers inondatifs en début de saison de culture. La durée de leur cycle de vie est contrôlée par la température, l'humidité : plus il fait chaud et humide plus le développement est rapide (jusqu'à une certaine limite) avec des effets plus ou moins importants selon l'espèce considérée (Calvin et al. 1984; Carrière & Boivin 1997; Pizzol et al. 2010). Au stade adulte, la température joue également un rôle sur leur activité métabolique et leur comportement. Ce phénomène peut s'observer via l'étude de l'effet de la température sur la vitesse de déplacement. Plus la température est élevée, plus les individus se déplacent rapidement (Fournier & Boivin 2000; Suverkropp et al. 2001) jusqu'à une certaine limite où l'on observe une diminution de la vitesse de marche avant d'atteindre une température létale pour l'organisme.

Les conditions climatiques ne sont pas les seuls à avoir des effets sur les traits d'histoire de vie du genre *Trichogramma*. L'état physiologique (l'âge en particulier, mais aussi le niveau de nutrition) des individus ou la caractérisation du parasitisme jouent également un rôle dans le parasitisme (fécondité, survie des descendants). Plus l'âge des parasitoïdes augmente plus le taux de fertilité et les probabilités de parasitisme diminuent (Godin & Boivin 2000; Pizzol et al. 2012). L'évolution de l'âge des hôtes a également un effet négatif sur les taux de parasitisme (Marston & Ertle 1969; Calvin et al. 1997). Pour une efficacité de contrôle des ravageurs en utilisant le trichogramme, il est alors indispensable de lâcher des individus prêts à émerger plutôt que des individus déjà adultes.

Dans une perspective de lutte biologique, outre la caractérisation des traits d'histoire de vie intéressante pour l'amélioration des systèmes d'élevage, la spécificité des trichogrammes pour leurs hôtes est un critère important de sélection d'espèces pour lutter contre des ravageurs spécifiques. De nombreuses études ont montré que les performances de parasitisme du trichogramme dépendaient des conditions environnementales (température, humidité) mais aussi du niveau d'acceptation des espèces hôtes (Salt 1935; Salt 1940; Marston & Ertle 1973; van Bergeijk et al. 1989). En outre, la spécificité est une caractéristique importante permettant de minimiser les risques d'effets non-intentionnels (« non-target effect ») de l'utilisation de trichogrammes.

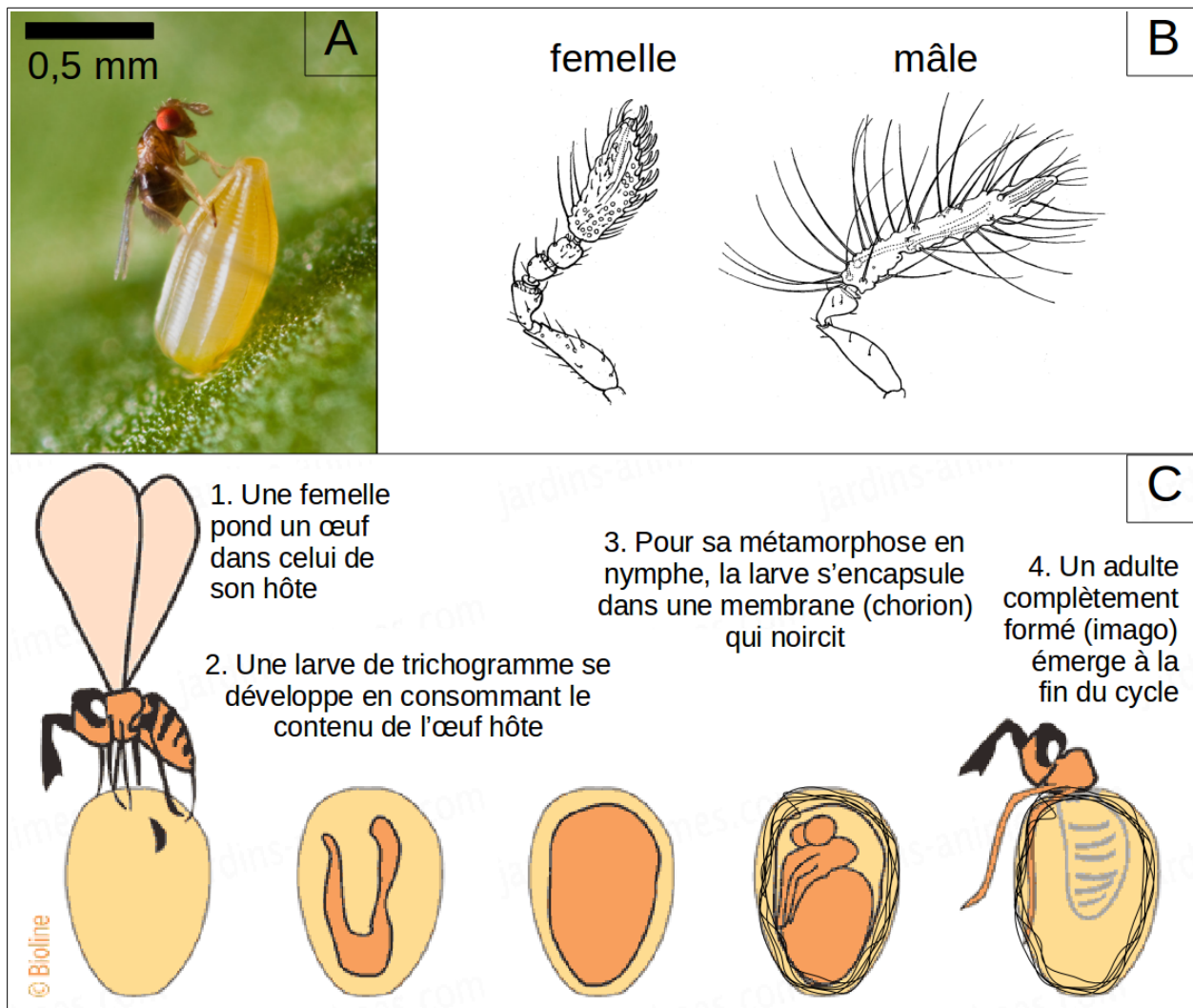


Figure 1 : Photo d'un individu de l'espèce *Trichogramma brassicae* (A) en train de parasiter un œuf de la piéride de la rave (<https://i2.wp.com/www.ninafatouros.nl/wp-content/uploads/2016/09/T.-evanescens-on-B.nigra-2-1-e1474457273755.jpg?fit=700%2C850&ssl=1>). Différence antennaire entre les mâles et les femelles (B) : Marchal 1936. Cycle de vie du trichogramme depuis l'oviposition d'une femelle dans un œuf hôte jusqu'à l'émergence d'un imago (C) : reproduit depuis la figure initiale dessinée par Bioline ©.

1.2.3. Les limites de la caractérisation du genre *Trichogramma*

Une amélioration des méthodes appliquées en lutte biologique et l'aide à la décision des agents de lutte biologique pour lutter contre des ravageurs devient alors une nécessité pour que les agriculteurs les utilisent comme alternative aux pesticides. Les méthodes d'élevages de trichogrammes sont relativement simples et permettent de produire, sur les œufs de l'hôte de laboratoire *Ephesia kuehniella* (Zeller), une grande quantité d'individus pour sa commercialisation (Bigler 1994). Du fait de sa facilité d'élevage et de son importance en tant qu'agent de lutte biologique, le genre *Trichogramma* est un très bon modèle biologique sur lequel il reste néanmoins beaucoup à apprendre. La caractérisation génétique et morphologique est à ce jour toujours incomplète et les limites des espèces définies par la morphologie sont parfois ambiguës. La réunion des différentes informations sur la caractérisation de ce genre d'agent de lutte

biologique permettrait une sélection plus précise et plus efficaces des souches ou espèces à utiliser pour lutter contre certains ravageurs.

1.3 Le projet TriPTIC :

Dans l'objectif d'améliorer l'utilisation du trichogramme en lutte biologique, le projet TriPTIC (**Trichogramma for plant protection : Pangenomics, Traits, and establishment Capacities**) a été financé par l'Agence Nationale de la Recherche (ANR) en 2014 pour une durée de quatre ans. Le projet est un partenariat entre l'Institut Sophia Agrobiotech (INRA, Université Côte d'Azur et CNRS), le Centre de Biologie pour la Gestion des Populations (CBGP) de Montpellier (INRA, IRD Supagro et CIRAD) et le Laboratoire de Biométrie et de Biologie Évolutive (Université Claude Bernard Lyon et CNRS). Ce projet porte sur la caractérisation du genre *Trichogramma* selon différentes approches et à différents niveaux : génétique, morphologique (taxonomique) , phénotypique (traits d'histoire de vie, comportement et propriétés démographiques).

Par une collaboration entre les différents axes de ce projet, les objectifs ultimes sont i) de sélectionner de façon plus performante les souches de trichogramme à utiliser contre des ravageurs ciblés, ii) d'augmenter les probabilités de succès d'introduction de l'auxiliaire dans un nouvel environnement et iii) de mieux anticiper les impacts de ces introductions sur l'écosystème et de modifier la stratégie de contrôle si nécessaire.

Deux campagnes d'échantillonnages ont été réalisées en France et dans d'autres pays européens (Espagne, Roumanie) en 2015 et 2016 ce qui a permis d'enrichir le Centre de Ressource Biologique (CRB) EP-Coll (Egg Parasitoid Collection) de l'Institut Sophia Agrobiotech d'environ 200 souches de trichogrammes d'une vingtaine d'espèces différentes. La méthode consistait à poser des œufs sentinelles de l'hôte de laboratoire, *E. kuehniella* à différents niveaux de végétation (strates herbacée, arbustive et arborée) sur différentes essences de plantes (pommier, figuier, lavande, prunier, laurier, olivier, courge, tomate, etc.) de manière à échantillonner un maximum d'espèces et de souches différentes. Deux méthodes de pose des œufs sentinelles ont été utilisées. La première consiste à préparer, en amont, des languettes (papier adhésif jaune) sur lesquelles des œufs de l'hôte de laboratoire étaient déposés et la deuxième consiste à pulvériser un mélange d'œufs et de colle à eau très diluée sur un organe foliaire de chaque plante échantillonnée. Les échantillons étaient exposés pendant 48 heures puis récupérés (soit la languette soit la feuille où étaient déposés les œufs) et soigneusement annotés. Un total d'une centaine de sites environ a été échantillonné. Dans ce projet, un groupe de travail principalement composé de membres de l'équipe de Recherche et Développement de Lutte Biologique (RDLB) s'est intéressé à la caractérisation génétique et morphologique (en collaboration avec le laboratoire de Montpellier) des différentes souches et espèces. Une partie importante du projet porte ainsi sur le développement de marqueurs génétiques qui pourront être utilisés en

routine pour identifier rapidement une espèce/souche de trichogramme récoltée. En parallèle, l'identification de la pureté (sans contamination involontaire lors du maintien en élevage) des souches déjà inscrites dans le CRB (par barcoding au locus COI) permet de proposer une phylogénie moléculaire des espèces de trichogrammes récoltées ; phylogénie qui reste difficile à clarifier. En effet, les limites des espèces du genre *Trichogramma* demeurent imprécises. Des hybridations entre espèces, jusque là dissociées, se sont avérées possibles *in natura* et observables lors des séquençages utilisant un marqueur génétique sur une zone très conservée : enzyme COI (figure 2). Par exemple, une hybridation entre l'espèce *T. brassicae* et *Trichogramma euproctidis* a été documentée et questionne la réelle dissociation entre ces deux espèces (Martel et al. 2010; Sümer Ercan et al. 2011; Sümer Ercan et al. 2012).

Un autre groupe de travail composé en grande partie de membres de l'équipe de Biologie des Populations et des Invasions (BPI) s'est intéressé à l'évaluation des succès ou échecs des introductions de l'auxiliaire par la caractérisation de son expansion (dispersion, fronts d'invasions) à l'aide d'expériences sur des populations en microcosme en laboratoire. Nous pouvons citer par exemple, la transmission des capacités de dispersion au niveau du cœur et du front de population (Alford et al. 2009; Phillips et al. 2010) qui influencent grandement la dynamique d'expansion d'une population. La mise en commun des connaissances et données générées entre les différents acteurs du projet TriPTIC établira des liens entre les différents types de caractérisations (génétique, phénotypique, populationnelle) et comblera certaines lacunes sur les connaissances du genre *Trichogramma*.

Ma thèse s'inscrit dans le « Work Package 3 » de TriPTIC, visant à la caractérisation phénotypique à haut débit (générer une grande quantité de données phénotypiques de manière efficace et le plus rapidement possible) des traits d'histoire de vie, des stratégies d'exploration et du mouvement des trichogrammes par la mobilisation de nouvelles techniques d'analyse d'images. L'objectif est de développer et de mettre en œuvre des méthodes de phénotypage s'appuyant sur les développements récents de technologies d'analyse d'images et de « vision par ordinateur » (Branson et al. 2009; Schneider et al. 2012; Pennekamp & Schtickzelle 2013). Plus spécifiquement, c'est la caractérisation fine et rapide des mouvements et stratégies de déplacement des trichogrammes qui est recherchée.

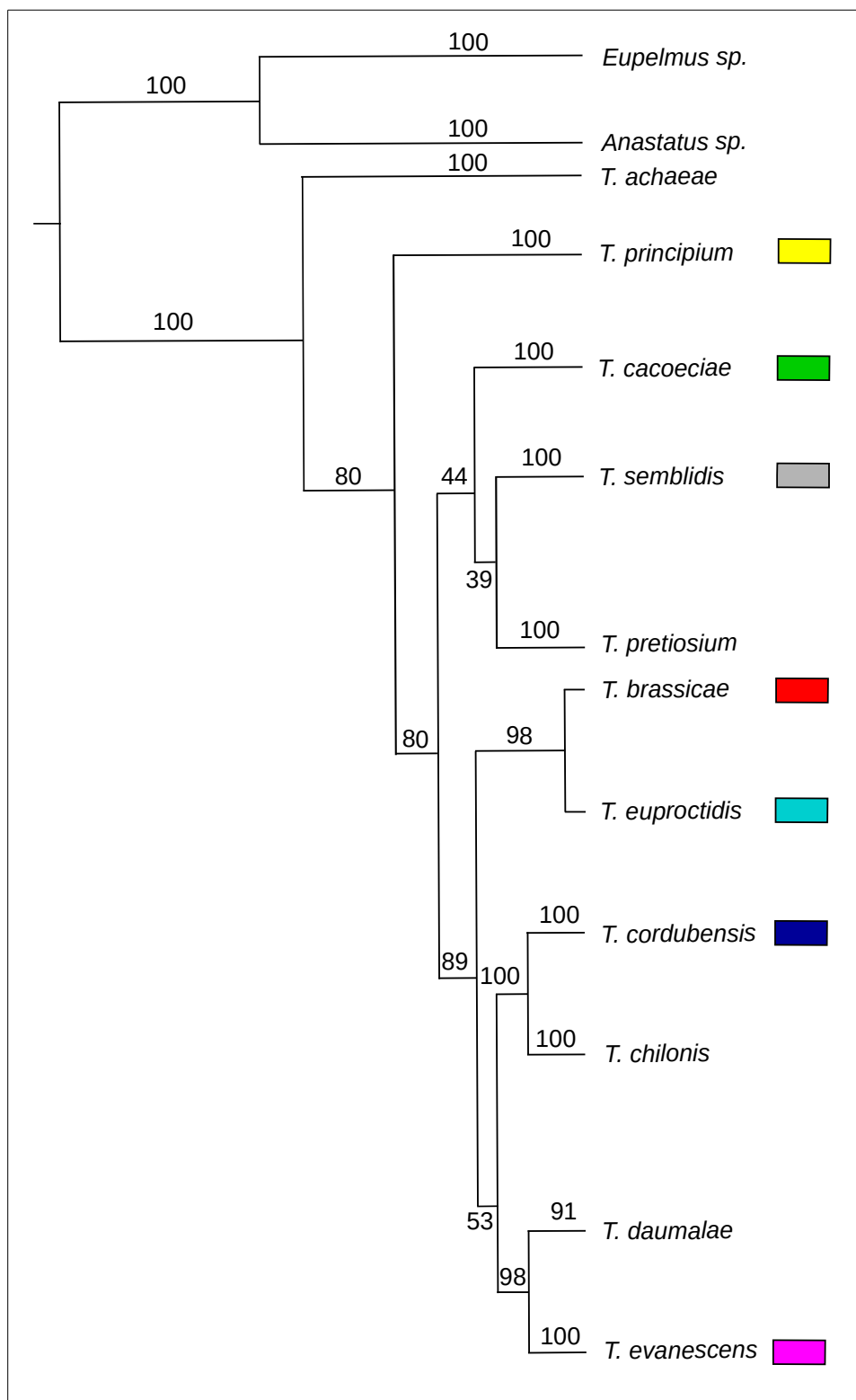


Figure 2 : Arbre phylogénétique simplifié des espèces du genre *Trichogramma* présentes au CRB de l'institut Sophia Agrobiotech séquencées et alignées sur 6 loci dont COI (Warot, 2018). Les rectangles colorés indiquent les espèces qui ont été testées expérimentalement pour répondre à mes problématiques d'études.

1.4 Le mouvement chez le trichogramme : un trait d'intérêt en lutte biologique

En dépit de la présence d'une paire d'ailes tout à fait développées, les trichogrammes ne sont pas de bons « insectes volants », du fait de leur taille minuscule et de leur légèreté : leur trajectoire de vol est hasardeuse et non stabilisée, soumise aux aléas des courants d'airs. Il est facile de s'en faire une idée en consultant les vidéos à très haute fréquence prises par l'université de Wageningen ([A second in the life of a parasitic wasp](#) : <https://www.youtube.com/watch?v=kZyIN23Cy4Y>; Lewis et al. 1990). Leur activité d'exploration de l'environnement s'effectue ainsi principalement en marchant et occasionnellement en bondissant. Les rares observations directes, sur le terrain, indiquent d'ailleurs que les trichogrammes arpentent de façon assez systématique les tiges des plantes pour rechercher leurs œufs hôtes (Pieter et Brigitte Kan : <http://www.filmimg-varwild.com/p-trichogrammatidae-fr.html>). La caractérisation du mouvement réel du trichogramme (ainsi que des autres espèces de micro-hyménoptères parasitoïdes) est encore relativement peu avancée, en partie du fait de la difficulté de les observer. Un des objectifs de ma thèse sera donc d'élaborer des outils permettant de mieux caractériser les mouvements d'organismes de si petite taille.

À l'échelle d'un champ ou d'une exploitation agricole la dispersion des trichogrammes est sans doute en grande partie passive, liée au transport par le vent (Fournier & Boivin 2000). Néanmoins à l'échelle d'une ou plusieurs plantes, leur capacité à se mouvoir dans l'environnement et les stratégies de recherche des œufs hôtes sont des traits phénotypiques considérés comme fondamentaux pour sélectionner les souches potentiellement plus performantes en lutte biologique (Lewis et al. 1990). L'évaluation de ces traits, du fait de la petite taille des organismes notamment, reste difficile, gourmande en temps et en ressources humaines. Ceci limite grandement la quantité de données qui peuvent être acquises, et donc la capacité à caractériser un grand nombre de souches/espèces. Par conséquent, il est difficile d'étudier systématiquement la diversité de ces traits au sein du genre et son histoire évolutive, ou encore de conduire des criblages de grande ampleur pour, à terme, sélectionner/améliorer des souches. L'amélioration des technologies et des techniques d'analyse d'images ont le potentiel de lever ce verrou dans l'étude et la caractérisation du mouvement des trichogrammes.

I.2. Le mouvement : un trait complexe à l'interface entre échelles individuelle et populationnelle.

2.1 Une thématique pluridisciplinaire

Ma thématique de recherche porte sur le mouvement des individus, c'est à dire leur déplacement d'un point initial à un point final en un temps donné. Le mouvement des individus est un sujet d'étude pour plusieurs disciplines, avec différentes échelles spatiales et temporelles considérées : depuis le phénomène comportemental des prises de décisions individuelles jusqu'aux échanges globaux d'individus (et de gènes) entre les populations (Bowler & Benton 2005).

2.1.1. L'écologie comportementale

Au niveau individuel, l'écologie comportementale s'intéresse aux différentes stratégies de déplacement d'un individu et à l'évaluation de son comportement (c'est-à-dire la quantification de traits comportementaux) dans un environnement donné (Westneat & Fox 2010). Selon les conditions environnementales, un individu adopte une stratégie d'exploitation de l'environnement lui permettant de s'alimenter et de se reproduire. Les facteurs comportementaux tels que le temps de transit (temps nécessaire à trouver une ressource), temps de résidence (temps d'exploitation d'une ressource) sont ainsi modulés pour optimiser l'exploitation de l'environnement. Si l'on suppose qu'un individu met en œuvre des stratégies qui maximisent son succès reproducteur dans l'environnement (stratégies optimales), on peut alors chercher à déterminer théoriquement quelles stratégies devraient être mises en œuvre. C'est par exemple l'objet de la théorie de l'« optimal foraging » (Charnov 1976; Westneat & Fox 2010; Calcagno et al. 2014).

2.1.2. L'écologie des populations

En écologie des populations, plus particulièrement en dynamique des populations, l'étude du mouvement porte sur l'évolution de la distribution spatiale d'une population dans le temps (Soberón 2010). Les concepts comme la migration, la dispersion et l'espace, doivent alors être définis pour ce niveau d'étude du mouvement. La migration est définie comme le déplacement d'une population entre deux lieux au cours du temps, de façon souvent répétée (comme la migration saisonnière des oiseaux). Un exemple illustrant bien ce type de mouvement chez les insectes est la migration du papillon monarque, *Danaus plexippus*. En 1978, les entomologistes canadiens Urquhart (mari et femme) ont suivi les populations de papillons du Canada au Mexique pour retracer leur route migratoire (Urquhart & Urquhart 1978) et comprendre ce phénomène migratoire intergénérationnel. En effet, la totalité de la distance à parcourir pour la migration n'est pas atteignable en une seule génération. La dispersion des individus en écologie des populations se rapporte à la distribution d'une population dans l'espace, laquelle peut être uniforme, aléatoire ou agrégée. Par exemple, une étude sur les populations de rousserolles d'orient a montré que la

distribution des individus dans les marécages dépendait des intensités de perturbations environnementales (Nisbet & Medway 1972). Plus l'environnement était perturbé moins les individus se distribuaient de manière agrégée. La dispersion peut aussi représenter la colonisation de portions d'habitats vides à partir de populations établies, ou encore contrôler la vitesse d'expansion dans l'espace à partir de son point d'introduction. La migration n'a pas tout à fait le même sens en écologie des populations et en biologie évolutive et génétique des populations, bien que faisant dans tous les cas appel au mouvement.

2.1.3. La génétique des populations et évolutive

Le mouvement en génétique des populations se manifeste en termes de flux de gènes, comme conséquence des flux d'individus, et les études se concentrent sur leur impact sur la composition génétique des espèces. Pour la théorie de l'évolution, la migration représente l'une des quatre forces évolutives, avec la mutation, la sélection et la dérive. En génétique des populations, la migration correspond au nombre d'individus quittant une population pour une autre (émigration) et au nombre d'individus arrivant de populations extérieures (immigration). Ils influencent la composition génétique d'une population et par voie de conséquence, l'évolution des fréquences alléliques de chaque gène entre générations (Hartl & Clark 1997). Par exemple, il a été mis en évidence le potentiel de survie des populations de gorilles *Gorilla gorilla diehli*, une espèce en danger d'extinction. Ces populations étant très distantes entre elles et dans un habitat très fragmenté, ont été longtemps considérées comme isolées, néanmoins, l'analyse de la composition génétique a révélé la présence d'individus migrants entre les populations (Bergl & Vigilant 2007). Le taux de dispersion (souvent appelé indifféremment taux de migration) pour une population distribuée de manière continue dans l'espace est défini comme la distance parcourue entre le lieu de naissance d'un individu et son lieu de reproduction. Plus généralement, on s'intéresse au « noyau de dispersion », c'est à dire la distribution de probabilité de cette distance. Le nombre de générations étudiées peut être très élevé et l'histoire de la distribution actuelle des populations (par exemple les taux de dispersions) être inférée indirectement à partir de la structure génétique observée. Tout comme la théorie comportementale cherche à prédire les stratégies « optimales » pour un individu dans un habitat, la théorie de la génétique cherche à prédire quel taux de dispersion (ou quel niveau de dispersion) devrait être sélectionné (taux « évolutivement stable ») en fonction des caractéristiques des habitats (coûts de dispersion, connectivité des populations, taux d'apparentement ...) (Travis & Dytham 1999).

2.1.4. L'écologie du mouvement

Les précédentes disciplines s'intéressent aux comportements individuels et aux prises de décisions (écologie comportementale) ou à l'évolution de la distribution spatiale (redistribution : Turchin 1998) des individus au cours des générations successives (écologie des populations et génétique des populations). Une autre communauté de scientifiques se placent à un niveau intermédiaire entre les deux précédents, en les chevauchant partiellement. Elle cherche à caractériser explicitement le mouvement des individus au cours

de leur vie, et considère le mouvement populationnel comme résultante des mouvements individuels. Il s'agit d'une école fortement influencée, en termes de démarches et d'outils, par la physique statistique, et qui se structure depuis quelques années sous le nom d'écologie du mouvement (Nathan et al. 2008). Le nombre d'études en écologie du mouvement depuis les années 1990, s'accroît fortement (Holyoak et al. 2008).

Des outils développés en physique statistique pour décrire le transport dans l'espace de particules et de fluides peuvent s'appliquer en écologie. Il existe deux grandes approches pour décrire de tels phénomènes, l'une en suivant une particule individuelle au cours du temps, et l'autre en regardant à un endroit donné les particules qui y passent au cours du temps. La première approche est souvent qualifiée d'approche Lagrangienne, alors que la seconde est qualifiée d'Eulérienne (Turchin 1998). Par exemple, il a été développé en 2008 un outil de modélisation pour caractériser la dynamique spatiale d'organismes appartenant aux ichtyoplanctons (Lett et al. 2008) en suivant une approche Lagrangienne. Il permet de modéliser le déplacement passif d'un organisme appartenant aux ichtyoplanctons en fonction de variables environnementales. Un exemple typique de la seconde approche (Eulérienne) serait un modèle de diffusion. La diffusion peut être définie comme étant la redistribution d'une population (conséquence au niveau populationnel des mouvements individuels) au cours du temps considérant l'agrégation des déplacements de chaque individu de la population (Turchin 1998). Par exemple, une approche Eulérienne du mouvement a été utilisée pour étudier la transmission et le contrôle de la malaria entre populations humaines (Prosper et al. 2012). Ces deux approches peuvent apporter des outils efficaces pour modéliser, caractériser et prédire le mouvement animal (Turchin 1998; Smouse et al. 2010).

Ma thèse se situe à des échelles correspondant plutôt à celles de l'écologie du mouvement. Dans les deux sections suivantes, je classerai les grands types de mouvement présents et étudiés chez les insectes puis je mettrai en relation l'étude du mouvement des individus avec leur fitness.

2.2 Les spécificités du mouvement : exploration et orientation

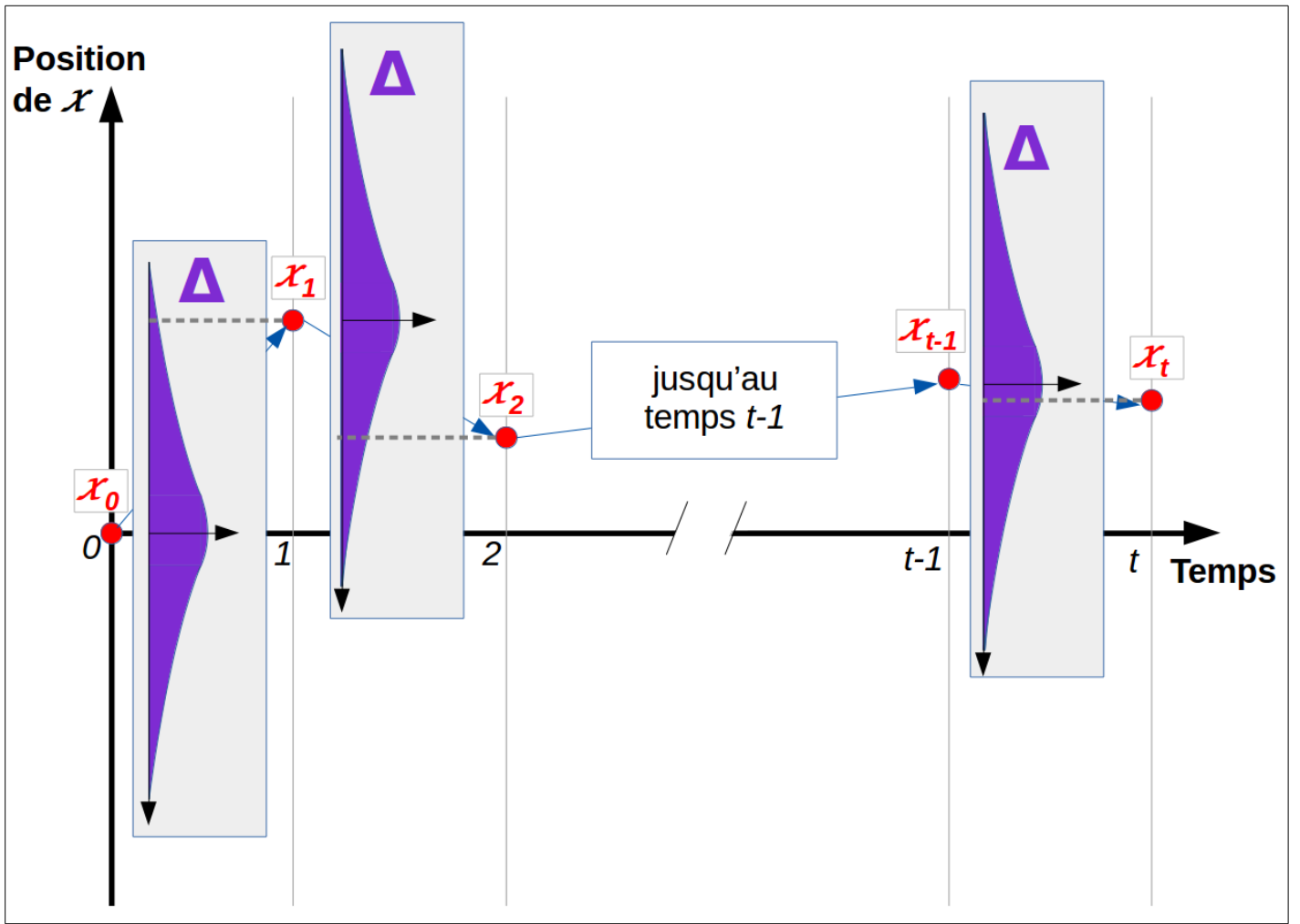
2.2.1 Mouvements non orientés : exploration et marche aléatoire

Dans un environnement quel qu'il soit, les insectes sont soumis à différentes motivations (risques de prédation, recherche de partenaire reproducteur, dispersion de la descendance). Néanmoins, même dans un environnement vide (sans *stimuli* environnementaux), les individus se déplacent. La simple motilité, justifiée ou non par des *stimuli* externes, engendre du mouvement. On parle alors d'exploration non orientée. Considérons un individu introduit dans un environnement aux dimensions infinies contenant des ressources distribuées aléatoirement. Il existe alors deux possibilités pour l'individu. Soit il est à une distance trop éloignée de la ressource pour la percevoir, il devra alors explorer son environnement d'une manière que nous pouvons supposée non orientée et aboutissant à une marche aléatoire (Williams 1988;

Crist & MacMahon 1991; Berman et al. 2014). Soit il est suffisamment proche de la ressource et il est alors moins intuitif de considérer un déplacement comme aléatoire car l'individu peut être réceptif à des *stimuli* (olfactifs ou visuels) et orienter sa marche vers la source émettrice (attraction) ou à l'opposé (répulsion). Il existe une distance de perception impliquant une réaction remarquable des individus, il s'agit de la distance de réaction. Chez les insectes, cette distance a été mesurée pour évaluer les dynamiques (vitesse et trajectoires) de déplacements orientés vers une ressource (Cloarec 1986; Formanowicz 1987; Bruins et al. 1994; Le Ralec et al. 2005). En dehors de cette zone, de nombreux exemples chez les insectes illustrent un phénomène de marche aléatoire.

La marche aléatoire se définit comme un type de déplacement pas à pas (discret). Chaque pas généré a une probabilité équivalente de se produire dans n'importe quelle direction (de manière aléatoire) (Turchin 1998). Prenons l'exemple théorique d'un environnement en une dimension dans lequel un individu se déplace de manière discrète depuis son point d'origine x_0 (boîte 1). Au temps 1 (un pas plus tard), selon la marche aléatoire, l'individu se trouvera en une seconde position x_1 égale à sa position ($x_0 + \Delta_0$), Δ représente la longueur d'un pas, qui est une variable aléatoire suivant une distribution symétrique centrée sur (c'est à dire d'espérance mathématique) x_0 dont la variance σ^2 est supposée finie et constante dans le temps. Le même scénario se répète pour le second pas avec la position $x_2 = (x_1 + \Delta_1)$, etc ... Dans le cadre d'une marche aléatoire, les pas sont en outre supposés indépendants les uns des autres (*i.e.* les probabilités d'aller dans n'importe quelle direction à une certaine distance sont constantes quel que soit le pas qui a été effectué précédemment). On peut ainsi décrire la marche aléatoire de la façon suivante :

$$x_t = (x_{t-1} + \Delta_{t-1}) \quad (1)$$



Boîte 1 : Schématisation d'une marche aléatoire en une dimension avec une probabilité Δ de changement de position X (rouge) suivant distribution (violet) symétrique constante entre chaque pas (avec $\text{var}(\Delta) = \sigma^2$).

Une des mesures indicatrices du type de mouvement est la variance globale de la position de l'individu au temps t . Cette variance est appelée Mean Square Displacement (MSD) (Turchin 1998), on a alors $\text{var}(x_t) = E[(x_t - x_0)^2]$ MSD. Il s'agit de la quantité totale de mouvement effectuée entre la position initiale et la position au temps t . Dans un environnement à une dimension (1D), la position de chaque pas se mesure en utilisant l'équation (1) en tenant compte de la position précédente ainsi que de la variance σ^2 de la distribution de Δ . Dans le cadre d'une marche aléatoire, comme la variance σ^2 de la distribution de Δ est constante et finie, on peut calculer cette variance totale à chaque temps. Au temps 1, la variance du mouvement est égale à la variance de la distribution de Δ soit σ^2 . Au temps 2, la variance globale du mouvement est égale à la variance du premier pas additionnée à la variance du second pas soit $(\text{var}(x_1) + \text{var}(\Delta))$. Comme la variance de la distribution de Δ est constante (marche aléatoire), $\text{var}(x_1) = \text{var}(\Delta)$ soit σ^2 . Au temps 2, $\text{var}(x_2) = 2 \sigma^2$. La même opération s'applique à chaque pas, La variance globale au temps t comme exprimée dans l'équation (1) se caractérise alors de la façon suivante (Turchin 1998) :

$$MSD = \sigma^2 t \quad (2)$$

Dans le cadre d'une marche aléatoire (mouvement diffusif), le MSD augmente donc linéairement avec le temps, la pente de cette mesure est appelée coefficient de diffusion (noté D).

Dans le cadre d'une exploration non orientée, le modèle de marche aléatoire a été établi comme une inférence pour le mouvement des insectes (Bovet & Benhamou 1988; Kareiva & Shigesada 1983; Turchin 1998). Kuefler et ses collaborateurs ont mesuré le MSD chez les rotifères (zooplancton) pour quantifier l'effet de la densité des individus et de la pression de prédation sur leur mouvement (Kuefler et al. 2012). Ils ont mis en évidence un mouvement diffusif de cet organisme et une influence significative des facteurs qu'ils ont testés sur le coefficient de diffusion. Certains types de mouvements observés se rapprochent de deux modèles de marches non orientées que sont la marche aléatoire corrélée et la marche de Lévy (Boîte 2).

Dans les cas où cette quantité de mouvement n'augmente pas linéairement, il est toujours possible d'interpréter son évolution (figure 3). Dans le cas d'une marche de Lévy, comprenant des phases ponctuelles de sauts à longue distance, le MSD augmente exponentiellement avec le temps. On parle alors de comportement sur-diffusif. À l'inverse si le MSD augmente moins vite que linéairement, on parle de comportement sous-diffusif comme ont pu le montrer Hapca et ses collaborateurs sur le déplacement du nématode *Phasmarhabditis hermaphrodita* lorsqu'il se déplace dans un milieu hétérogène (Hapca et al. 2007). La présence de grain de sable dans l'environnement composé de gel d'agar-agar ralentit fortement la progression du nématode.

Il existe deux modèles de marche non orientée très référencés pour caractériser le mouvement d'organismes tels que les insectes.

Correlated Random Walk (CRW) :

La marche aléatoire corrélée implique un biais directionnel local : il existe une corrélation entre deux pas successifs sur leur orientation (chaque pas tend à s'orienter dans le même sens que le pas précédent : Codling et al. 2008). L'influence d'un pas sur la direction du mouvement diminue progressivement en fonction du temps donnant à long terme une distribution uniforme des pas dans l'espace (Benhamou 2006). Par exemple, en 1983, Kareiva et Shigesada ont étudié le mouvement de deux papillons (*Battus philenor* et *Pieris rapae*) en s'appuyant sur un modèle de CRW. Bien qu'effectivement applicable en partie sur ces papillons, ils en ont conclu qu'un modèle plus complexe de CRW s'ajusterait mieux aux données observées (Kareiva and Shigesada 1983).

Levy Walk (LW) :

La marche de Lévy est une combinaison de deux échelles spatiales dans la caractérisation du mouvement. La composante principale de cette marche est une marche aléatoire locale (comme décrite au début de cette partie) mais une probabilité d'effectuer des pas de longues distances s'ajoute au processus (Bartumeus et al. 2005 ; Benhamou 2007). Ce modèle de marche a notamment trouvé sa place dans la caractérisation du mouvement d'organismes qui sont à la fois volants et marcheurs (Viswanathan et al. 2008 ; Reynolds and Rhodes 2009).

Boîte 2 : Présentation de deux types de marche non orientées pour l'étude du mouvement.

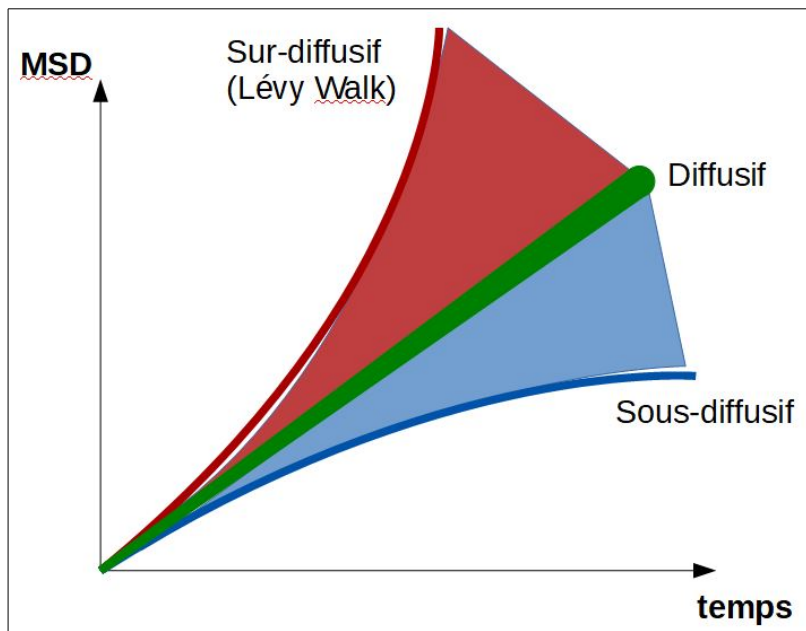


Figure 3 : Schématisation de l'évolution du Mean Square Displacement (MSD) en fonction du temps. Suivant la tendance d'évolution de ce paramètre, on peut caractériser le type de mouvement comme Sur-diffusif (rouge), diffusif (vert) ou sous-diffusif (bleu) (Fischer et al. 1985).

2.2.2 Mouvements orientés (ou taxies) :

L'attraction des individus par des *stimuli* externes, causant une tendance directionnelle dans leur mouvement est généralement appelée taxie (ou tactisme). Elle peut être liée à la lumière (phototaxie), à la gravité (géotaxie), à la perception chimique (chémotaxie), à la perception des courants d'air (anémotaxie) ou encore à certains aspects topologiques (thigmotaxie) de l'environnement.

Chez les insectes, on considère généralement l'attraction par la lumière comme omniprésente (Bishop 1969; van Grunsven et al. 2014). Cette attraction très répandue est observable très facilement : il suffit d'allumer une ampoule la nuit pour voir une grande variété d'insectes (diurnes ou nocturnes) être attirée par la source lumineuse et orienter leur mouvement vers elle. Une phototaxie positive est également considérée chez le trichogramme (Brower & Cline 1984). Il suffit de positionner un tube à essai contenant des individus pour les observer migrer vers la source lumineuse (ampoule, fenêtre, etc.).

La gravité peut aussi avoir un impact différent selon les espèces considérées. Ainsi, une géotaxie négative (s'éloignant du centre de la Terre) est souvent constatée chez les insectes (Jander 1963; Jian et al. 2002). Néanmoins, certaines espèces présentent une géotaxie positive. C'est le cas de la punaise *Cyrtomenus bergi* qui en surface du sol cherche à creuser plus profondément (de l'ordre d'une dizaine de centimètres) dans le sol pour trouver une zone d'humidité stable et riche en matière organique (Riis & Esbjerg 1998). Cette géotaxie peut varier selon la saison et être liée à une perturbation environnementale annuellement récurrente. C'est le cas de la pyrale du maïs, *Ostrinia nubilalis*. En pleine saison, les larves se situent en majorité au sommet des plants de maïs. Juste avant la période de récolte, une proportion des larves présentes dans les plantes oriente leur déplacement vers le sol, évitant ainsi le fauchage (Calcagno et al. 2010). Il se peut ainsi que pour un genre donné, certaines espèces se distribuent sur une strate arborée au niveau de la canopée alors que d'autres vont se distribuer sur une strate inférieure (herbacée ou arbustive).

Cette stratification au sein d'un habitat peut être provoquée en partie par la localisation des ressources de chaque espèce dans ces strates mais aussi potentiellement par la force de gravité.

Les insectes disposent par ailleurs d'organes sensoriels pour capter des molécules chimiques présentes dans l'environnement et les interpréter comme des signaux de présence de différents éléments de leur environnement. Il peut s'agir de proies, d'hôtes, de compétiteurs ou de partenaires reproducteurs (Wright 1958; Kielty et al. 1996). Par exemple, afin de se reproduire, mâles et femelles doivent pouvoir s'orienter en direction de leur partenaire. Les études sur la compréhension de ce mouvement sont nombreuses chez les insectes. La femelle émet des phéromones dans l'environnement qui sont perçues par le mâle (Fukaya et al. 2004). Cela entraîne un mécanisme d'attraction chimique, ou chémotaxie, qui peut être accompagné de stimuli visuels (bioluminescence des lucioles par exemple). Nous pouvons citer l'exemple de Farkas et Shorey, qui, en 1972 ont étudié l'orientation des mâles de *Pectinophora gossypiella* (ver rose du cotonnier) vers une femelle dans un tunnel de vue (Farkas & Shorey 1972). Après reconnaissance de ces molécules, le mâle va se déplacer et s'orienter en direction de la source de ces odeurs remontant (dans le cadre de cette étude) contre le courant d'air. Inversement, sans stimulus, le mâle restera préférentiellement hors du courant d'air. Il s'agit d'une étude parmi d'autres sur ce sujet néanmoins elle illustre bien la notion de stimulus chimique qui engendre un type de mouvement orienté pour la reproduction.

2.3 Le mouvement comme une composante de la fitness

La colonisation d'un environnement par une espèce s'effectue en deux étapes. La première s'effectue *via* le déplacement d'individus dans l'environnement et la seconde *via* la reproduction des individus dans une aire différente de leur aire d'origine. D'un point de vue évolutif, les individus qui se reproduisent le plus dans un environnement donné seront ceux qui transmettrons le plus leurs gènes aux futures générations, et ainsi leurs gènes tendront à augmenter en fréquence. Le premier à formuler ce concept sous le nom de valeur sélective (fitness en anglais) était Darwin dans sa théorie de l'évolution par sélection naturelle (Darwin 1859; Demetrius & Ziehe 2007). La capacité de reproduction est appelée fitness absolue (un nombre de descendants par unité de temps, ou par génération) et ce sont les différences de fitness absolu entre individus ou génotypes (fitness relatifs) qui déterminent la direction et la vitesse de l'évolution.

2.3.1. Le fitness en lutte biologique

En lutte biologique, il faut distinguer fitness d'une part et efficacité d'un auxiliaire de culture d'autre part. Le fitness correspond au nombre de descendants produits par un auxiliaire alors que

l'efficacité correspond au nombre de ravageurs éliminés¹. Le fitness ne dépend pas uniquement du génotype d'un individu mais aussi de l'environnement (biotique et abiotique) qui agit comme facteur de pression de sélection. Il est nécessaire que le fitness des individus introduits soit suffisamment élevé dans l'environnement d'introduction pour assurer le succès reproducteur de l'agent de lutte biologique et la persistance de sa population. Les individus les plus adaptés à un environnement donné auront une valeur sélective et ainsi une probabilité d'assurer une descendance, augmentée. Toutefois, il faut garder en tête que la sélection d'un fitness plus élevé ne passe pas forcément par une augmentation du taux de destruction des ravageurs, et ne conduit pas forcément à une abondance plus élevée des auxiliaires. En effet le fitness peut être augmentée par d'autres traits que le taux d'attaques (tels que la survie, la taille ou le niveau d'agressivité), et de façon corollaire, l'évolution par sélection naturelle peut établir des traits qui ne maximisent pas la taille de population totale.

Par exemple, chez le trichogramme, le fitness peut passer par une capacité à superparasiter un même hôte (Chacko 1969), un trait qui n'a pas d'intérêt pour l'efficacité en lutte biologique à l'échelle d'une génération (cela contribue à produire d'avantages d'auxiliaires pour la génération suivante). À l'inverse, certains parasitoïdes peuvent être efficaces en détruisant des hôtes sans pour autant en retirer le moindre bénéfice en terme de fitness (Abram et al. 2019). Cette dernière capacité peut être un avantage dans l'utilisation d'un auxiliaire en lutte biologique par inondation car les effets non intentionnels sur les espèces non cibles seraient très limités. Un exemple est la punaise marbrée, *Halyomorpha halys* qui présente désormais le statut d'espèce invasive en Europe occidentale et est en pleine expansion en Amérique du Nord. Un parasitoïde des punaises Pentatomidae (*Telenomus podisi*), indigène du Canada, est capable de parasiter les œufs de cette punaise exotique sans engendrer de descendance (Abram et al. 2016). Pour autant, cette capacité d'induire l'avortement des embryons de punaises dans l'œuf représente un avantage certain pour la mise en place d'un programme de lutte biologique par inondation contre *H. halys*. En effet, cela serait une moindre perturbation pour les espèces de punaises Pentatomidae indigènes non nuisibles du fait de l'absence de croissance démographique du parasitoïde sur la *H. halys*.

Comment mettre en lien la fitness et la performance de contrôle avec le mouvement des individus ? Il y a deux aspects principaux qui sont directement impactés par le mouvement : le taux de rencontre des hôtes (efficacité brute de recherche), et la dispersion (une facette plus indirecte de l'efficacité).

2.3.2. Les taux de rencontre (ou taux d'attaque)

Le taux de rencontre se définit comme le nombre de ressources/proies rencontrées dans un environnement par unité de temps. Le fait de découvrir un environnement à la recherche de ressources distribuées en patchs relève de comportements liés aux stratégies d'exploitation de ressources.

¹ Dans sa définition la plus simple. En pratique, on peut vouloir considérer des métriques plus complexes telles que le gain de santé des cultures ou de rendement, qui peut dépendre de façon non linéaire au nombre de ravageurs éliminés.

Une combinaison de ces types de déplacement peut également avoir lieu avec une recherche à longue distance ponctuelle jusqu'à trouver un patch puis une recherche localisée autour de celui-ci (figure 4D). Deux individus qui se meuvent différemment dans un environnement donné peuvent donc avoir ou non le même taux de rencontre (figure 2), ce qui rend la prédiction de ce facteur difficile.

Une fois introduit dans un environnement contenant des ressources (hôtes) distribuées de façon homogène ou hétérogène, un parasitoïde va explorer cet environnement à la recherche d'hôtes. En fonction de la distribution des hôtes (agrégée ou diffuse) dans un espace donné avec une densité globale d'hôtes constante, il est difficile de prédire dans quelles conditions une espèce considérée sera la plus performante. L'adaptation du mouvement en fonction de l'environnement pour optimiser son exploitation a de longue date été étudiée de manière empirique sur divers organismes, dont les insectes (Hassel & Southwood 1978). Par exemple, il a été montré chez les pollinisateurs qu'un apprentissage de l'environnement existe (mémoire du type de fleur qui produisent le plus de nectar par leur forme, reconnaissance sensorielle d'autres visiteurs). Cette capacité d'apprentissage modifie les stratégies de mouvement à adopter pour éviter de perdre du temps et de l'énergie sur des ressources limitantes ou déjà épuisées (Goulson 1999). Les individus qui adoptent les stratégies les plus optimales ont un fitness plus importante que les autres organismes pour un même laps de temps. Plusieurs modèles intègrent des facteurs comportementaux pour étudier la stratégie optimale d'exploitation de ressources et établissent un lien entre le déplacement et le fitness (Charnov 1976; Calcagno et al. 2014).

Il existe également des exemples au niveau populationnel sur les stratégies d'exploitation d'un environnement. En considérant qu'une population introduite n'est pas composée d'un seul individu, comment vont se distribuer les individus dans un environnement donné ? Il a été montré chez un autre hyménoptère parasitoïde (*Pachycrepoideus vindemmiae*), connu pour son comportement de garde des ressources, la possibilité d'une variabilité comportementale entre individus de la même espèce en compétition pour les mêmes ressources. Certains restent plus longtemps sur un patch, d'autres le quittent plus rapidement et partent à la recherche d'un autre patch (Goubault et al. 2005). En effet, au travers de l'étude des temps de résidence des individus testés, il a été observé le phénomène de retraite d'une partie des individus lorsqu'un patch de ressources était exploité par un compétiteur de la même espèce.

Outre l'adaptation des stratégies d'exploitation de ressources, certaines espèces subissent une pression de prédation supérieure à d'autres modifiant leurs déplacements. Par exemple, une espèce de notonecte (*Notonecta hoffmanni*) dont la pression de prédation subie engendre une sélection des individus capables de modifier leur stratégie de mouvement face aux prédateurs à différents stades de leur cycle de vie (Sih 1982). Plus le risque de prédation est élevé, plus les individus de cette espèce ralentissent leurs mouvements et leurs déplacements pour ne pas être repérés. Une sélection des individus qui ont adopté cette stratégie de déplacement s'opère alors. Il existe bien d'autres exemples concernant l'adaptation du

mouvement à l'environnement, illustrant le fait que l'étude du mouvement d'un organisme est une nécessité pour la compréhension fondamentale de son adaptation à un environnement et l'éventuelle prédiction de celle-ci (Mallet & Porter 1992; Grünbaum 1998; Gripenberg et al. 2010; Mazzi & Dorn 2012).

2.3.3. La dispersion

La question de la dispersion, distance entre le lieu de naissance ou le site d'introduction et le site de reproduction (Clobert et al. 2012), est au centre des études de lutte biologique. Il est classiquement considéré en lutte biologique qu'une espèce (ou qu'un individu) qui disperse beaucoup (qui engendre sa descendance suffisamment loin de son point de lâcher) assurera un meilleur contrôle des populations de ravageurs, car il recouvrera en peu de temps (ou générations) une grande surface de l'environnement à protéger, en assurant ainsi une augmentation du taux de rencontre (Hopper & Roush 1993; Fagan et al. 2002; Heimpel & Asplen 2011). Comprendre pourquoi et comment les espèces distribuent la génération suivante permet en outre de prédire l'établissement et l'expansion de ces espèces (Kot et al. 1996; Lockwood et al. 2005; Simberloff 2009). L'une des façons d'étudier ce phénomène correspond à étudier le mouvement des individus dans des environnements contenant les ressources nécessaires à leur reproduction (Hill et al. 2016).

Il est à noter que les taux de rencontre et dispersion ne sont pas associés de façon mécanique. Ainsi, ils peuvent être corrélés positivement si les individus qui dispersent, bougent plus vite et trouvent également plus d'hôtes, cas de figure où il y a des individus « vigoureux » et d'autres « faibles ». Ils peuvent aussi être liés négativement si les individus qui dispersent beaucoup tendent à perdre du temps en déplacements inutiles, et donc à être moins efficaces à exploiter ou localiser les hôtes, auquel cas il existe un compromis entre les deux. Enfin, ils pourraient bien sûr aussi être complètement indépendants.

2.4 Mesurer le mouvement : l'enjeu des mesures phénotypiques à haut-débit

Les stratégies développées par les organismes pour explorer un environnement et l'exploiter sont, nous l'avons vu, en lien direct avec ses capacités à s'y reproduire et se disperser. D'un point de vue méthodologique, l'étude du mouvement engendre de nombreuses contraintes. En effet, le suivi des individus doit se faire de façon rigoureuse soit en annotant manuellement un suivi à l'œil nu en direct (Fielde 1905; Laing 1938), soit en enregistrant les déplacements par suivi vidéo (Tsuchida 1991; Noldus et al. 2002) ou satellite, par exemple le suivi d'imposants mammifères comme les éléphants ou les dugongs (Sheppard et al. 2006; Thomas et al. 2008). Ces approches sont limitées par la capacité d'analyse individuelle des mouvements : cela peut nécessiter une grande quantité de réplicats et un temps important pour réunir les conditions d'études liées à la biologie des espèces étudiées (environnement, cycle de vie, élevage).

De façon générale, la phénomique désigne la caractérisation des traits phénotypiques à haut débit d'individus (de plantes principalement, mais de plus en plus d'animaux dont les insectes) souvent en

association avec leur caractérisation génétique (Furbank & Tester 2011). Les études phénotypiques des organismes ont longtemps été plus nombreuses que les études génétiques. À partir du développement de méthodes de caractérisation moléculaire à haut-débit (« omiques »), la situation s'est inversée et la recherche aujourd'hui est plus limitée en données au niveau d'étude phénotypique que génétique (Scheiner 1993; Hammer et al. 2005; Whitham et al. 2006). Afin d'obtenir des observations fiables sur les phénotypes observés au sein de différentes espèces et entre individus, il est nécessaire de réaliser un grand nombre de réplicats pour chaque modalité testée. Ce processus est très coûteux en temps du fait des limites biologiques (temps et conditions d'élevage, de production) des organismes étudiés (végétaux, animaux, champignons, procaryotes, ...), de leur cycle de vie et des contraintes technologiques et matérielles liées à ce type d'expérimentation. Les études d'héritabilité de caractères phénotypiques sont typiquement illustratives de l'utilisation d'approches phénotypiques. Par exemple, Matsumura et ses collaborateurs ont étudié l'héritabilité de l'activité de marche et de la durée l'immobilité tonique (immobilité de l'organisme induite par un *stimulus* externe) sur une grande quantité d'individus (entre 160 et 600 individus) de deux espèces de Coléoptères *Tribolium castaneum* et *Tribolium confusum*. Ils ont pu montrer une héritabilité forte de ces comportements ainsi qu'une corrélation négative entre l'activité de marche et la durée d'immobilité tonique sur ces deux espèces (Matsumura et al. 2017).

Le comportement, et le mouvement, sont des phénotypes qui peuvent se prêter à une approche phénotypique. Il a ainsi été proposé le terme d'éthomique (Reiser 2009), pour qualifier la caractérisation à haut-débit des comportements d'un organisme, et notamment l'analyse de ses mouvements. L'amélioration récente des technologies en terme de possibilité d'analyses télémétriques fournit désormais des outils (appareils photos, caméras, localisation à grande distance) pour obtenir plus rapidement une plus grande quantité de données quant au mouvement des animaux. Par exemple, une étude réalisée par Darney et ses collaborateurs de suivi des populations d'abeilles (*Apis mellifera*) en utilisant une méthode de tracking individuel par identification sur fréquence radio (RFID) a été menée pour quantifier l'impact des radiations hautes fréquences sur la survie des individus (Darney et al. 2016). Le développement informatique fournit également la puissance de calcul et les outils nécessaires au traitement de ces données. Ceci offre de belles perspectives tant pour la recherche en écologie que pour la lutte biologique. Étudier les différentes dynamiques d'intérêt (ponte, démographie, propagation spatiale ...) en laboratoire permet ainsi d'apporter des informations sur le phénotype des espèces d'auxiliaires étudiées, fournissant des connaissances fondamentales sur le déplacement de ces insectes.

I.3. Plan de thèse :

J'ai introduit précédemment la notion de mouvement des individus et le lien direct avec le fitness d'un organisme et son efficacité en lutte biologique. Une population introduite de trichogrammes va se disperser dans l'environnement, le découvrir, l'exploiter et s'y reproduire, et par conséquent délivrer un service de biocontrôle. Les stratégies de mouvement des individus vont fortement impacter ces différents aspects. Grâce aux campagnes d'échantillonnage réalisées dans le cadre du projet TriPTIC, le CRB propose une diversité intra- et inter-spécifique (souches et espèces) de trichogrammes intéressante avec des souches provenant de lieux ou de strates végétales différents. Cela procure une variabilité environnementale supplémentaire intéressante dans l'étude des adaptations et des stratégies d'exploitation développées par ces différentes souches et espèces.

Dans le cadre de cette thèse, l'objectif poursuivi sera donc la caractérisation du mouvement (de la marche) des trichogrammes, en cherchant à utiliser/mettre au point des approches de phénotypage à haut-débit. L'approche adoptée s'appuiera sur des méthodes de suivi par photos et vidéos, se rapprochant ainsi des méthodes éthomiques (Howard et al. 1998; Balch et al. 2001; Reiser 2009). Le but général est de mieux comprendre comment les trichogrammes explorent leur environnement et se dispersent (Alves et al. 2015; Kant & Minor 2016).

À cette fin, j'ai étudié plusieurs types de mouvement chez différentes souches et espèces de trichogrammes, à différentes échelles spatio-temporelles (de quelques minutes à plusieurs jours sur quelques centimètres carré à des distances parcourues de plusieurs mètres). Du fait de la petite taille de mon modèle biologique et de la nécessité d'acquérir des données de qualité en quantité suffisante, j'ai dû élaborer des protocoles expérimentaux originaux et participer au développement de méthodes utilisant des outils d'analyse d'images.

Dans un premier temps, je présenterai un bref historique du développement des méthodes d'analyse d'images en écologie comportementale et du mouvement. Je présenterai plus en détails les différentes méthodes développées dans le cadre de cette thèse pour l'étude à différentes échelles de mouvements du trichogramme. Ces approches sont au nombre de trois : (i) observation indirecte des mouvements sur plusieurs jours, (ii) suivi photo de la propagation spatiale sur plusieurs heures et (iii) suivi vidéo des trajectoires individuelles sur quelques minutes.

Dans un second temps, équipé de ces méthodes, je présenterai trois expériences en laboratoire que j'ai conduites quant au mouvement du trichogramme, celle sur l'étude de la dynamique de propagation spatiale des individus en fonction de leur densité et de la distribution des hôtes étant celle qui a été la plus approfondie à ce jour.

→ **1. Étude de la variabilité des réponses géotactique, phototactique et leur interaction au sein du genre *Trichogramma*.** Il s'agit d'une étude visant à phénotyper rapidement chez une espèce/souche de trichogramme ses préférences de ponte en fonction de la lumière et de la gravité. Dans cette étude 18 souches appartenant à 5 espèces différentes ont été testées. L'objectif étant d'évaluer si ces traits phénotypiques sont conservés ou variables entre souches et entre espèces et s'il existe un lien entre les réponses phototactique et géotactique et la strate végétale exploitée *in natura* par ces souches/espèces.

→ **2. Étude de la variabilité des taux d'activité, vitesses et trajectoires d'exploration au sein du genre *Trichogramma*.** Je mets en œuvre ici le tracking simultané de plusieurs individus pour caractériser différentes souches et espèces. Le suivi des déplacements de 21 souches de 7 espèces différentes a été effectué et caractérisé. L'analyse vidéo permet une acquisition de données en grande quantité et une caractérisation précise du mouvement à court terme (quelques minutes de suivi vidéo).

→ **3. Effet de la densité de la population de trichogrammes et de la présence/distribution des hôtes sur la dynamique de propagation spatiale d'une souche de *T. cacoeciae*.** L'objectif de cette étude est dans un premier temps de caractériser une dynamique de propagation spatiale des individus selon différentes modalités : une modalité à faible densité (de l'ordre de 25 individus) et une modalité à haute densité (de l'ordre de 70 individus). Dans un second temps, nous testerons également l'hypothèse d'une marche aléatoire en fonction de la présence/distribution de ressources pour un groupe d'individus : la densité totale en hôte sera constante, leur distribution sera soit de 1 hôte tous les 5 centimètres soit un agrégat de 6 hôtes tous les 30 centimètres. Et enfin, nous discuterons du lien existant entre la distribution des individus et la distribution du parasitisme.

II. Les méthodes d'analyse d'images et leur apport à l'étude du mouvement

Les méthodes permettant d'acquérir des données quant au mouvement des organismes ont connu une évolution rapide depuis la simple observation visuel en direct (sans assistance informatique) à l'analyse automatisée des actions de groupes de plusieurs dizaines d'individus. Il a suffi d'environ trois décennies seulement. L'éthologie ou étude du comportement animal est une base des études fondamentales comme appliquées en biologie et en écologie. Depuis les années 1980, le développement des méthodes pour l'éthologie utilisant les technologies d'imagerie et d'analyse d'images (aussi appelées « vision par ordinateur » ou « computer-vision ») se sont fortement développées, et ont connu des applications de plus en plus nombreuses en recherche écologique et agronomique. L'étude des auxiliaires de lutte biologique, n'étant pas un domaine d'étude récent, s'est historiquement développée sans outils informatiques. Des méthodes d'observations indirectes (observations de traces, recensements réguliers, capture-recapture) ont permis les premières études de mouvements de modèles biologiques intéressants pour la lutte biologique.

Avant de présenter les méthodes développées dans ma thèse, je dresserai un bref historique des méthodes d'acquisition de données pour les études de mouvement et du comportement. Ce dernier n'a pas la prétention d'être exhaustif, et se concentre principalement sur l'étude des insectes.

II. 1. Historique non exhaustif des méthodes d'acquisition de données pour les études de mouvement

1.1 Les études sans outils informatiques

Comment étudier le mouvement sans outils informatiques ou enregistrement vidéos ? Historiquement, les études utilisant des méthodes avec des tests de choix étaient largement utilisées pour étudier les stratégies de mouvement. Cela permettrait de quantifier l'orientation des déplacements d'organismes en leur proposant un choix entre au moins deux possibilité d'orientation. Il est possible de savoir approximativement la trajectoire des individus en identifiant des traces de leurs passages. Ces traces peuvent être liées à la prédation/parasitisme/herbivorie ou à des excréments chimiques ou organiques (Thorpe & Caudle 1938; Lloyd 1958; King et al. 1969). Par exemple, des œufs parasités peuvent changer de couleur ou d'aspect, comme nous en verrons un exemple avec le trichogramme dans la section III. Il est également possible de suivre les déplacements en organisant des comptages réguliers (recensement) des individus dont une des méthodes de suivi la plus répandue est le marquage des individus puis deux comptages décalés dans le temps (capture re-capture). En montant un dispositif sous forme de test de choix et en comptant régulièrement les individus dans les zones choisies, il devient alors possible d'identifier des préférences (attraction) ou des aversions (répulsion). Les stimuli peuvent être visuels, olfactifs ou physiques (lumière, température, gravité) (Boldt 1974; Ritter & Persoons 1974; Curl & Burbutis 1978; Khan & Saxena 1985; Coll 1996). Les tests de choix sont un bon moyen de tester les préférences d'orientation, de parasitisme/prédation des organismes tels que les agents de lutte biologique. Il s'agit dans tous les cas, d'observations indirectes du mouvement, qui sont sur le principe, plus proche d'une vision Eulerienne du mouvement.

D'autres types de tests existent pour observer directement les déplacements d'individus d'espèces à intérêt agronomique. Cette approche se situe ainsi plus dans une vision Lagrangienne du mouvement. L'observation directe (à l'œil) avec des annotations manuelles ont aussi été mises place avant l'utilisation d'outils informatiques. Ces méthodes procurent des données sur le comportement en temps réel des organismes, toutefois elles nécessitent beaucoup de temps et de concentration de la part des observateurs. Plus les modèles biologiques sont de petites tailles plus il est difficile de les observer. Cependant, depuis le début du XX^{ème} siècle, les scientifiques s'interrogent sur les déplacements (trajectoires, vitesses, interactions) des insectes. Les observations étaient alors soumises à la capacité de l'œil humain (quelques points retenus par seconde). Les trichogrammes ont pu alors déjà être observés et une partie de leurs déplacements ont alors été caractérisés. Dans l'étude en environnement fermé (boîte de pétri) de Laing, les tests portaient sur la probabilité de trouver un ensemble d'œufs hôtes en fonction de la distance entre ces œufs (Laing 1938). Pour étudier cela, des œufs d'hôtes sains ont été disposés sous forme de ligne, à une distance contrôlée les uns des

autres. Les mesures effectuées (observation à l'œil) correspondaient aux nombres de contacts entre le trichogramme et les différents œufs hôtes. Pour compléter des études de mouvements chez le trichogramme, des facteurs comportementaux ont aussi été mesurés sans outils informatiques. Un simple chronomètre et une loupe binoculaire permettent de mesurer des temps d'oviposition, de voyage, de résidence voire de retracer des trajectoires (Kaiser 1988; Wajnberg 1989). Une autre des études les plus anciennes sur le mouvement d'arthropodes date de 1941 (Waloff 1941) qui a montré un lien entre les conditions hygrométrique d'un environnement et le taux d'activité, de déplacement, d'organismes isopodes grâce à un dispositif sous forme de conduit. Le taux de déplacement était déterminé en comptant le nombre de graduations distants de 1 pouce (soit 2,54 cm) que franchissait l'organisme.

Bien qu'il soit possible d'étudier le comportement et le mouvement des insectes et arthropodes sans outils informatiques, il est tout de même préférable d'utiliser des méthodes moins soumises au biais lié à l'observateur. Ce biais représente la variabilité de mesures qui provient de la différence observée des mêmes événements par des observateurs différents. Par exemple, dans l'étude de Laing de 1938, l'observation des trajectoires ainsi que des types de contacts entre un trichogramme et son œuf hôte étaient manuellement retranscrite (Laing 1938). La perception et la retranscription des événements (mouvement des trichogrammes et types de contacts) s'effectuent différemment selon l'observateur, un autre observateur aurait sans doute annoté différemment cette étude. Pour limiter les impacts ce biais, il aurait fallu qu'un ensemble d'observateurs aient annoté le comportement du trichogramme pour tenir compte des variations entre observateurs dans les résultats. On retrouve ce biais notamment lors de comptage, recensement ou comme précédemment décrit, le suivi à l'œil de mouvement. D'autres limites liées à l'observation directe du comportement, comme le temps nécessaire pour rassembler suffisamment d'observations de qualité, étaient un frein à la finalisation d'études. Une étude de Waloff portait sur la surveillance de 1 heure à 3 heures par individu testé avec des annotations manuelles de la position de l'individu dans le dispositif à intervalle de temps régulier (allant de 30 secondes à 15 minutes) a été effectuée sur environ 400 individus (Waloff 1941). Ceci représente un temps considérable pour des observations et annotations manuelles. Le développement des technologies d'imagerie (caméras, appareils photos) limitent déjà ce genre de biais et procure un gain de temps (plusieurs individus, réplicats peuvent être observés en même temps).

1.2 Les premières utilisations vidéo en écologie comportementale

Dans les années 1950 sont apparues les premières méthodes d'enregistrement vidéo du déplacement des insectes. L'une de ces méthodes originales était la mise en place d'un « actographe » par Hammond en 1954 (Hammond 1954). Par un système de projection de lumière traversant un organisme (dans son cas il fallait que ce soit un insecte pesant 3 mg) pris dans une arène se balançant comme un pendule sur un écran filmé, il a été capable de reconstruire une trajectoire en une dimension de cet organisme. Une autre méthode

originale de suivi de déplacement direct a été mise au point par Green & Spinks (Green & Spinks 1958). Cette méthode consistait à radio-marquer des larves de coléoptères taupins pour pouvoir suivre leur déplacement dans le sol à l'aide d'un compteur Geiger. Le détecteur de radioactivité mobile était positionné en surface du sol avec un stylet pour graver sur une feuille de verre horizontale située au dessus du détecteur, la trajectoire de la larve. Bien que la position de la larve ne soit enregistrée que toutes les 30 secondes (méthode dite de « lapse time motion picture »), le suivi pouvait durer jusqu'à trois heures et donnait une bonne idée de la vitesse de déplacement et de la trajectoire souterraine des individus.

À partir des années 1980, de plus en plus d'études en écologie comportementale se réalisent en utilisant des suivis vidéos des individus (Wehrhahn et al. 1982; Godden & Graham 1983). Tsuchida enregistre le comportement de deux essaims de guêpes de papier (*Polistes jadwigae*) pour observer la division du travail au sein des populations (Tsuchida 1991). En marquant les individus avec de la peinture, il a pu les reconnaître sur ses vidéos. Il a dissocié trois différentes périodes dans la vie des individus avec une association de tâches préférentielles affectées à chacune de ces périodes. Les travailleuses jeunes et moyennement âgées sont responsables de la nutrition de la colonie ainsi que des larves alors que les individus plus âgés montent préférentiellement la garde contre les intrus. L'analyse vidéo procure également la possibilité d'enregistrer des comportements plus longtemps (plusieurs heures) sans défaillir, comparé à une observation directe des individus. C'est aussi une des raisons pour lesquelles King et ses collaborateurs ont pu observer les interactions entre femelles parasitoïdes de *Nasonia vitripennis* (King et al. 1995). En utilisant les traits phénotypiques discernables à l'œil nu (couleur des yeux par exemple) il est possible de reconnaître sur des vidéos les différents individus provenant de lignées différentes. L'analyse de ces vidéos d'une durée de six heures de cette étude a tout de même dû être faite à l'œil (pas d'analyse automatique) et demande un temps d'analyse très important. L'amélioration de la qualité des images enregistrées s'accélère et continue même de nos jours.

1.3 Le développement des outils informatiques et des méthodes d'analyses d'images

Le tracking vidéo d'individus fascine bon nombre de chercheurs et le développement rapide des technologies d'imagerie débute dans les années 1980. Par exemple, Wehrhahn et de ses collaborateurs ont mis au point l'une des premières études de tracking de mouches (*Musca domestica*) en trois dimensions (Wehrhahn et al. 1982). Ils ont réussi à montrer par une analyse du mouvement simultanée entre plusieurs individus que les mâles étaient capables de suivre de manière plus efficace d'autres individus que les femelles. La caméra était fixée au dessus de la cage d'essai et un miroir incliné sur un des côtés de la cage leur permettait de visualiser la troisième dimension (Figure 5). Parallèlement à l'utilisation d'enregistrements vidéos pour étudier le comportement, d'autres logiciels et techniques d'automatisation des analyses post-enregistrement vidéo ont été développés (Spieser et al. 1988; Noldus 1991). Il est alors possible d'aller de plus en plus loin dans l'analyse comportementale et dans le suivi des individus.

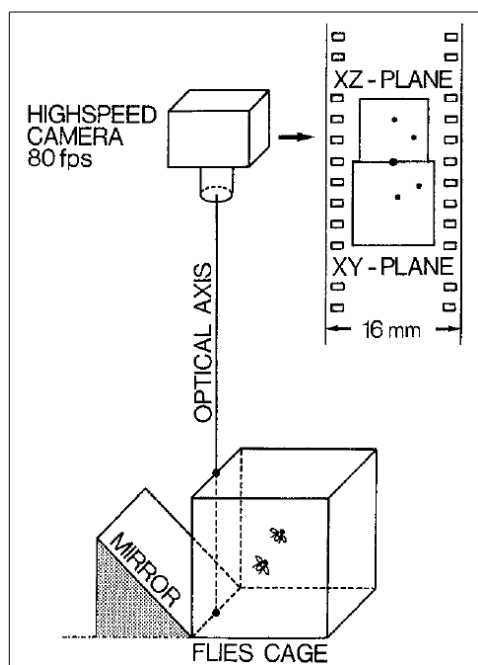


Figure 5 (Wehrhahn et al. 1982): Dessin schématique du dispositif expérimental utilisé pour l'enregistrement vidéo. La caméra à haute fréquence (80 fps et environ 0.3 Mpx) était fixée 4 m au dessus de la cage.

Afin d'obtenir des données individuelles sur le mouvement des individus plus rapidement, la question de comment suivre plus d'individus en même temps a été abordée dans les années 1990. Fleury et ses collaborateurs ont développé un système de suivi vidéo en deux dimensions de plusieurs individus isolés dans des micro-arènes pour étudier l'évolution de l'activité de marche en direct (analyses sur ordinateur en même temps que l'enregistrement vidéo) d'insectes selon leur rythme circadien (Fleury et al. 1991). Ils ont notamment testé et validé cette méthode sur trois espèces d'hyménoptères parasitoïdes : *Asobara tabida*, *Trichogramma brassicae* et *Leptopilina heterotoma* (Allemand et al. 1994).

Cloisonner l'espace sous forme de cellules permet ainsi d'acquérir plus d'informations individuelles mais ne permet pas d'étudier le mouvement de plusieurs individus dans le même espace. Hoy et ses collaborateurs ont développé un logiciel de tracking en deux dimensions qu'ils nomment : Multiple Animal Movement Analyzer. Ils ont validé ce logiciel en l'utilisant pour le suivi des déplacements simultanés d'une dizaine de fourmis entre leur nid et une source de nourriture (Hoy et al. 1997).

L'utilisation de plusieurs caméras simultanément a permis d'améliorer le système de suivi en trois dimensions et de remplacer le miroir par une deuxième caméra. Un gain de données plus rapide a été mis en œuvre par l'augmentation du nombre d'individus qu'il est possible de suivre (Marden et al. 1997). En effet, jusqu'à 150 individus pouvaient être suivis simultanément dans une même arène. Ces méthodes ont été calibrées sur des diptères. Néanmoins des chercheurs se sont intéressés à la généralisation de ces méthodes de tracking à d'autres organismes comme les guêpes parasitoïdes telles que *Cotesia glomerata* (Wanner et al. 2006) ou encore les libellules (Marden 2008) pour étudier leur performance de vol.

C'est réellement à partir du XXI^{ème} siècle que les outils d'analyse d'images ont trouvé leur place dans la recherche (Pennekamp & Schtickzelle 2013) auprès de plus en plus d'utilisateurs. D'autres logiciels ont été développés pour effectuer un ensemble de méthodes d'analyses d'images. Un logiciel d'analyse d'images comme ImageJ (Schneider et al. 2012), dont les premières versions datent des années 2000, a largement

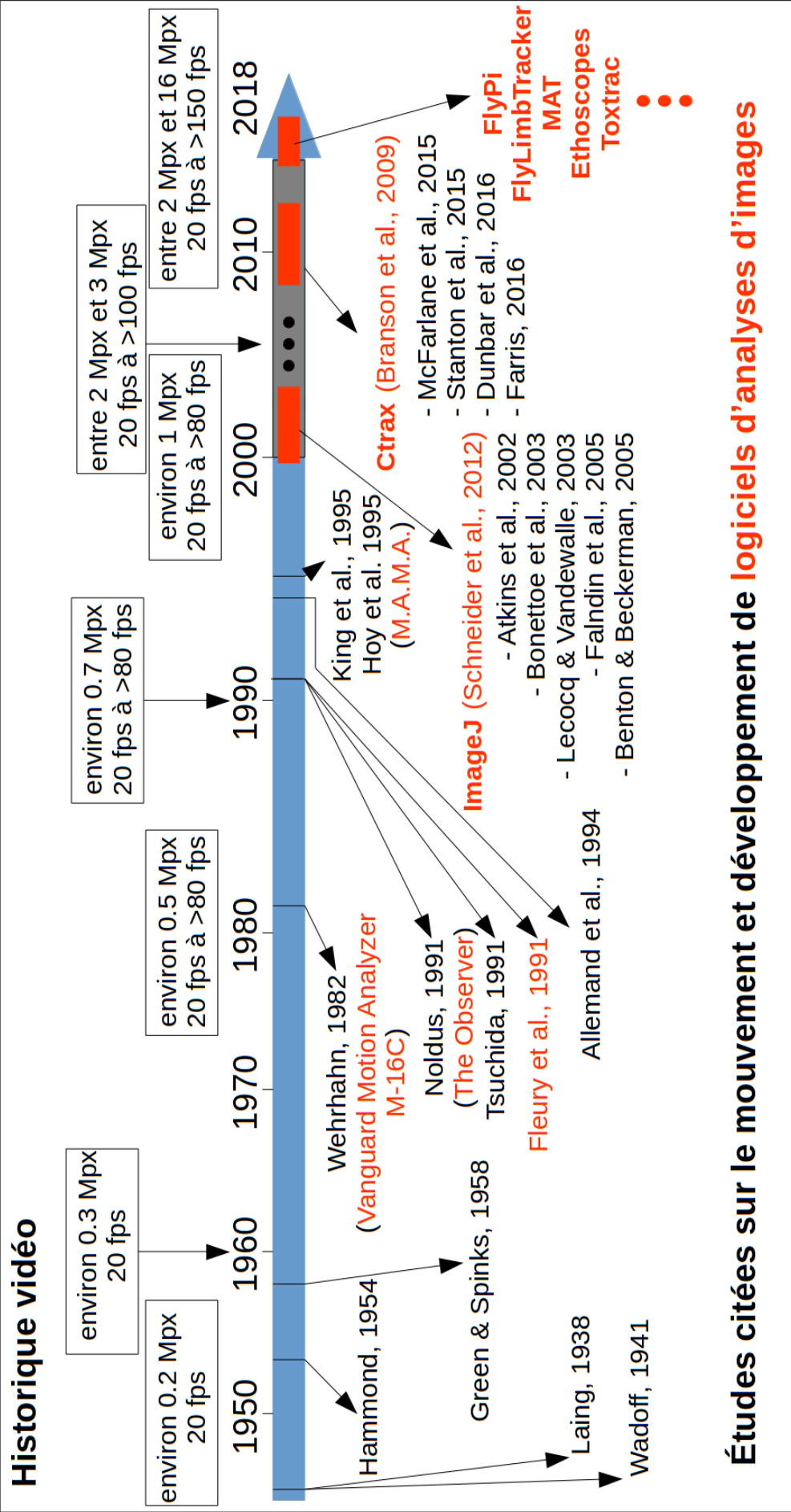
trouvé sa place dans les recherches en physique (Lecocq & Vandewalle 2003; Flandin et al. 2005), en biologie et en écologie. Par exemple, cela a permis d'exploiter des images de cerveau obtenues à partir d'Imagerie à Résonance Magnétique (IRM) en améliorant les méthodes de segmentation (dissociation des éléments d'une image) via l'utilisation du logiciel ImageJ (Atkins et al. 2002; Bonetto et al. 2003). Il a aussi été possible d'étudier les dynamiques de populations de protozoaires et d'acariens présents dans le sol (Schwarz & Frenzel 2003; Benton & Beckerman 2005). Pour cela, des images étaient régulièrement acquises des colonies de ces organismes puis assemblées sous forme de séquence d'images. Les étapes de segmentations et d'analyses de particules ont alors été effectuées sur chaque image et le comptage des quantités d'acariens ou de protozoaires a été obtenu et interprété comme dynamique de ces populations.

En 2009, Reiser décrit la réalisation d'éthogrammes à l'aide des logiciels de tracking (Ctrax et CADABRA). Il devient possible de mesurer des probabilités d'une action d'un individu en environnement contrôlé. Ce diagramme est dépendant des actions que l'on identifie en tant qu'observateur. Après une analyse vidéo, il propose de catégoriser des comportements (marche, arrêt, contact avec un autre individu) et de calculer les probabilités de transitions entre ces différents comportements (éthogramme). D'autres études suggèrent l'utilisation de logiciels de tracking pour obtenir des éthogrammes sur d'autres insectes que la drosophile comme pourrait le faire Ctrax, tels que le thrips (McFarlane et al. 2015), certains hyménoptères (Farris 2016) ou encore la coccinelle (dos Santos et al. 2017), mais également sur des mammifères comme le chat ou le cochon (Stanton et al. 2015; Dunbar et al. 2016).

Les technologies s'améliorant au gré des nécessités et des possibilités, la curiosité scientifique entraîne la communauté à aller toujours plus loin dans le perfectionnement et la précision de ses analyses (Pennekamp & Schtickzelle 2013). Que ce soit en recherche théorique sur des modèles mathématiques tels que la diffusion et la marche aléatoire ou en écologie comportementale quant à la caractérisation du mouvement (vitesse et trajectoire), l'analyse par « computer vision » a trouvé sa place dans cet univers scientifique (boîte 3). À partir des années 2000, la nombre d'études sur le comportement utilisant les outils de « computer vision » explose. Ainsi dans les années 1980, environ 250 études s'appuyaient sur du tracking vidéo sur les insectes, environ 2200 dans les années 1990, environ 6700 dans les années 2000 et plus de 14000 dans les années 2010 (<https://scholar.google.fr>).

Les premières études d'observation à l'œil, longues, fastidieuses et moins précises, ont été rapidement remplacées par des enregistrements vidéos ou photos accompagnés d'outils informatiques pour les analyser. Depuis les premiers logiciels de tracking développés dans les années 1980, en passant par ImageJ au début des années 2000 puis Ctrax et CADABRA, d'autres logiciels de plus en plus en adéquation avec des types d'expériences sur les insectes se développent. La plupart sont adaptables à différents organismes étudiés. Ce qui fait que l'on choisit l'un ou l'autre dépend des problématiques scientifiques posées ainsi que du niveau de résolution de l'analyse nécessaire pour y répondre.

Après ce rapide tour d’horizon, je vais décrire plus en détail les trois méthodes d’analyses d’images que j’ai mises en œuvre pour mes problématiques de recherches.



Boîte 3 : Frise chronologique sur l’amélioration des technologies de vidéos (Historique vidéo) et les études portant sur le mouvement. Les logiciels développés sont indiqués en rouge au cours du temps. La qualité photo dépasse largement celle de la vidéo avec actuellement une qualité d’image dépassant les 45 Mpx (Nikon D850 ©).

II. 2. Première approche : dénombrement automatique d'œufs parasités

- observation indirecte du mouvement

Méthode développée par G. Perez et V. Calcagno, avec ma participation

L'une des méthodes les plus informatives pour quantifier les performances et/ou préférences de parasitisme d'un auxiliaire tel que le trichogramme, serait de filmer les pontes des individus directement. Néanmoins, la petite taille de ce parasitoïde et le besoin d'images d'une très haute qualité pour pouvoir observer les instants d'oviposition des femelles sur les œufs ainsi que le long horizon de temps nécessaire (une femelle, indépendamment du temps de recherche, met de l'ordre de cinq minutes pour parasiter un œuf : Pak et al. 1986) rendent cette approche infaisable pour l'heure. En outre, une femelle peut interagir longuement avec un œuf sans que cela ne se traduise *in fine* par un événement de parasitisme réussi, et ceci n'est pas forcément facile à déterminer. Or, en lutte biologique, et plus largement en écologie évolutive, ce sont les événements de parasitisme effectifs (qui contribuent au biocontrôle et/ou au fitness) ainsi que les nombreux autres facteurs de mortalité (Abram et al. 2019) qui sont les variables d'intérêt principaux. Ainsi, l'approche classique qui est utilisée en entomologie est donc de simplement dénombrer, après un certain temps, les œufs qui ont été parasités. On peut tirer partie à cette fin du changement de couleur des œufs hôtes parasités, qui, sous l'effet du développement de la puppe du trichogramme, noircissent quelques jours après le parasitisme (cinq jours à 25°C sur *Ephestia kuehniella*). Il s'agit ainsi d'une observation indirecte du mouvement (cf : les tests de choix décrits dans la section II.1.1)

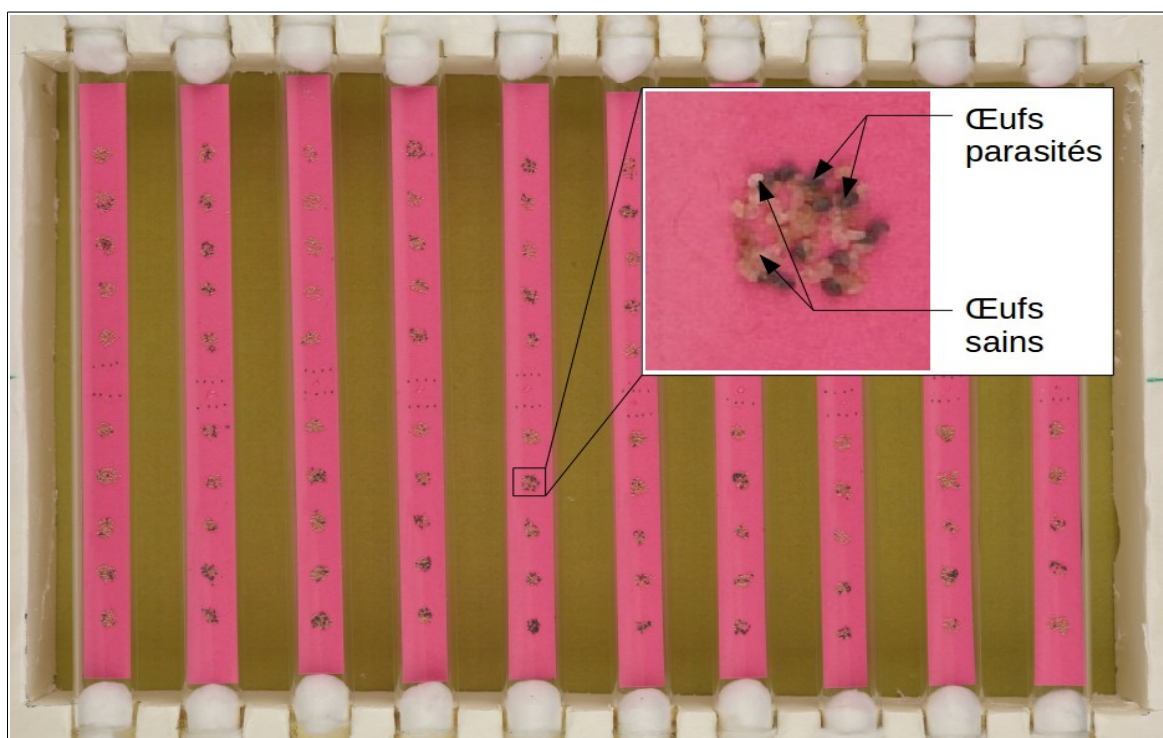


Figure 6 : exemple de cadre avec 10 tubes contenant chacun une bandelette rose avec des patches d'œufs d'*Euphydryas editha* (hôte de laboratoire du trichogramme) collés. On voit bien la différence entre un œuf sain, un œuf parasité et la couleur de la bandelette.

Classiquement, ce dénombrement est fait à l'œil, sur la base d'une photographie (figure 6). Compter des œufs sur une image est une tâche fastidieuse et longue à faire manuellement surtout lorsque le nombre d'œufs à compter par image est important (Burbutis & Koepke 1981; Soares et al. 2007; Grieshop et al. 2007; Arantes Faria et al. 2008; [Morel-Journel et al. 2016]). Différents outils informatiques existent pour assister à la tâche et limiter les erreurs de comptage, mais le dénombrement restant manuel, le temps nécessaire et le biais observateur demeurent.

Il a donc été cherché un moyen d'automatiser ce genre de dénombrement pour à la fois gagner du temps lors de l'analyse et aussi pour abolir autant que possible les éventuels biais-observateur liés au comptage manuel.

2.1. Principe de la méthode :

Il est possible de dissocier les éléments d'une image en fonction des couleurs qui la composent. Nous devons disposer d'images avec trois canaux différents par pixel (standard RGB mais il est possible de le faire en HSB) chacun caractérisé par un niveau d'intensité (entre 0 et 255 pour une image en 8 bits). Nous avons développé un plugin ImageJ/FIJI (Schneider et al. 2012) capable de distinguer les pixels de l'ensemble des teintes d'une même couleur et de quantifier ainsi une surface de pixels de chaque couleur. Il s'agit d'une segmentation de l'image en trois zones (un fond, un élément A : ici les œufs sains, et un élément B : ici les œufs parasités). Le plugin CODICOUNT (extension du programme ImageJ écrit en langage informatique JAVA), permet de générer une macro (code ImageJ) utilisable sur l'ensemble des images prises dans les mêmes conditions pour automatiser la segmentation des trois zones et le dénombrement (<http://sites.imagej.net/Cvince/plugins/>). Les nombres d'œufs étant élevés, et leur taille relativement peu variable, cette approche permet d'atteindre une bonne performance, tout en étant beaucoup plus simple et rapide que les méthodes qui rechercheraient à reconnaître individuellement la forme de chaque œuf. Ces dernières sont d'autant plus difficiles à appliquer dans ce cas que les œufs à compter sont couramment en contact direct les uns avec les autres au point d'être difficilement distinguables, y compris à l'œil. Là où les approches de segmentation classiques portent sur les niveaux de gris (Kaus et al. 2001), nous avons cherché à optimiser la segmentation en utilisant l'information de la couleur disponible. En outre, la méthode a été rendue flexible et reconnaît différents types d'œufs à dénombrer, de sorte à pouvoir s'appliquer à de nombreux dispositifs expérimentaux, types de photographies et d'organismes (Perez et al. 2017).

Cette méthode sera mise en œuvre en section III pour étudier les préférences de pontes du trichogramme. J'en présente ici les différentes étapes.

2.2 Acquisition des images :

Pour dénombrer automatiquement le nombre d'œufs parasités avec cette méthode, l'acquisition des images doit se faire en respectant une homogénéité de luminosité sur toute la surface contenant les œufs à

dénombrer. Ainsi, l'attention se porte sur l'absence de zones d'ombre par le réglage de l'éclairage. Comme le principe est de séparer les éléments de l'image en fonction de leur couleur, cette homogénéisation de la lumière diminue la variabilité de teintes observées pour chaque élément. Une photo prise dans les bonnes conditions d'éclairage avec un appareil Nikon D810 © dispose d'une résolution suffisamment élevée (36,3 Mpx) pour pouvoir en extraire les informations sur le parasitisme avec précision. Les paramètres de l'appareil à régler pour prendre une bonne photo sont : l'ouverture du diaphragme, les ISO, le choix de la focale, la vitesse d'ouverture/fermeture du capteur et le format de l'image. Les images sont renommées selon une nomenclature indispensable pour l'analyse automatique qui suivra (dans notre cas, nous testons différentes souches de trichogrammes : «nom de la souche»_«numéro du cadre»_«numéro du jour pour un suivi temporel»).

2.3. Analyse des images :

Pour analyser les images avec cette méthode, il est nécessaire de calibrer le plugin CODICOUNT pour lui indiquer les différentes teintes observables de chacune des couleurs à segmenter. La distinction d'un œuf hôte sain d'un œuf hôte parasité pour le trichogramme est très aisée. En effet 4 à 5 jours après avoir été parasité, la couleur de l'œuf passe de blanc/jaune à gris foncé/noir. Dénombrer les œufs sains et parasités rapidement peut donc être fait en utilisant ce plugin. Il est toutefois indispensable que la troisième couleur (le fond de l'image) soit bien discernable du blanc ou du noir. Nous disposons ainsi de trois zones qu'il faudra bien identifier (B pour « Background », H pour « Healthy eggs » ou P pour « Parasitized eggs ») lors de l'étape de seuillage (figure 7).

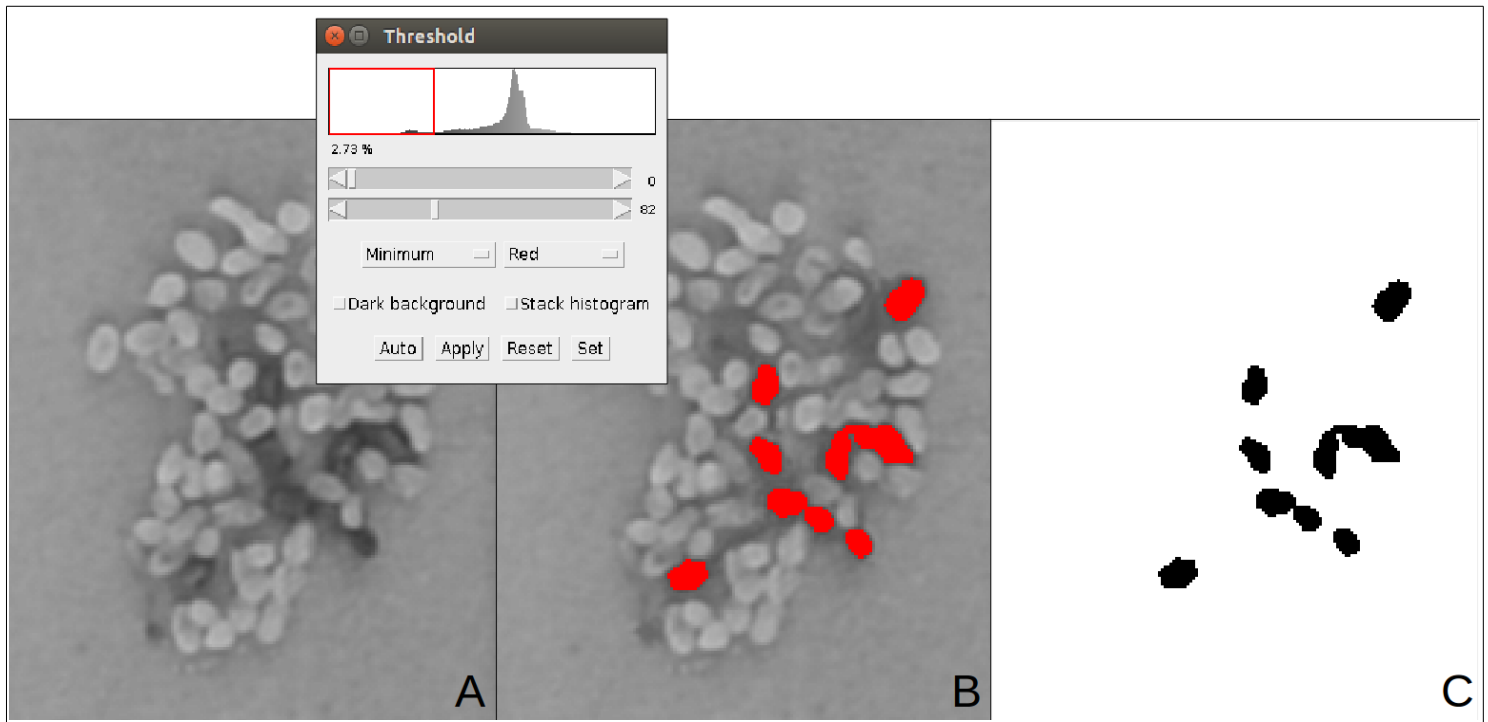


Figure 7 : Présentation d'une méthode de seuillage. À partir d'une image en niveau de gris (A), on cherche à identifier les œufs parasites (noirs) dans cet exemple. Pour cela on applique une méthode de seuillage (interface Threshold) en localisant les pixels qui ont les valeurs les plus faibles d'intensité de gris (B). Quand on applique ce seuillage, on obtient une image binaire (pixels noirs ou blancs) sur laquelle il sera possible d'analyser les particules identifiées (C).

2.3.1 Calibration de la macro (apprentissage des couleurs à distinguer) :

Avant de calibrer une macro avec CODICOUNT, il faut bien préparer l'image. Les différentes teintes de chaque couleur sont enregistrées en sélectionnant un grand nombre de zones pour chacune des trois couleurs et en enregistrant ces sélections dans le « Region Of Interest Manager » (ROI manager) du logiciel (une interface de sauvegarde des éléments sélectionnés sur l'image pour effectuer des analyses). Cela permet d'apprendre au plugin le gradient de teintes pour optimiser la segmentation de l'image. Nous renommons chacune des zones par une lettre en capitale (B, H et P). Une fois que les trois éléments ont été sélectionnés, enregistrés dans le ROI manager et renommés, il suffit de lancer le plugin CODICOUNT pour obtenir une macro calibrée pour l'ensemble des photos prises dans les mêmes conditions que celle utilisée pour la calibration. Le nombre total d'œufs peut être estimé avec une bonne précision en divisant le nombre de pixels par la surface moyenne en pixel qu'occupe un œuf sur l'image. CODICOUNT propose également une étape simple et intuitive de renseigner cette surface moyenne.

2.3.2 Application du plugin CODICOUNT :

L'idée est de définir l'espace colorimétrique « Red Green Blue » (RGB) ou « Hue Saturation Brightness » (HSB) le plus performant pour transformer une image couleur en image en niveau de gris afin

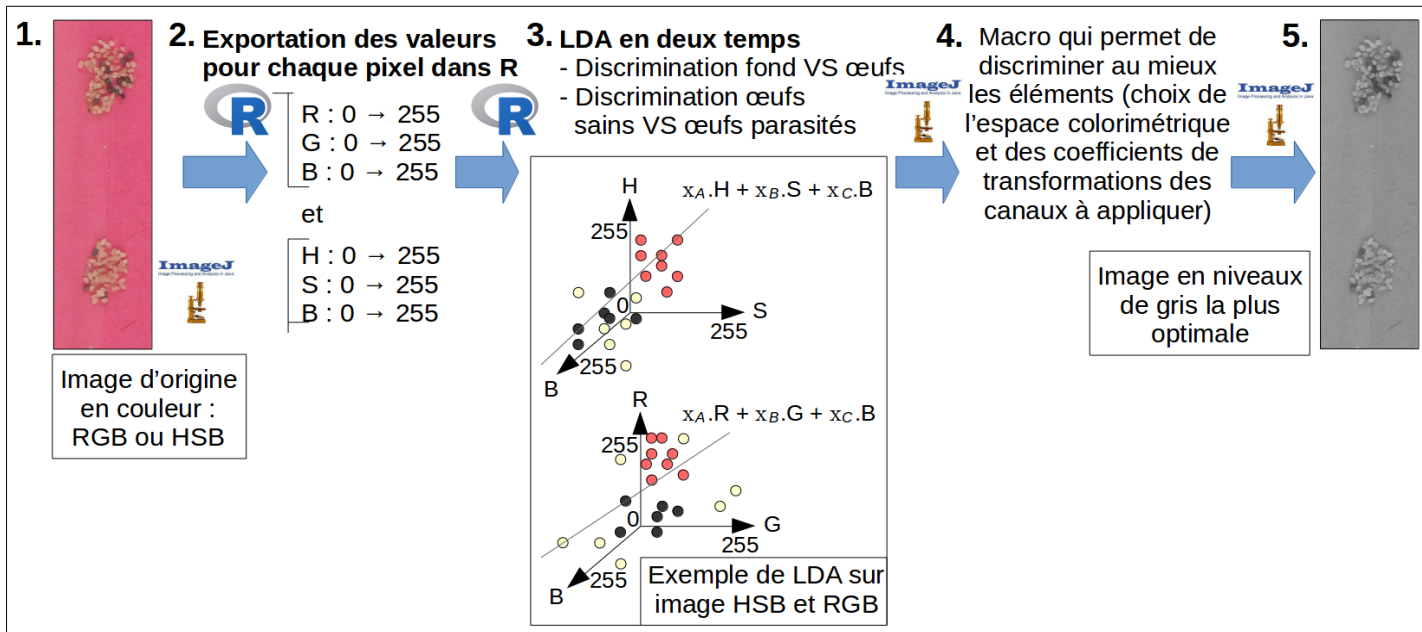


Figure 8 : Principe de la calibration de la macro. À partir d'une image en couleur (1.), ici contenant deux patches avec des œufs sains (blancs) et parasités (noirs), les valeurs des trois canaux de chaque pixel sont exportés dans le logiciel R (2.) pour réaliser une LDA en 2 temps (3.). Les coefficients optimaux sont calculés pour chaque espace colorimétrique (x_A, x_B et x_C) et réimportés via l'écriture d'une macro dans ImageJ (4.). Une image en niveau de gris est générée (5.) de manière à optimiser le seuillage (différenciation du fond, des œufs sains et des œufs parasités).

de réaliser la segmentation des différents éléments de l'image de manière optimale (figure 8). Chaque pixel d'une image en couleur se décompose en trois canaux (rouge, vert, bleu pour RGB et teinte, saturation et intensité lumineuse pour HSB) dont chacun possède une valeur comprise entre 0 et 255. Une somme de ces trois valeurs chacune multipliée par un coefficient génère une image en niveau de gris. Pour trouver l'espace colorimétrique ainsi que les coefficients de transformation des canaux pour obtenir une image dont le seuillage sera optimal, les valeurs de chaque canaux sont exportés dans le logiciel R (<http://www.R-project.org>) pour effectuer une analyse discriminante linéaire (LDA). La discrimination des trois zones s'effectue en deux étapes pour n'avoir que deux à séparer à chaque calcul :

→ LDA réaliser sur les pixels du fond et les pixels des œufs (sains et parasités) pour discriminer le fond des œufs

→ LDA réalisée sur les pixels des œufs sains et des œufs parasités

La résultante de chaque LDA est ensuite réimportée dans ImageJ pour générer une macro calibrée pour transformer de manière optimale l'image couleur en image en niveaux de gris. Le seuillage s'effectue ensuite en deux étapes également : la première pour discriminer le fond des œufs et la seconde pour discriminer les œufs sains des œufs parasités.

→ avant de lancer le plugin, une étape optionnelle permet de calculer en nombre d'œufs plutôt qu'en surface (pour les œufs sains et parasités), pour cela, un utilisant l'outil de sélection libre, il suffit d'entourer sur l'image une zone contenant 1 œuf, de l'enregistrer dans le ROI manager et de la renommer « 1 » et de répéter ce processus avec 3 et 5 œufs.

2.3.3 Coloriser les images de manière à n'observer que les trois zones : fond, œufs sains et œufs parasités :

Il s'agit d'utiliser la macro calibrée avec CODICOUNT pour transformer le gradient de teinte de chaque zone en une seule couleur sans variations (figure 9). Pour cela, il faut utiliser les réplicats isolés et passer la macro sur chacun. Il existe une fonction dans ImageJ qui permet de répéter une action sur toutes les images d'un même dossier :

- créer un dossier appelé « tubes2 »

- Dans ImageJ, utiliser la fonction Batch (Process → Batch → Macro) en indiquant le dossier de provenance des images (Input=« tubes ») et le dossier où les images transformées seront enregistrées (Output=« tubes2 »). Le format des images reste en TIFF et la macro à indiquer est celle obtenue avec CODICOUNT (copier/coller la macro dans l'encadrement blanc).

- cliquer sur « Process » et la transformation des images s'effectue en boucle sur chaque réplikat.

- Il n'est pas nécessaire d'enregistrer la table de résultats générée par la macro, elle contient l'information générale sur les surfaces du fond, des œufs sains ainsi que des œufs parasités du réplikat en général seulement, dans notre cas, il est nécessaire d'obtenir ces informations au niveau de chaque patch. Pour cela une dernière étape est nécessaire.

Une macro bien calibrée à partir d'une image peut être appliquée automatiquement à un ensemble d'images prises dans les mêmes conditions. En quelques secondes, il est alors possible d'obtenir les comptages des œufs sains et parasités pour chaque image (l'identité de l'image est enregistrée dans la table de sortie de données).

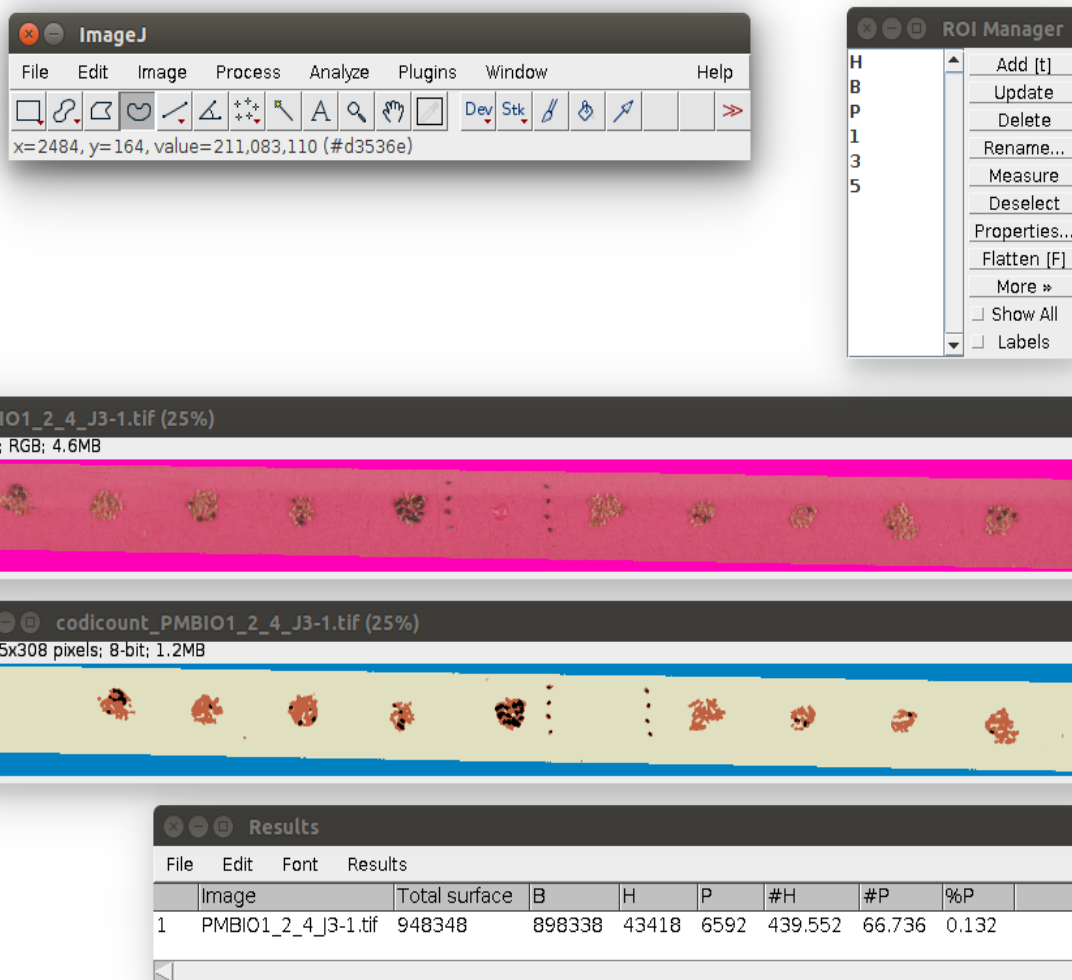


Figure 9: Résultat de l'exécution de la macro et obtention du tableau de résultats (photo : G. Perez). Les colonnes B,H et P indiquent la surface en pixel qu'occupe chacune des trois couleurs sur l'image. Les colonnes #H et #P indiquent le nombre estimé d'œufs que ces surfaces représentent. La colonne %P indique le pourcentage d'œufs parasités sur cette bandelette après l'analyse en utilisant CODICOUNT.

2.3.4 Les étapes « bonus » facultatives :

- Isolement des répliquats (tubes) :

Afin d'utiliser correctement la macro pour l'expérience décrite en section III, un isolement des bandelettes est nécessaire (figure 6). En effet, l'analyse doit se concentrer uniquement sur les bandelettes numérotées (on ne doit plus voir le fond derrière le cadre ainsi que le cadre en polystyrène). Pour cela, une macro appelée `splitter_vividpaper.txt` a été écrite. Une fois lancée sur chacun des cadre, elle permet d'extraire les bandelettes et de les enregistrer dans un dossier « tubes » créé automatiquement. Les étapes d'isolement des répliquats sont les suivantes :

- ouvrir une image contenant un cadre de 10 tubes dans ImageJ
- ouvrir la macro `splitter_vividpaper.txt` (plugins → New → Macro → copier/coller la macro `splitter_vividpaper.txt`) et la lancer (run macro)

→ fermer toutes les fenêtres sans enregistrement et ne garder que la fenêtre contenant la macro ouverte pour pouvoir l'appliquer sur chaque cadre.

→ les réplicats isolés seront automatiquement renommés de la façon suivante :

«nom de la souche»_«numéro du cadre»_«numéro du réplikat»_«numéro du jour».tif

Cette étape est indépendante de la calibration de la macro et peut être effectuée en amont.

- Mesure des taux de parasitisme dans chaque agrégat :

Dans le cas d'une expérimentation contenant plusieurs zones (patches) avec des œufs à parasiter, il est mis en œuvre une étape supplémentaire pour affiner les mesures automatiques des taux de parasitisme au niveau du patch. À partir des images colorisées de chaque réplikat, on utilise un plugin du nom de Patch_count dans ImageJ qui repère et numérote dans l'ordre (de haut en bas ou de gauche à droite selon le sens de l'image) les patches et mesure la surface en pixel dans chacun d'eux des œufs sains et des œufs parasités. Comme pour l'isolement des réplicats décrit précédemment, on utilise ici la fonction Batch de ImageJ :

→ créer un dossier de de résultats appelé « results »

→ dans ImageJ, utiliser la fonction Batch → macro (Input= « tubes2 », Output= « results », format=TIFF)

→ dans l'encadrement blanc, pour utiliser le plugin Patch_count, il y a trois paramètres à indiquer : le nombre de patches, le rayon minimum d'un patch (pixel) ainsi que le rayon définissant un disque autour de chaque patch dans lequel sera compté le nombre d'œufs sains et parasités (pixel). Pour cette dernière valeur, il faut déterminer le rayon de telle sorte qu'il ne soit ni trop petit pour bien compter tous les œufs d'un patch, ni trop grand pour éviter de compter une partie des œufs du patch voisin.

Par exemple, on peut écrire : `run("Patch Count","10 20 100")`

→ Cliquer sur Process, à la fin du calcul, il faut enregistrer la table de résultats contenant le nom de la souche, le numéro du cadre, le jour de la photo, le numéro du réplikat et les surfaces en pixel calculées (œufs sains et parasités) pour chacun des patches.

- Dynamique temporelle de ponte :

Lorsque les individus sont laissés plusieurs jours consécutifs en présence des œufs à parasiter, il est possible d'observer la dynamique de ponte des individus assez facilement. Il suffit de prendre en photo chaque jour un réplikat à partir du moment où les premiers œufs parasités deviennent noirs et d'analyser chacune des images avec le plugin. En superposant les images colorisées (avec une couleur différente par photo) par la macro, on peut ainsi observer la succession des œufs parasités de jour en jour.

2.4. Fiabilité de la méthode :

Afin de mesurer la fiabilité de cette méthode, nous avons réalisé des comptages manuels et automatiques à deux reprises sur 20 réplicats contenant chacun 10 patchs (avec des œufs sains et parasités) sur deux photos par réplicat prises à deux jours d'intervalle. Les comptages à l'œil ont été effectués par deux personnes pour obtenir une valeur moyenne, les comptages automatiques ont été effectués en utilisant l'outil CODICOUNT spécifiant la taille d'un œuf (en moyenne 123 pixels). Les régressions linéaires entre le nombre d'œufs sains et parasités estimé par les deux méthodes de comptage (figure 10) ont fait ressortir une très forte corrélation entre les deux facteurs (comme attendu) avec une droite dont la pente est proche voire très proche de 1 ($p \ll 0.001$, $R^2 > 0.7$). Cette pente est surtout nécessaire si l'objectif est de mesurer le nombre absolu d'œufs, et non par exemple la fréquence de parasitisme. D'après la figure 6, il est mis en évidence l'efficacité supérieure de la méthode pour le comptage des œufs parasités ($R^2 > 0,94$ et intercept de 1 et pente non différente de 1) par rapport aux œufs sains ($R^2 > 0,70$ et intercept de 12 et pente inférieure à 1). La différence d'efficacité entre les deux types d'œufs peut s'expliquer par une plus grande difficulté à compter manuellement les œufs sains car plus nombreux que les œufs parasités ainsi qu'un taux d'erreurs plus important lors du comptage automatique. Le comptage des œufs sains n'est habituellement pas effectué manuellement (trop long et difficile), et cette méthode automatique de dénombrement s'applique très bien sur les œufs parasités.

Avant même de réaliser l'expérience, la préparation du matériel biologique qui sera photographié (ici les œufs d'*E. kuehniella*) doit être suffisamment minutieuse pour éviter un chevauchement des éléments à l'image. Ce chevauchement participe à la différence entre comptage manuel et comptage automatique. Dans notre cas, le chevauchement des œufs sur l'image rend cette méthode approximative : certains œufs parasités sont identifiés comme sains si un œuf sain chevauche un œuf parasité et inversement. Notons toutefois que le même problème s'applique au comptage manuel. Il est possible d'améliorer ces résultats en augmentant le contraste entre les œufs et le fond ou en calibrant de façon plus précise la macro (en prenant plus d'échantillons par zone à compter).

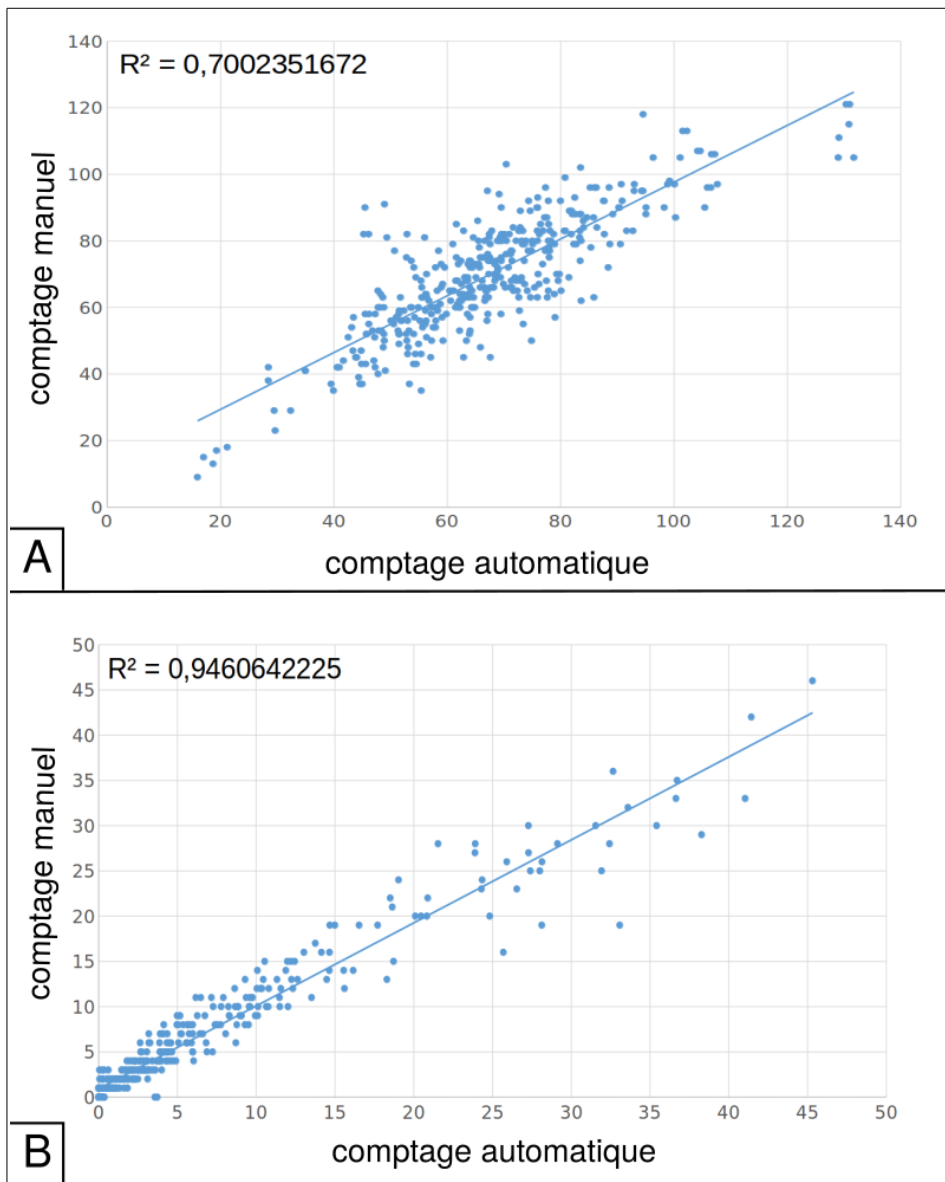


Figure 10 : Régressions linéaires pour comparer (au niveau d'un patch individuel, soit une centaine d'œufs environ), le nombre d'œufs sains (A) et parasités (B) en fonction de la méthode de comptage (manuelle ou automatique). $f(x)$ est la droite de régression linéaire et R^2 le coefficient de détermination associé.

2.5 Limites et améliorations de la méthode:

Cette approche comporte certaines limites et contraintes. Premièrement, cette méthode ne permet pas d'étudier le mouvement réel des individus puisqu'il s'agit d'observer et d'analyser des traces de leur passage (parasitisme des œufs). Ensuite, le respect d'une image contenant trois zones à discriminer (un fond et deux types d'objets : ici œufs sains et œufs parasités) est primordial pour l'étape de segmentation.

Certaines contraintes d'acquisition d'images sont à respecter pour calibrer le plugin et pouvoir appliquer une même macro à un ensemble d'images. Les photos doivent être prises dans les mêmes conditions avec des paramètres identiques (ISO, vitesse d'ouverture et fermeture du capteur, focale, ...) pour pouvoir être analysées avec la même macro. Lors de l'acquisition de l'image, il faut faire très attention aux ombres et éviter d'en avoir sinon les teintes de couleurs sont modifiées et la segmentation est moins précise. On peut en voir un exemple sur la figure 5 : le coin droit de la bandelette est identifié comme des œufs sains (orange) alors qu'il n'en est rien. Le problème lié aux variations de couleurs induites par les ombres peut se contourner lors de la calibration de la macro. En effet, plus il y a de pixels sélectionnées possédant les

différentes teintes d'une même zone (fond, œufs sains, œufs parasités) plus la calibration est précise et les erreurs liées aux ombres moins probables.

L'analyse automatique des images en utilisant la même macro permet à la fois un gain de temps lors du comptage et d'éviter un éventuel biais-observateur. En effet, chaque image sera analysée de la même manière et bien que la conversion d'une surface en nombre absolu d'œufs soit soumise à une approximation. Par ailleurs, par sa rapidité, cette méthode ouvre la possibilité d'atteindre des volumes de données plus importants (en faisant plus de réplicats ou plus de points dans le temps lors de suivis temporels). Il est possible d'améliorer l'estimation de la taille moyenne d'un œuf, et de le faire automatiquement, en identifiant les particules dont la forme approxime celle de l'œuf dans chaque patch par exemple. Il devient alors envisageable de re-estimer la taille d'un œuf au niveau du patch ce qui préciserait le comptage du nombre absolu d'œuf et du taux de parasitisme.

Le fait de pouvoir adapter le plugin CODICOUNT aux trois couleurs d'une image rendent cette méthode applicable à un ensemble de types d'études. Il est d'ailleurs possible d'augmenter le nombre de zones à segmenter dans une image. À chaque zone supplémentaire à segmenter, une étape supplémentaire lors de la calibration et de l'écriture de la macro sera rajouté. Cette amélioration n'ajoutant pas d'informations supplémentaires à mon étude, n'a pas encore été développée. Dans le cadre de ma thèse, cette approche a été utilisée pour étudier les préférences de pontes du trichogrammes en fonction de la lumière, de la gravité ainsi que l'interaction de ces deux facteurs et seront présentés en section III. Cette méthode est aussi appliquée pour d'autres expériences avec le trichogramme, et même à des organismes complètement différents : champignons phytopathogènes de pomme de terre (Perez et al. 2017) ou du peuplier (Halkett ; communication personnelle) ou encore de nématodes à galles parasites des racines (Guy Perez ; communication personnelle).

II. 3. Deuxième approche : suivi haute résolution/basse fréquence des individus adultes (grandes échelles spatiales et temporelles)

méthode développée en collaboration avec V. Calcagno

Bien que la méthode précédente/indirecte, fournisse de nombreuses informations quant au mouvement, la quantification directe du mouvement des individus est toujours préférable. Ceci implique de recourir à un suivi vidéo des individus au cours de leur vie. Conceptuellement, une « vidéo » n'est autre qu'une succession d'images prises à un intervalle de temps régulier, et par conséquent se distingue peu d'une suite (séquence) de photos. En effet, de nombreux formats vidéos ne diffèrent en rien d'une collection d'images JPEG (par exemple, le codec MJPEG). La spécificité d'une « vidéo » est donc fondamentalement de nature quantitative : on entend par vidéo une suite d'images suffisamment rapprochées dans le temps (typiquement au moins 10 images par seconde, jusqu'à plusieurs milliers) qui sont chacune, en contrepartie, de résolution assez limitée (de l'ordre de 1 à 3 millions de pixels, souvent moins pour de la haute définition). De fait, le flux total de données (fréquence*résolution), qui conditionne les besoins en espace de stockage et en puissance de calcul pour le traitement ne diffère pas grandement entre vidéo et suite de photos. En revanche, les technologies (types d'appareils et capteurs, formats d'encodage, ...) et outils informatiques (logiciels) demeurent, à ce jour, différents entre les mondes de la photo et de la vidéo, bien que depuis quelques années on assiste à une convergence progressive. Les deux approches qui vont suivre se sont ainsi développées autour du suivi vidéo à long (plusieurs heures) et court terme (quelques minutes). L'observation indirecte en utilisant la première approche précédemment décrite ne permet pas ce type de mesure. Le tracking (Dell et al. 2014) correspond à un suivi automatique d'un ou plusieurs individus en les localisant sur chaque image et en conservant leur identité (coordonnées X,Y dans le cas d'un suivi en 2D) et correspondra à la troisième approche.

Nous avons développé une méthode d'analyse vidéo sur plusieurs heures par suivi d'un groupe d'individus en condition de laboratoire écrite en ImageJ. La méthode développée étant précisément adaptée au dispositif expérimental, j'ai choisi dans cette partie, plutôt que de rester dans une présentation abstraite de la méthode d'analyse, de présenter certains éléments qui sont spécifiques à l'expérimentation qui sera présentée en Section V.

3.1. Principe de la méthode :

Si la distribution spatiale des événements de parasitisme contient de l'information quant à la distribution des individus, les deux distributions ne sont pas parfaitement corrélées. Pour observer une

dynamique d'exploration d'un groupe d'individus dans un environnement donné, il est indispensable de localiser directement les individus au cours du temps (faire un suivi).

Pour une expérience à grande échelle spatiale (6 mètres) et temporelle (8 heures), avec un dispositif observé à une distance supérieure à 80 cm, la représentation d'un trichogramme sur l'image n'est plus qu'un amas de pixels sombres d'une quinzaine de pixels que l'on appellera particule. En conservant la même prise de vue et en prenant plusieurs photos à des temps différents, il devient alors possible d'observer les changements de positions des particules donc de repérer des individus (Mallard et al. 2013) et d'enregistrer leur position à chaque instant. À la fin de l'expérience, nous disposons d'une séquence d'images prises avec le même angle. Les éléments des images qui n'ont pas changé de position entre, au moins, deux images sont considérés comme faisant partis d'un arrière plan. En soustrayant l'arrière plan d'une image, on ne retient que les particules qui se sont déplacées (Piccardi 2004), c'est à dire les trichogrammes. L'identification de la position des trichogrammes sur chaque image de la séquence nous donne la redistribution de la population introduite dans le dispositif à intervalle de temps régulier et ainsi leur dynamique de propagation. La prise de photos à intervalle de temps régulier (faible fréquence) est privilégiée à la prise de vidéos (haute fréquence) pour conserver une qualité haute définition des images à cette distance sur plusieurs heures. Cela implique de disposer d'un volume informatique plus important pour observer ce modèle biologique.

3.2. Acquisition des images :

La taille du dispositif (une double spirale de 6 mètres de long) implique qu'il faille utiliser deux appareils photo en simultané par réplicat (figure 11). Pour prendre en photo le dispositif entier avec un seul appareil, la distance nécessaire minimum qu'il faudrait mettre entre l'objectif et le dispositif serait trop importante et la qualité de l'image ne permettrait pas de détecter les trichogrammes. Mettre plus que deux appareils compliquerait la phase d'analyse (redécoupe des images pour éviter les zones de chevauchement, calcul des positions des individus par rapport au point de lâcher) et la quantité d'images à analyser ne seraient qu'augmenter pour une quantité d'informations supplémentaires négligeable comparé à l'utilisation de deux appareils photos. Chaque appareil photo capture un des deux côtés de la spirale. Des points de repères sur le polystyrène permettent d'être certain de prendre une zone suffisamment grande pour qu'il y ait une zone de chevauchement entre les deux images (évite la perte d'information au centre de la double spirale). Nous disposerons ainsi d'environ 72 Mpx par image complète de la spirale, ce qui permet d'avoir une résolution de 26212 pixels/cm², et donc un trichogramme est représenté par environ 15 pixels.

Les photos sont prises sous forme de séquence avec un intervalle de temps régulier entre chaque prise (par exemple 30 sec, 1 min ou plus). Les réglages des appareils photos et de l'intervalle de temps s'effectuent sur le logiciel « Digicam Control 2 ». Le format d'acquisition correspond à un format brut (extension NEF) et ne peut être traité tel quel. Il permet cependant de conserver toutes les informations des images et le volume informatique d'une image en format NEF (76.7 MB) est moins important que celui d'une image en format TIFF (108.9 MB). Le format TIFF (Tagged Image File Format) est un format

comprenant toutes les informations d'une image sans perte de qualité quelque soit l'appareil, le logiciel utilisé. Les images peuvent être ainsi stockées et analysées ultérieurement.

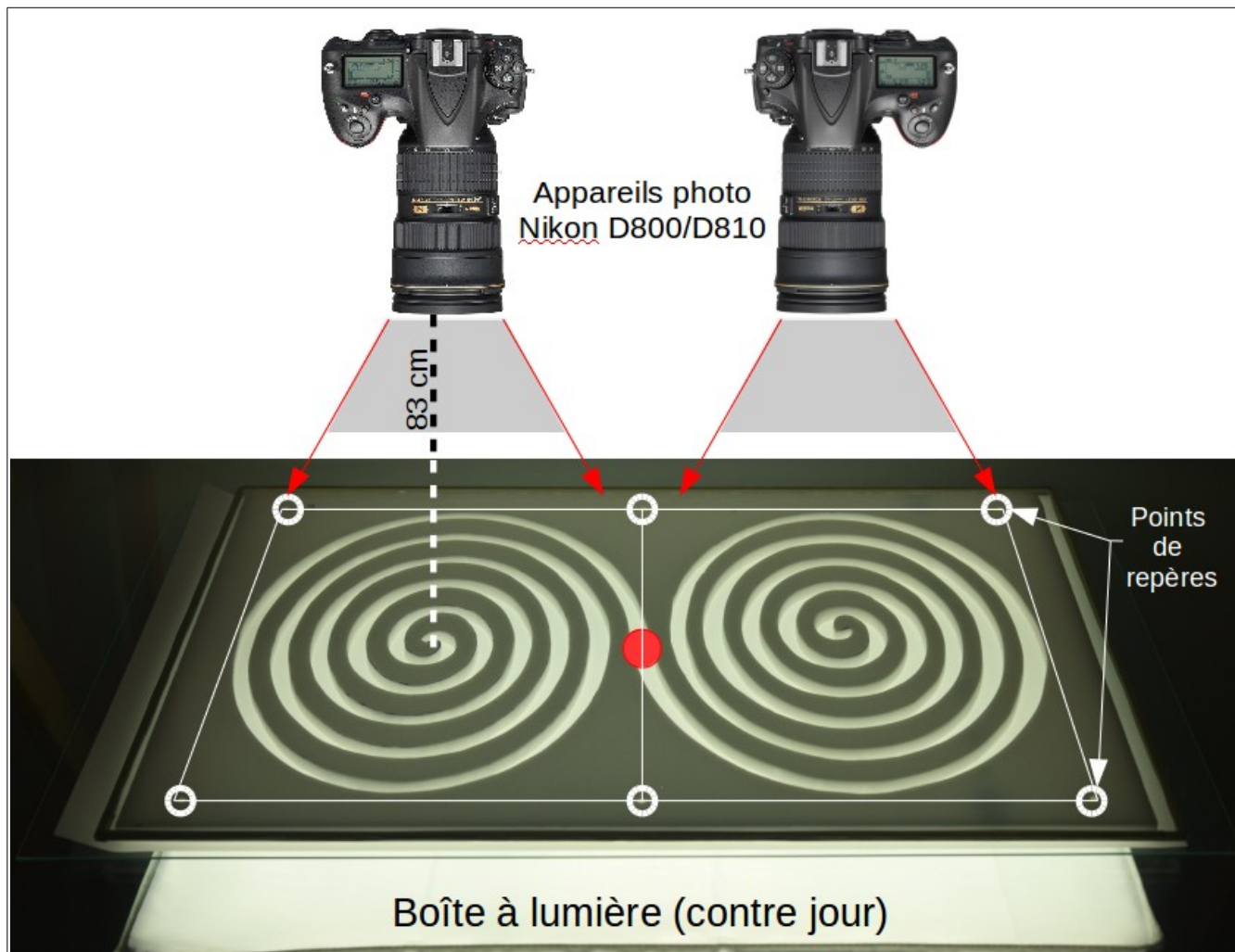


Figure 11 : Schématisation du dispositif en double spirale. Le tunnel creusé mesure en tout 6 mètres de long. Le point rouge au centre représente le point de lâcher des individus. 2 appareils photos sont nécessaires pour photographier la totalité de la spirale. Les 6 points de repères sur le polystyrène permettent à la fois de vérifier que la totalité de la spirale est bien photographier et servira pour le traitement des images (rognage et calcul du squelette de la spirale)

3.3. Analyse des images :

Pour être analysées les images sont converties en format TIFF RGB (Red Green Blue) 8 bit, plus volumineux que le format NEF, via l'utilisation du logiciel « Darktable ». Il s'agit d'un format universel d'images qui, contrairement au format JPEG, ne dégrade en rien l'image. Ce format est ainsi idéal lors d'analyses d'images à effectuer et utilisable sur l'ensemble des logiciels de traitement d'images. Le format NEF est trop brut, il correspond à l'image tel qu'obtenu sur le capteur de l'appareil photo avant dématricage (décomposition des pixels en trois couleurs : Red, Green, Blue). Grâce aux points de repères présents sur le dispositif, toutes les images de chaque réplicat sont rognées au niveau de ces points de repères pour éviter que la zone de chevauchement entre les deux appareils pour un réplicat donné ne soit analysée deux fois. Dans le logiciel ImageJ, il est possible de repérer automatiquement ces points de repères sur les images, de créer une sélection à conserver (contenant la moitié de la double spirale) et de rogner le reste.

Avant d'analyser les images, l'espace de couleur est modifié. L'analyse s'effectue sur des images HSB (Hue Saturation Brightness), plus précisément sur la combinaison des parties saturation et Brightness pour obtenir une analyse plus précise que simplement la partie Brightness généralement utilisé sur les images RGB. Chaque pixel est défini selon trois paramètres : la teinte (couleur), la saturation (intensité de la couleur) et la luminosité (brightness : quantité de lumière de l'image). Comme pour la calibration d'une macro à l'aide de CODICOUNT explicité dans la partie précédente, nous avons effectué une LDA dans le logiciel R pour essayer d'optimiser la combinaison des différents paramètres des deux espaces colorimétriques RGB et HSB. Le seuillage d'une image consiste à séparer d'un côté les pixels « sombres » et de l'autre les pixels « clairs » comme décrit dans la figure 3 de l'approche précédente. Pour cela, l'image doit être composée de pixel n'ayant qu'une valeur. Les images doivent être transformées en niveaux d'intensité de gris pour effectuer le seuillage qui ne différenciera les pixels plus que par leur intensité de gris (de 0 à 255). Cela est nécessaire pour pouvoir être seuillée et ainsi effectuer l'analyse de particules (condition de ce type d'analyse). Il s'est avéré que les différences d'intensités de gris entre les trichogrammes (foncés) et le fond du dispositif (clair) était plus grande en combinant les canaux saturation et luminosité.

3.3.1. Identification de la zone à analyser :

Sur une photo, on observe une arène (de forme spiralaire) et une partie externe à l'arène qui ne contient pas d'éléments intéressant pour l'analyse. La première étape va donc être de repérer la zone d'intérêt. L'avantage de prendre des photos dans une pièce sombre avec un éclairage à contre jour c'est que la zone plus claire sur l'image correspond à l'arène. En utilisant une méthode de seuillage de particule en fonction de l'intensité lumineuse on peut segmenter les zones sombres des zones claires. Une analyse de particules dans ImageJ peut être aussi précisée en fonction de la taille et la forme des particules que l'on souhaite retenir. Comme une arène correspond à une grande surface, il est facile de la localiser lors de cette analyse. On peut ensuite concentrer l'analyse des images sur cette zone d'intérêt. En effet, d'une image à l'autre, les valeurs des intensités des pixels peuvent varier et générer du bruit. Le fait d'identifier au préalable la zone à analyser vise aussi à réduire le temps de l'analyse. Les calculs sur les images ne seront effectués que dans cette zone qui possède une taille forcément réduite par rapport à l'image entière. Par ailleurs cela aboutit à une différence bimodale entre les trichogramme (foncés) et le fond de la spirale (clair).

3.3.2. Importation d'une séquence d'images :

Après avoir identifié la zone d'intérêt propre à chaque réplicat (la position de cette zone ne change pas pour un réplicat donné, l'appareil reste fixe), on importe une séquence d'images dans ImageJ qui sera analysée. La taille des images et la mémoire qu'elles occupent ne permet d'importer la totalité des images

d'un réplikat. La longueur de la séquence d'images à importer dépend de la mémoire vive maximale utilisée par ImageJ. Dans notre cas d'étude, j'importais 60 images pour une mémoire vive de 11 Go.

3.3.3. Calcul de l'arrière plan :

Pour analyser les particules d'une image, le principe est celui de la soustraction de deux images (comme expliqué dans le principe de la méthode). Pour cela il faut générer une image de fond, un arrière plan, qui ne contiendra aucun éléments n'apparaissant qu'une fois. À partir de plusieurs images prises d'un appareil fixe, on calcule et génère une image arrière plan. Pour cela on utilise la fonction « Z project ... » dans le menu « Stack » d'ImageJ. On va générer une image qui pour la position de chaque pixel va conserver la valeur du pixel la plus faible (projection = Min Intensity). Cet image correspondra à l'arrière plan d'une sous-séquence d'images de longueur choisie. Cet arrière plan peut changer légèrement pendant les heures d'expériences. Il est nécessaire d'en calculer un pour chaque image du réplikat. Pour rendre cela automatique, on exécute une fenêtre glissante sur la séquence d'images d'une largeur de 17 images (correspondant à 17 minutes de l'expérience dans le cas d'un intervalle de temps d'une minute entre chaque photo). Pour chaque sous-séquence d'images, l'arrière plan est calculé pour l'image positionnée au centre de cette sous-séquence. Cela permet d'utiliser les informations de positions à la fois antérieures et postérieures à l'image centrale. Une sous-séquence trop petite ferait disparaître des individus qui ne bougent pas pendant quelques minutes dans l'arrière plan et une sous-séquence trop grande serait moins précises car de légers décalages dans l'arrière plan engendrerait une quantité de détections de particules qui ne sont pas des trichogrammes trop importante. À chaque arrière plan généré, la fenêtre se décale d'une image, avançant ainsi dans la séquence du réplikat.

3.3.4. L'analyse de particules :

L'objectif est de faire une analyse automatisée des séquences d'images quelle que soit la longueur de la séquence (plusieurs centaines d'images). Le logiciel « ImageJ » est un bon outil pour réaliser cet objectif. Le principe consiste à soustraire d'une image un arrière plan pour n'en retenir que les éléments différents entre les deux images soustraites. Dans l'étape précédente, nous avons calculé l'arrière plan de chaque image du réplikat, la soustraction s'effectue entre l'image d'intérêt et son arrière plan correspondant. Les éléments différents sont appelés « particules ». On centre cette analyse dans la zone d'intérêt (spirale) identifiée au préalable. Ensuite, un seuillage (segmentation) est réalisé automatiquement en utilisant la fonction « Intermode ». Cette fonction suppose que la distribution des intensités de gris de l'image présente deux pics d'intensités différentes (dans notre cas le fond est clair et les trichogrammes sont foncés). Avant de déterminer l'intensité seuil pour la segmentation, un lissage de la distribution est effectuée une moyenne des intensités maximales des deux pics correspondra à l'intensité seuil :

- pour chaque paire image / arrière plan : Process → Subtract Background
- lancer le seuillage : menu Image → Adjust → Threshold... → Type : Intermode (ne pas cliquer sur « apply »)
- lancer l'analyse de particules : Analyze → Analyzes Particles ...

Une fois les particules repérées, différents facteurs sont mesurés pour chacune d'entre elles : leurs coordonnées sur l'image (X,Y), la surface qu'elles occupent sur l'image (Area), leur niveau de gris moyen (Mean), différents paramètres de formes (Circularity, Round, AR, Solidity), l'image sur laquelle elles ont été identifiées (Slice) ainsi que leur distance au bord de la zone d'intérêt (D). Cette étape d'analyse de particule est effectuée à chacune des images d'un réplicat, les données récoltées sont ajoutées dans une table au fur et à mesure des images analysées. Ces différents paramètres vont nous permettre de filtrer les particules et de discriminer celles qui ne sont pas des individus en utilisant essentiellement trois de ces paramètres : la surface (Area), la distance au bord (D) ainsi que la redondance des coordonnées (X,Y). En effet il est très peu probable qu'entre deux images très éloignées (d'une durée supérieure à la fenêtre de calcul de l'arrière plan), deux particules se situent exactement au même endroit tout en étant des individus. Nous disposons alors pour chaque réplicat, d'une table de données intégrant les informations nécessaires de positions des particules filtrées détectées.

3.3.5. Calcul des distances linéaires le long de la spirale :

Afin de mesurer à quelle distance du point de lâcher des individus, se situent les particules détectées, une étape supplémentaire est nécessaire. Il faut obtenir le « squelette » de la spirale. Il s'agit d'une représentation en courbe de la forme de la spirale (figure 12). Cette courbe est créée en prenant les pixels équidistants aux bords du tunnel de la spirale. Pour cela dans ImageJ :

- Seuillage et repérage de la spirale (comme pour l'identification de la zone à analyser)
- Appliquer le seuillage (« Apply ») pour obtenir une image binaire
- Création du squelette de la spirale : Process → Binary → Skeletonize

Une fois que le squelette est généré, l'image est rognée au niveau des points de repères du polystyrène pour éviter des doublons d'analyse.

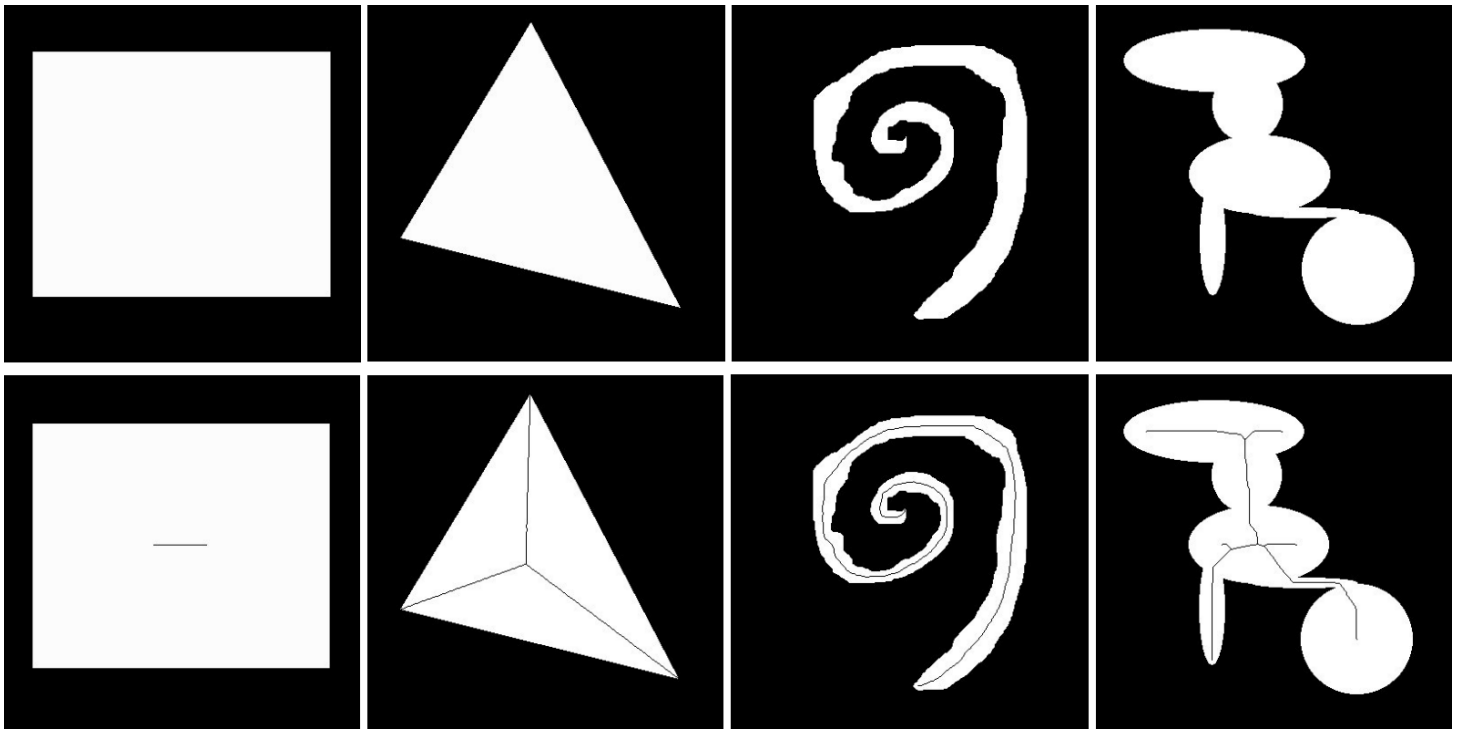


Figure 12 : trois exemples de constructions de squelette. Le squelette d'un rectangle est un segment, celui d'un triangle est trois segments dont chacun part d'un des trois sommets et se rejoignent au centre du triangle à équidistance des trois côtés, celui d'une spirale est une courbe tracée au centre de celle-ci et celui d'une forme complexe abstraite est arbusculaire et se dessine toujours à équidistance des bords de l'objet.

La forme de ce squelette est très complexe et non régulière. Tel quel, il n'est pas possible de le linéariser pour obtenir sa longueur et les distances au points de lâcher à chaque position le long du squelette. Il a fallu mettre au point une méthode pour pouvoir effectuer cette étape. Dans ImageJ, il est possible de réaliser un quadrillage de l'image de façon très fine (avec des mailles d'une dizaine de pixel). En appliquant ce quadrillage sur l'image, cela la modifie et découpe le squelette en environ 2000 particules très proches les unes des autres. Il faut d'abord repérer la particule du squelette la plus proche du bord de l'image car elle correspond à la particule la plus proche du point de lâcher des individus. Les outils d'ImageJ (filtres, analyses de particules, etc.) fonctionnent en balayant l'image de gauche à droite et de haut en bas. Afin de s'assurer de trouver la première particule du squelette, une vérification de l'orientation de l'image est effectuée pour que le point de départ du squelette se situe près du bord haut de l'image. Une fois que cette première particule est repérée, le squelette est redessiné (avec des segments) en repérant la particule suivante la plus proche. À chaque fois qu'un segment est rajouté, sa longueur est additionnée à la distance de la particule précédente au point de lâcher. Le squelette est alors redessiné par une suite de segments de quelques pixels jusqu'à son extrémité. Plus la maille du quadrillage initial est petite plus le squelette sera découpé en grand nombre de particules, plus l'approximation des distances au point de lâcher en redessinant les segments entre chaque particule sera bonne. On obtient une table contenant les coordonnées de chaque particule du squelette (environ 2000 particules par squelette) et leur distance (en pixel) au point de lâcher.

3.3.6. Projection orthogonale des trichogrammes sur le squelette de la spirale

Nous disposons à ce stade d'une table contenant les coordonnées des trichogrammes et d'une table contenant les coordonnées des particules du squelette. En chargeant la table des particules de trichogrammes d'un répliat et celle du squelette de la spirale correspondant dans le logiciel R, nous pouvons calculer la distance au point de lâcher de chaque particule détectées par projection orthogonale sur le squelette. Pour chaque particule repérée, on calcule la distance dans le plan entre cette particule et toutes celles du squelette, selon la formule suivante :

$$AB^2 = |x_A - x_{B(i)}|^2 + |y_A - y_{B(i)}|^2 \quad (2)$$

avec (x_A, y_A) les coordonnées cartésiennes du trichogrammes

et $(x_{B(i)}, y_{B(i)})$ les coordonnées cartésiennes de la particule i du squelette

Pour chaque trichogramme, on obtient ainsi un vecteur contenant les distances entre cette particule et toutes celles du squelette. En prenant la distance minimum calculée dans ce vecteur, on retrouve la particule du squelette la plus proche et ainsi la distance de cette particule au point de lâcher. Cet algorithme approxime bien une projection orthogonale des particules de trichogramme sur le squelette. Dans le cas où deux particules du squelette sont équidistantes à la particule de trichogramme, on calcule la distance moyenne au point de lâcher entre ces deux particules du squelette.

Certaines erreurs sont possibles à ce stade. En effet il existe une zone sur l'image au niveau du point de lâcher qui est très sensible à cette étape. Toutes les particules identifiées comme étant positionnées avant le point de lâcher (de l'autre côté de la demi-spirale) doivent être considérées comme appartenant à l'autre côté de la spirale. Pour cela, une prolongation temporaire du squelette est effectuée afin de projeter convenablement ces particules et d'avoir leur distance au point de lâcher.

Une fois cette étape réalisée, nous disposons d'une table complète par répliat contenant chaque particule identifiée avec leurs coordonnées (X,Y), leur distance au point de lâcher (en pixel) qu'il faudra convertir en distance métrique (161.9 pixels sur l'image correspond à 1 centimètre), ainsi que tous les paramètres déjà mesurés lors de l'analyse de particules. Un assemblage de la table de chaque répliat (en gardant l'identité de celui-ci ainsi que la modalité testée engendrera une table complète et unique pour les analyses dans le logiciel R.

3.4. Fiabilité de la méthode :

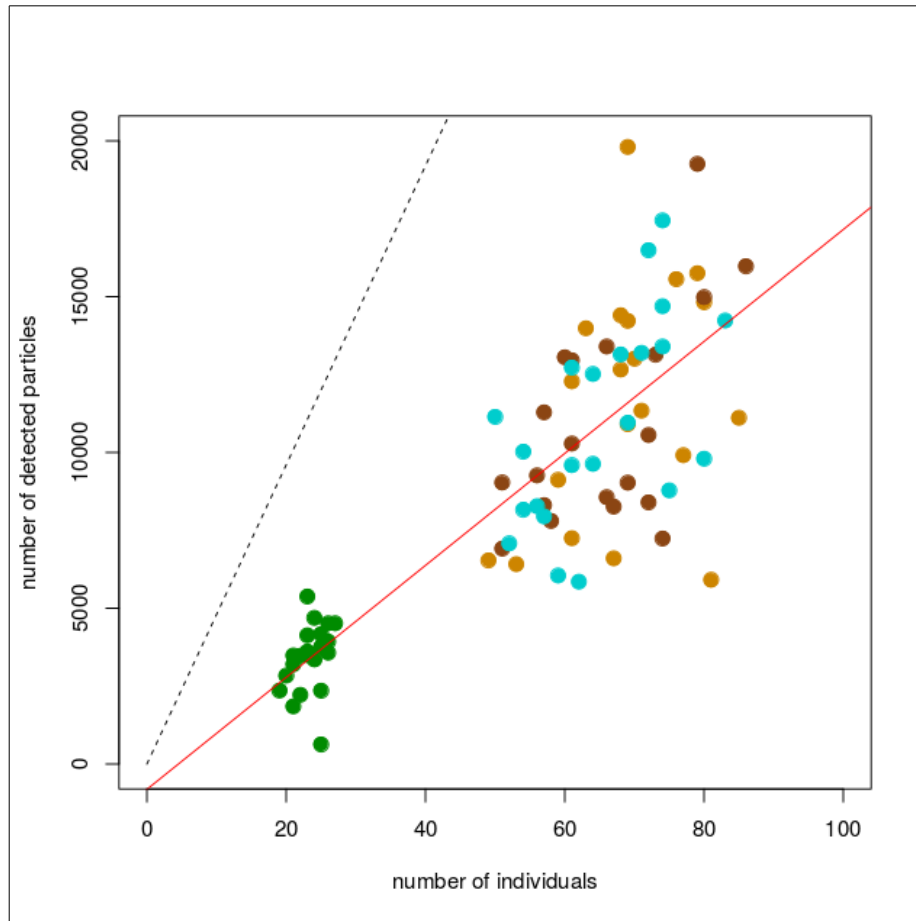


Figure 13 : Régression linéaire du nombre total de détections retenues par réplicat en fonction du nombre d'individus introduits dans le dispositif. Les couleurs représentent les quatre différents traitements de l'étude décrite en section V. La ligne en pointiller **noir** représente le cas où la totalité des individus serait détectée à chaque instant, la droite **rouge** représente la régression du nombre d'individus effectivement repérés (p-value << 0.001 et $R^2 = 0.67$).

Pour tester la fiabilité de cette méthode, nous avons comparé le nombre total de détections par réplicat en fonction du nombre d'individus introduits par réplicat (figure 13). Dans l'expérience qui sera décrite en section V., quatre traitements ont été testés. Le nombre d'individus introduits initialement a été enregistré et la durée de l'expérience ainsi que l'intervalle de temps entre deux photos restaient constants entre chaque réplicat. Il est alors possible de calculer le nombre maximal de détections qu'il est possible d'avoir dans le cas où tous les individus sont repérés sur chaque photo. Par exemple, pour un réplicat avec 20 individus, dans le cas où ces 20 individus sont repérés à chaque instant sur les 8 heures d'expériences, cela représenterait un maximum de 9600 particules (20×480) détectés. Le taux réel de détection est évidemment plus faible. Environ 32 % des individus sont repérés à chaque instant sur les images, après élimination des faux positifs. Ce taux de détection est en partie expliqué par la présence de zones aveugles (angles morts) sur les images. Certaines zones (contre les bords du dispositif) ne sont pas visibles à l'image mais sont accessibles aux individus. Une autre explication est l'absence de mouvement d'individus visibles à l'image. En effet, si un individu ne se déplace plus pendant suffisamment longtemps (dépend de la fenêtre de temps de calcul de l'arrière plan, ici au moins 17 minutes), lors du calcul de l'arrière plan, l'individu sera considéré comme faisant partie de l'arrière plan et ne sera pas détecté. Malgré la présence d'angles morts et la possibilité d'absence de

mouvement d'individus, un taux de 32 % de détections à chaque instant est convaincant pour affirmer la fiabilité de cette méthode.

3.5. Limites et améliorations de la méthode :

Cette méthode d'analyse d'images nécessite une grande capacité de stockage des images ainsi qu'un temps d'analyse relativement long. Une vidéo de 8 heures (25 fps et 2 millions de pixels) pèserait légèrement plus que la prise de photos haute résolution (36 millions de pixels) toutes les minutes (48 Go pour une vidéo contre 36 Go pour des photos soit 12 Go de plus par appareil photo par réplicat). Néanmoins, on disposerait de d'avantage d'images, mais d'une qualité tellement réduite qu'il serait impossible de localiser les trichogrammes ou les œufs sur de telles vidéos. Du fait de l'utilisation d'images de haute qualité, la distance entre l'objectif et les individus nécessaire pour suivre des organismes, comme les trichogrammes, de petite taille peut être ainsi augmentée impliquant une surface de suivi plus importante. C'est pourquoi cette méthode est très efficace pour les expérimentations de moyen à long terme (plusieurs heures de suivi) sur une grande distance.

Il est aisé de suivre un seul individu et de reconstruire son parcours par cette méthode cependant lorsque l'expérience consiste à étudier un groupe d'individus, sans identification directement visible sur les images (coloration, différences morphologiques), l'identité des individus d'une image à l'autre est quasi systématiquement perdue, en raison du grand intervalle de temps entre deux images (30 secondes ou plus). Les études comportementales à long terme individu-centrées, ainsi que les phénomènes de distribution dans l'espace de groupes d'individus à long terme peuvent néanmoins être étudiés par l'utilisation de cette méthode. Dans mon cas, l'étude (voir section 5) portant sur la dynamique d'un ensemble d'individus, conserver l'identité de chaque individu d'une image à l'autre n'est pas une nécessité forte, puisqu'il s'agit d'une étude de « redistribution de population » (sensu Turchin 1998). Outre la perte de l'identité des individus, d'autres limitations sont à mentionner. Lorsqu'un nombre d'individus (supérieur ou égal à 2) se situe au même endroit sur l'image, la segmentation (*i.e.* la séparation) des individus entre eux est très limitée. Il peut n'en résulter qu'une seule (grosse) particule composée de plusieurs individus. Les limites de cette méthode ont bien été identifiées par McKenna et ses collaborateurs en 2000 (McKenna et al. 2000) lors de leur tracking sur des sujets humains explicitant notamment ce problème de segmentation de particules. Cependant dans le cadre de notre étude, il est très rare que plusieurs individus se retrouvent au même endroit lors de la prise de la photo, limitant ainsi les erreurs. Pour cette raison il n'a, pour l'heure, pas été cherché d'ajouter à la méthode de module dédié à la résolution de ce genre de problèmes. Actuellement écrite en langage macro, la méthode pourrait être améliorée via l'écriture sous forme de plugin en JAVA (comme CODICOUNT dans la méthode précédente), ce qui la rendrait plus rapide. Remarquons que cette méthode n'est pas strictement limitée au trichogramme et la caractérisation phénotypique du mouvement d'autres modèles biologiques pourrait aussi être abordée de cette manière.

II.4. Troisième approche : tracking haute fréquence/basse résolution d'un groupe d'individus

Méthode développée en collaboration avec V. Calcagno

4.1. Principe de la méthode :

La caractérisation phénotypique de modèles biologiques comme des auxiliaires de culture apporte des outils de sélection des souches les plus performantes ou adaptées pour le développement de programmes de lutte biologique. Plus les traits biologiques (génétique et phénotypique) sont caractérisés, plus la sélection des souches sera raisonnée. Dans ce but, nous avons développé une méthode de phénotypage à « haut débit » pour caractériser les taux d'activité, vitesses et trajectoires d'exploration des différentes souches de trichogrammes disponibles au Centre de Ressources Biologiques (CRB) de l'institut Sophia Agrobiotech. Le principe, éprouvé de longue date par les études de comportement (Wehrhahn et al. 1982, Noldus et al. 1989) est de filmer des individus introduits dans une arène en environnement contrôlé. Néanmoins, afin de permettre un haut-débit de caractérisation, l'arène utilisée est sensiblement plus grande que celles utilisées classiquement pour les trichogrammes, et de nombreux individus seront introduits simultanément, là où classiquement ces expériences sont conduites sur des individus isolés (Noldus et al. 2002, Grieshop et al. 2010, Alves et al. 2015). En outre, la grande taille de l'arène permet de limiter les effets de bordures (trichogrammes longeant les contours de l'arène ou grimpant sur les parois), ce qui change fortement leurs trajectoires (les trichogrammes ont une forme de thigmotactisme, *i.e.* ils ont tendance à longer les arrêtes, limites d'une forme). Les individus seront suivis dans un environnement vide (sans hôtes) pendant 5 à 10 minutes. Pour cela, des vidéos (25 fps, 2 millions de pixels) sont utilisées. Contrairement à la méthode précédente où des photos hautes résolutions (36 millions de pixels) étaient prises à intervalle de temps régulier sur des dispositifs plus grands, ici la proximité de l'appareil au dispositif (nécessité d'une résolution plus faible), la durée de chaque enregistrement (quelques minutes) et la précision nécessaire des mesures de vitesses et trajectoires sont plus en adéquation avec l'utilisation de la vidéo. Les vidéos sont ensuite analysées *via* un logiciel de tracking développé pour les études chez la drosophile (Branson et al. 2009), appelé Ctrax, et qui sera adapté à notre modèle biologique, le trichogramme. En effet, des étapes de calibration du logiciel lors de l'analyse des vidéos sont effectuées pour ajuster les paramètres de formes, intensité lumineuse, taille des individus, etc. Cette analyse permet le suivi simultané de plusieurs individus en conservant (dans une certaine mesure) leur identité (contrairement à la méthode précédente sur ImageJ) (Reiser 2009). Il est alors possible de reconstruire les trajectoires de chaque individu et de calculer leurs vitesses, la sinuosité de leur trajectoire, voire d'observer les interactions entre individus.

D'autres études ont eu recours à Ctrax pour analyser le mouvement d'autres modèles biologiques, au cours des années précédentes, comme la Drosophile bien sûr (Schneider & Levine 2014), les fourmis (Neves

& Pie 2012), la cochenille (Benderet al. 2011]) ou encore le poisson, comme *Aphanius dispar* (Barry 2012). Ce logiciel a également été la base d'autres versions spécifiques à certaines problématiques et, comme pour ToxTrac par exemple, procure des mesures complémentaires de vitesse, de forme de modèle biologique, pour les méthodes de tracking (Rodriguez et al. 2017).

4.2. Acquisition des vidéos :

Les vidéos sont obtenues à partir d'un appareil nikon D810 en format « .mov » et d'une qualité d'images de 2 millions de pixels avec 25 images par seconde. Les conditions expérimentales sont une lumière à contre jour, un dispositif en deux dimensions et une mise au point sur cette surface. Plusieurs individus sont introduits simultanément dans le dispositif et filmés pendant 5 minutes. Il n'y a pas de contrôle par ordinateur car la nécessité de garder le capteur ouvert en permanence ainsi que la fonction Live View (LV) constamment activée ne sont pas supportées par le logiciel « Digicam control 2 ». Les 10 premières secondes de chaque vidéo ne seront pas analysées en raison des vibrations résultantes de l'activation de l'enregistrement vidéo. Le format des vidéos sera ensuite converti en format « .avi » pour pouvoir être analysé.

4.3. Utilisation du logiciel Ctrax :

La plasticité de ce logiciel ainsi que ses interfaces avec une succession intuitive des instructions permet une analyse de vidéos relativement facile. Ce logiciel en accès ouvert sur internet (<http://ctrax.sourceforge.net/install.html#download>) peut être installé sous Windows, Linux et Mac.



Pour une meilleure analyse, les vidéos doivent contenir un arrière plan homogène ainsi qu'un contraste suffisant entre celui-ci et les individus. On importe la vidéo (format « .avi ») dans le logiciel qui génère automatiquement un fichier d'annotation (pour enregistrer les paramètres qui vont être calibrés pour l'analyse de cette vidéo) et transforme les images de la vidéos en 8 bits Gray (en nuances de gris). En effet, l'analyse d'une vidéo nécessite plusieurs étapes pour la paramétrer au mieux, si l'analyse est stoppée avant la fin, il sera possible de la reprendre à partir de cette coupure grâce au fichier d'annotations. Ce logiciel ayant été mis au point sur des drosophiles (modèle biologique commun et plus grand que le trichogramme) (Simon & Dickinson 2010), il existe une option de « tracking » par défaut qui permet d'analyser rapidement une séquence sans optimiser les paramètres. Cette fonctionnalité par défaut n'est pas la plus adéquate pour notre étude sur les trichogrammes et il est nécessaire de calibrer l'analyse étape par étape.

Le principe de reconstruction de la dynamique et du mouvement des individus filmés est exactement le même que pour la méthode précédente : la soustraction d'arrière plan à chaque image. La différence est que cette méthode de tracking permet de garder l'identité des individus à court terme par interpolation entre la position calculée d'un individu à la position la plus proche de l'individu calculée sur l'image précédente.

4.3.1. L'arrière plan (background)

La première étape est de calculer l'arrière plan pour toute la durée de la vidéo. Il y a différents paramètres à justifier tels que le choix de l'algorithme pour le calcul en considérant le centre de l'image comme la valeur moyenne ou médiane de la couleur de l'arrière plan. Deuxièmement, le choix du nombre d'images (frame) : la vidéo étant une succession d'images prises à haute fréquence selon un plan fixe, tous les éléments immobiles d'une image à l'autre rentreront dans la composition de l'arrière plan. Des variations existent entre le début et la fin d'une vidéo, le mécanisme de calcul de l'arrière plan est le même que dans la méthode précédente. Une fenêtre glissante permet d'ajuster aux différents moments de la vidéo le calcul de l'arrière plan. Pour cela, il existe un paramètre qui permet d'ajuster le nombre d'images considérées pour les calculs des arrières plans ou plus précisément du nombre de découpes de la séquence totale d'images en spécifiant la valeur de la première et de la dernière image à inclure dans le calcul. Plus le nombre de découpes est important plus la précision de l'arrière plan augmente au détriment du temps de calcul.

4.3.2. Le seuillage (threshold)

Cette étape est essentielle dans la localisation des individus. Chaque élément d'une image (particule) est composée de pixels possédant une valeur d'intensité de gris qui leur est propre entre 0 (noir) et 255 (blanc) pour une image 8 bits. Le seuillage permet de fixer une fourchette de valeurs d'intensité de gris correspondant aux valeurs des trichogrammes sur l'image. Si un pixel a une valeur d'intensité de gris qui n'est pas comprise entre les valeurs supérieures et inférieures de cette fourchette alors il sera considéré comme appartenant à l'arrière plan. Les variations d'intensité lumineuse ainsi que les mouvements des trichogrammes d'une image à l'autre impliquent des variations d'intensité de gris sur les pixels des contours des trichogrammes. En spécifiant cette fourchette, on corrige ces variations. Ainsi, cette étape permet de repérer/discriminer des particules (amas de pixels) de l'arrière plan en fonction de leur intensité de gris (figure 14A). En fonction de la qualité de l'acquisition de la vidéo, il peut y avoir des zones où le seuillage est plus approximatif. Il est possible de définir des zones où des corrections post-analyse sur le seuillage pourront être effectuées.

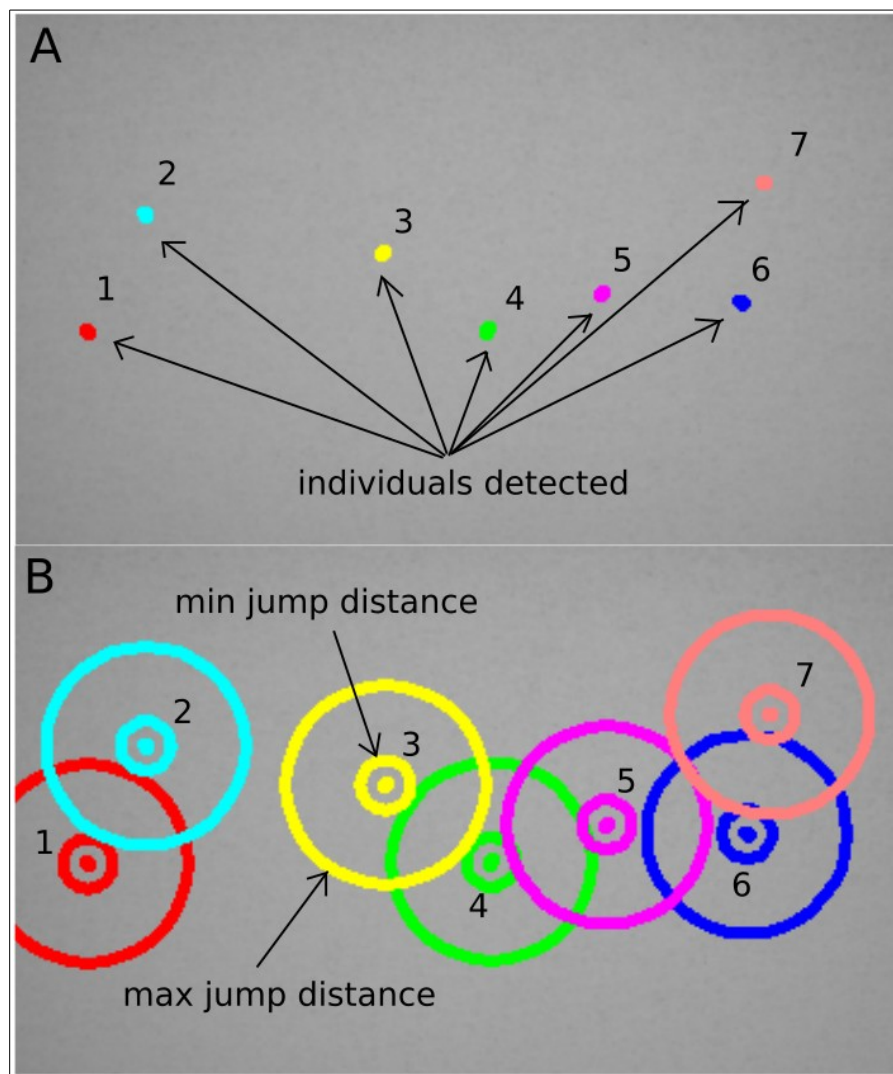


Figure 14 : analyse de la vidéo dans Ctrax en format 8 bit des images (niveaux de gris). Après calcul de l'arrière plan (gris) et seuillage, le logiciel est capable de repérer automatiquement les objets mobiles d'une image à l'autre (A). Pour plus de précisions, le renseignement d'informations sur la forme, la taille et le comportement des individus précise l'analyse (B).

4.3.3. Calibration de l'analyse des individus (adaptation au modèle biologique)

Cette partie du paramétrage évalue la forme géométrique du modèle biologique (triangulaire pour les drosophiles, ellipsoïdale pour les trichogrammes). De la même manière que pour le calcul de l'arrière plan, ce réglage peut se calculer automatiquement sur des séquences d'images.

Les paramètres de mouvement (motion) présentent des valeurs par défauts mais peuvent être modifiés manuellement en fonction des connaissances *a priori* sur le comportement du modèle biologique. Par exemple les distances de déplacement possibles entre 2 images, appelés « sauts » peuvent être calibrées pour le trichogramme (figure 14B). Lors du « tracking », le renseignement de ces distances limite les pertes et confusion d'identité des individus. En plus de la forme et du mouvement des individus, il est également préférable d'indiquer quelques conditions expérimentales comme : le nombre d'individus à repérer au maximum, le nombre d'individus qu'il est possible de détecter au même endroit au même moment ainsi que la taille (surface en pixel) de particules à ignorer (*i.e.* qui ne sont pas avec certitude des individus).

4.3.4. Le tracking et l'obtention des données

Une fois que tous les paramètres sont bien calibrés, il suffit de lancer le « tracking ». Après quoi, il est possible d'exporter les données sous forme de tables au format « .csv » et « .mat ». Ces tables contiennent les informations sur chaque individu sur chacune des images de la vidéo. Les données récoltées sont : l'identité de l'individu, ses coordonnées (X,Y), le temps auquel il a été détecté (en seconde), sa longueur (en pixel), sa largeur (en pixel) ainsi que son angle d'orientation par rapport à la verticale (en radian). Outre une table de données, le logiciel propose d'autres fichiers à exporter comme la vidéo annotée (en format « .avi ») représentant les différentes trajectoires en temps réel des individus repérés, un diagnostic qui reprend les différents éléments de la vidéo (le nombre d'individus détectés, le nombre d'interactions entre eux, les erreurs potentielles, etc.) ainsi que le fichier d'annotations de l'analyse. Ce dernier est indispensable pour pouvoir analyser automatiquement assez rapidement l'ensemble des vidéos filmées dans les mêmes conditions. En effet, un script de quelques lignes lancé dans le terminal de l'ordinateur bien renseigné en utilisant le fichier d'annotation évite de refaire toutes ces étapes d'analyse manuellement et permet un gain de temps puisqu'automatique. Quelques erreurs peuvent survenir si les paramètres des vidéos diffèrent : nombre d'individus à repérer trop différent, conditions de l'acquisition de vidéo différentes, durée de la vidéo différente, ... Il faut alors reprendre les différentes étapes pour générer un autre fichier d'annotations adapté aux nouvelles conditions de vidéo.

À une vidéo correspond une table de données. Nous utiliserons les fichiers matlab (« .mat ») pour effectuer les analyses de ces données car ils contiennent plus d'informations sur la vidéo que les fichiers textes (« .csv »), notamment les instants où les individus sont détectés. En utilisant le package R.matlab, il est possible de charger ces tables dans R et de les assembler pour n'obtenir qu'une seule table de données avec les informations sur les espèces, la souche, le réplicat, etc. pour conserver l'identité de chaque réplicat. Disposant des informations de positions sur chaque individu repéré, nous pourrions calculer des vitesses de déplacement ainsi que des coefficients de tortuosité des trajectoires pour caractériser le mouvement de souches et d'espèces rapidement (package TrajR : McLean et al. 2018).

4.4. Fiabilité de la méthode :

Il est possible de contrôler la qualité de ces analyses notamment en comparant la quantité de détections réellement observée avec celle qui devrait être obtenue si tous les individus étaient détectés sur chacune des images (ici 25 images par seconde). On observe globalement, environ 45 % des individus (figure 15A) ce qui est plutôt un bon score compte tenu du fait que les individus peuvent sortir du cadre, s'arrêter et ainsi ne plus être détectés. Par ailleurs, on peut aussi contrôler la durée moyenne d'une séquence de détections d'un individu (figure 15B). Dans notre cas, les séquences de détections d'un individu sont

principalement entre 8 secondes et 20 secondes ce qui est suffisant pour calculer des vitesses et étudier des trajectoires.

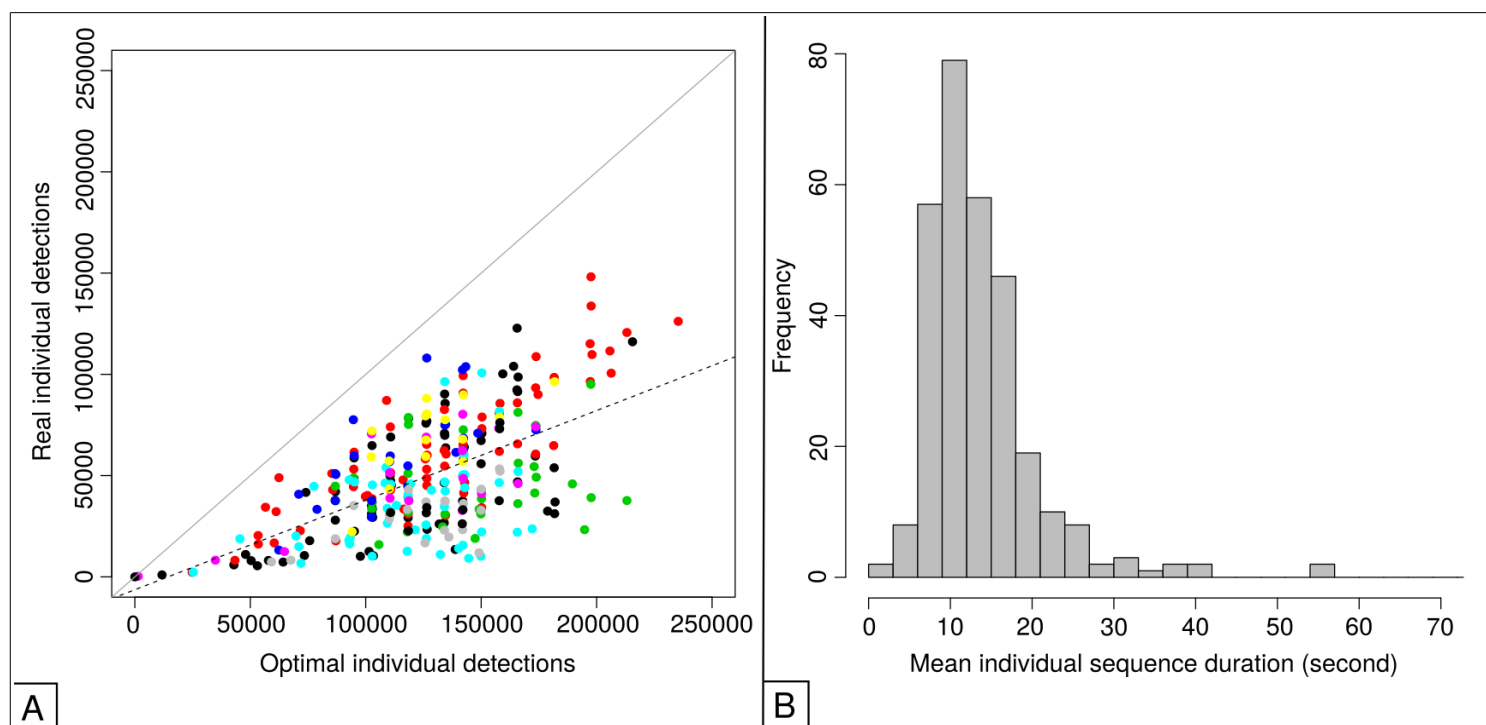


Figure 15 : Corrélation entre le nombre de détections réellement observée et le nombre maximum potentiellement observable (A). Une régression linéaire (droite en pointillés) a été effectuée ($p < 0.001$ et $R^2 = 0.369$). Chaque couleur correspond à une espèce différente, la droite grise est une droite de pente égale à 1. Histogramme de la durée moyenne (en seconde) par réplicat d'une séquence individuelle de détections (B). Les données proviennent de l'étude décrite en section IV.

4.5. Limites et améliorations de la méthode :

Cette méthode de suivi d'individus est efficace dans la simple tâche de mesurer des vitesses et des trajectoires à court terme (perte d'identité, trajectoires fragmentées) et permet une caractérisation phénotypique du mouvement d'organisme rapide, très pratique pour du phénotypage à haut-débit. La possibilité de suivre plusieurs individus et d'obtenir une grande quantité de données (position, vitesse, trajectoire) à haute fréquence en quelques minutes est un net avantage comparé à la méthode précédente. En revanche la limite majeure de cette approche est la caractérisation de l'absence de mouvement. En effet la perte d'identité d'un individu peut être due à différents événements : sortie du cadre, saut trop important, contact entre différents individus, arrêt du mouvement. L'absence du mouvement est aussi un facteur important dans la quantification de l'activité d'un organisme et cette approche ne permet pas directement de l'obtenir. La création du fichier d'annotation d'une vidéo s'effectue lors de l'analyse complète de celle-ci. Une quantité totale de 310 vidéos de 5 minutes (155 Go) ont été analysées et les analyser manuellement une par une aurait pris plus de 180 heures consécutives. Le fait de pouvoir lancer ces analyses automatiquement a permis de réaliser ces 180 heures d'analyse sans besoin d'une présence physique.

II.5. Comparaison des trois méthodes :

Facteurs de comparaison	Première approche (comptage des œufs)	Deuxième approche (suivi d'une population)	Troisième approche (tracking de groupes d'individus)
Logiciel	ImageJ / R	ImageJ / R	Ctrax / R
Principe	Dénombrement automatique des œufs hôtes sains et parasites en fonction de leur couleur	- Repérage des individus sur chaque image pour observer une dynamique de propagation	- Repérage des individus sur chaque image pour reconstruire les trajectoires individuelles
Échelle spatiale	$\geq 2000 \text{ cm}^2$ par caméra (possibilité de traiter de nombreux réplicats en parallèle sur la même image)	Environ 1500 cm^2 par caméra	Environ 200 cm^2 par caméra
Échelle temporelle	Plusieurs jours	8 heures	5 minutes
Identité des individus	Perdue (absence des individus adultes sur les images)	Conservée pour des individus très éloignés mais perdue pour les individus proches	Conservée à court terme (identité perdue lors de certains événements : sauts, sortie du cadre, contacts entre plusieurs individus)
Définition des images nécessaire	Quelques dizaines de Mégapixels (Mpx)	Au moins 36 Mpx	Quelques Mpx
Fréquence de prises de vue	1 image par jour	1 ou 2 images par minute	25 à 60 images par seconde
Type d'observation du mouvement	<u>Indirecte à long terme</u> : observation du parasitisme sur toute la durée de vie, dispersion	<u>Directe à long terme</u> : propagation dans un environnement, redistribution de population	<u>Directe à court terme</u> : caractérisation de vitesses et formes de trajectoires

Tableau 1 : Comparaison des différentes méthodes d'analyse d'images mises en œuvre.

III. Étude des réponses phototactiques et géotactiques au sein du genre *Trichogramma*

Un travail conduit en collaboration avec Guy Perez (2015-2018), Mezen Bouzaïen (2015) et Faten Ayed (2018).

III.1. Objectifs de l'étude

La caractérisation de l'orientation des insectes par rapport à la lumière ou la gravité (Jander 1963) a déjà permis de créer des outils utilisant ces critères pour lutter contre des ravageurs de manière plus efficace (Shimoda & Honda 2013) démontrant ainsi l'intérêt de ces traits phénotypiques en agronomie. L'étude de ces réponses chez différentes souches et espèces de trichogrammes provenant d'environnements et d'essences végétales différentes, permettrait d'établir un lien éventuel entre les conditions environnementales (par exemple la strate végétale sur laquelle la souche a été échantillonnée) et ces facteurs (lumière et gravité). Il a été montré par exemple chez l'aleurode des serres (*Trialeurodes vaporariorum*) que son vol était orienté vers le ciel et que la surface sur laquelle les individus se posaient préférentiellement renvoyait la lumière selon une certaine longueur d'onde (Coombe 1982). Cette étude met ainsi en lien la géotaxie et la phototaxie avec la distribution d'une espèce dans son environnement.

Chez les insectes parasitoïdes, il a déjà été identifié différentes réponses photo et géotactiques. Une géotaxie négative et une phototaxie positive ont été identifiées chez le parasitoïde oophage *Ooencyrtus kuwanai* testées de manière indépendante l'une de l'autre (Weseloh 1971). Outre l'attraction par la lumière des individus, il a également été montré un effet de l'intensité lumineuse sur l'activité de parasitisme. C'est le cas de *Brachymeria intermedia* qui a montré des performances plus élevées dans des conditions environnementales plus lumineuses (Barbosa & Frongillo 1977). Il est alors probable que la distribution des espèces de trichogrammes dans leur environnement dépende en partie de leurs préférences géotactiques et phototactiques.

Les différentes espèces de trichogrammes utilisées en lutte biologique parasitent des hôtes différents avec plus ou moins de spécificité. Comme ce sont des parasitoïdes oophages, leurs stratégies de recherche des œufs de leurs hôtes sont adaptées au comportement de ponte de leurs hôtes. Par exemple, un hôte qui pond ses œufs sur la face supérieures d'une feuille en hauteur de la plante sera plus sensible aux attaques de parasitoïdes présentant une phototaxie positive et une géotaxie négative (Watanabe et al. 2018). Nous pouvons citer l'exemple de la pyrale du maïs, *O. nubilalis*, qui pond ses œufs au niveau des deux tiers inférieurs (de faible hauteur) de la plante (Calcagno et al. 2010). Pour qu'une souche de trichogramme soit plus performante contre un ravageur de culture, il est tout indiqué de connaître la préférence de ponte de l'hôte ciblé en fonction de la lumière et de la gravité pour choisir le candidat présentant les mêmes

préférences que son hôte. Il a d'ailleurs déjà été suggéré chez le genre *Trichogramma* une certaine stratification verticale des espèces *T. minutum* et *T. pretiosum* en fonction de la structure de leur habitat (plus particulièrement de la hauteur des plantes). *T. minutum* parasitait préférentiellement les hôtes situés à une plus grande hauteur que *T. pretiosum* (Thorpe 1985). Des résultats complémentaires ont été mis en évidence sur l'espèce *T. nubilale*, avec une concentration des attaques sur les hôtes situés à mi-hauteur et dans les parties basses des plantes (Burbutis et al. 1977).

L'étude de la variabilité des préférences géotaxiques et phototaxiques au sein du genre *Trichogramma* apporterait des éléments de réponse quant à l'existence ou non d'un facteur pré-pondérant entre les deux. Une phototaxie positive (déplacement vers la source lumineuse) et une géotaxie négative (dans le sens inverse à la force de gravité) sont généralement supposées chez le trichogramme. Néanmoins, ces deux facteurs sont très rarement étudiés isolément ou quantifiés précisément. En effet, l'observation à l'œil des individus en conditions de lumière naturelle montre un déplacement vers la source lumineuse (soleil) verticalement opposé au sol. L'objectif de cette étude sera donc d'étudier la variabilité intra-spécifique et inter-spécifique des préférences géotactiques et phototactiques lors de la ponte chez *Trichogramma*, en dissociant les deux composantes ainsi que leur interaction. Il est possible qu'un des deux facteurs prédomine sur l'orientation des individus. Pour tester cette hypothèse, les deux facteurs doivent être étudiés séparément et aussi ensemble.

III.2. Matériel et Méthodes :

2.1. Matériel biologique

Les souches et espèces de trichogrammes ont été sélectionnées de manière à obtenir la plus grande diversité en strate végétale et provenance géographique ainsi qu'en fonction de leur disponibilité au CRB. Pour réaliser cette étude, un ensemble de 18 souches provenant de six espèces différentes ont été testées (tableau 2), toutes issues des souches du CRB de l'Institut. Nos étuves d'élevage sont paramétrées selon un cycle de lumière de 12L/12D (12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité). Nous disposons d'une étuve à 25°C et d'une étuve à 19°C pour calibrer les émergences de toutes nos souches selon un cycle d'une durée de 14 jours (entre l'oviposition de l'œuf de la mère dans l'œuf hôte jusqu'à l'émergence d'un imago). Pour calibrer nos émergences, nous avons utilisé les temps de développement en degrés jour obtenus comme décrit en annexe VIII.1.

Dans cet ensemble d'espèces, celles-ci présentent des modes de reproduction différents. Les souches de *T. cacoeciae* et de *T. cordubensis* utilisent une reproduction de type parthénogenèse thélythoque (les individus engendrés sans fécondation sont des femelles diploïdes) naturelle (les souches ne sont pas infectées par *Wolbachia bacteria*) alors que les autres espèces testées utilisent une reproduction du type parthénogenèse arrhénotoque (les individus engendrés sans fécondation sont des mâles haploïdes).

Espèce	Souche	Strate	Reproduction	Année	Lieu
<i>T. cacoeciae</i> (Marchal, 1927)	PJ	NA	thélytoque	1987	Mazan (84)
	PMbio1	NA	thélytoque	2014	Pugère (84)
	ACJRY144	arborée	thélytoque	2015	Aime (73)
	ISA1072	arborée	thélytoque	2015	St-Maurice-de-Beynost (01)
	ISA20479	herbacée	thélytoque	2017	Tourettes-sur-Loup (06)
	TC vigne	arbustive	thélytoque	1987	NA
<i>T. brassicae</i> (Bezdenko, 1968)	PR002	arbustive	arrhénotoque	2015	Aix-en-Provence (13)
	PR010	arbustive	arrhénotoque	2015	Aix-en-Provence (13)
<i>T. euproctidis</i> (Girault, 1911)	PR005	arbustive	arrhénotoque	2015	Aix-en-Provence (13)
<i>T. cordubensis</i> (Vargas & Cabello, 1985)	PUG029	arborée	thélytoque	2015	Pugère (84)
	FLO241	arbustive	thélytoque	2015	Le Crouzet (25)
	CAS134	arbustive	thélytoque	2016	Castellane (04)
<i>T. evanescens</i> (Westwood, 1833)	BL065	arbustive	arrhénotoque	2016	Le Change (24)
	BL082	arborée	arrhénotoque	2016	Le Change (24)
	SALA028	arborée	arrhénotoque	2016	Saint-André-les Alpes (04)
	ESP467	herbacée	arrhénotoque	2016	Olazti (Espagne)
<i>T. principium</i> (Sugonjaev & Sorokina, 1976)	ISA1729	herbacée	arrhénotoque	2015	Gréolières (06)
	ISA11235	herbacée	arrhénotoque	2016	Gattières (06)

Tableau 2 : Souches et espèces testées. Les strates végétales où ont été échantillonnées les souches sont indiquées (NA : manque d'information). Les modes de reproduction, l'année d'échantillonnage et le lieu d'échantillonnage ont également été indiqués. Les souches indiquées en bleu sont celles communes à l'étude de la section IV.

Toutes les souches sont élevées en laboratoire en tube sur les œufs de l'hôte *E. kuehniella* (Zeller, 1879), communément appelée pyrale de la farine. Les œufs sont fournis par l'entreprise Bioline et ont subi une étape de radiation aux ultra-violets pour stopper le développement du Lépidoptère. Ils sont stockés à basse température (5°C) et peuvent être conservés jusqu'à 60 jours (Voegelé et al.1974). Dès émergence d'une génération dans un tube, une languette contenant des œufs sains de l'hôte de laboratoire est placée à l'intérieure pour que les œufs soient parasités. Après 24 heures, les languettes nouvellement parasitées sont isolées et mises en élevage dans des nouveaux tubes, afin de contrôler l'âge des individus testés et d'optimiser l'émergence de l'ensemble des œufs parasités le premier jour d'expérimentation.

2.2. Dispositif expérimental :

Pour tester les préférences de pontes géotactiques et phototactiques du trichogramme, des languettes de papier cartonnées dimensionnées pour des tubes en verre de 12 centimètres de long et 1 cm de diamètre ouverts des deux côtés sont préparées (figure 16A). Des œufs sains d'*E. kuehniella* sont disposés en 10 patchs par languette (soit environ 1200 œufs par languette) et 8 œufs parasités par une souche de trichogramme sont disposés la veille de leur émergence au centre de la languette de manière symétrique avec une gouttelette de miel au milieu. Les tubes sont ensuite fermés avec un bouchon de coton à chaque extrémité. Un ensemble de 40 réplicats est effectué par modalité et par souche (soit une préparation de 160 tubes par souche). Les réplicats sont arrangés parallèlement par 10 dans un cadre de polystyrène (figure

16B), chaque cadre est identifié avec un numéro, le nom de la souche et la modalité. Deux souches sont testées parallèlement à chaque mise en place de l'expérience.

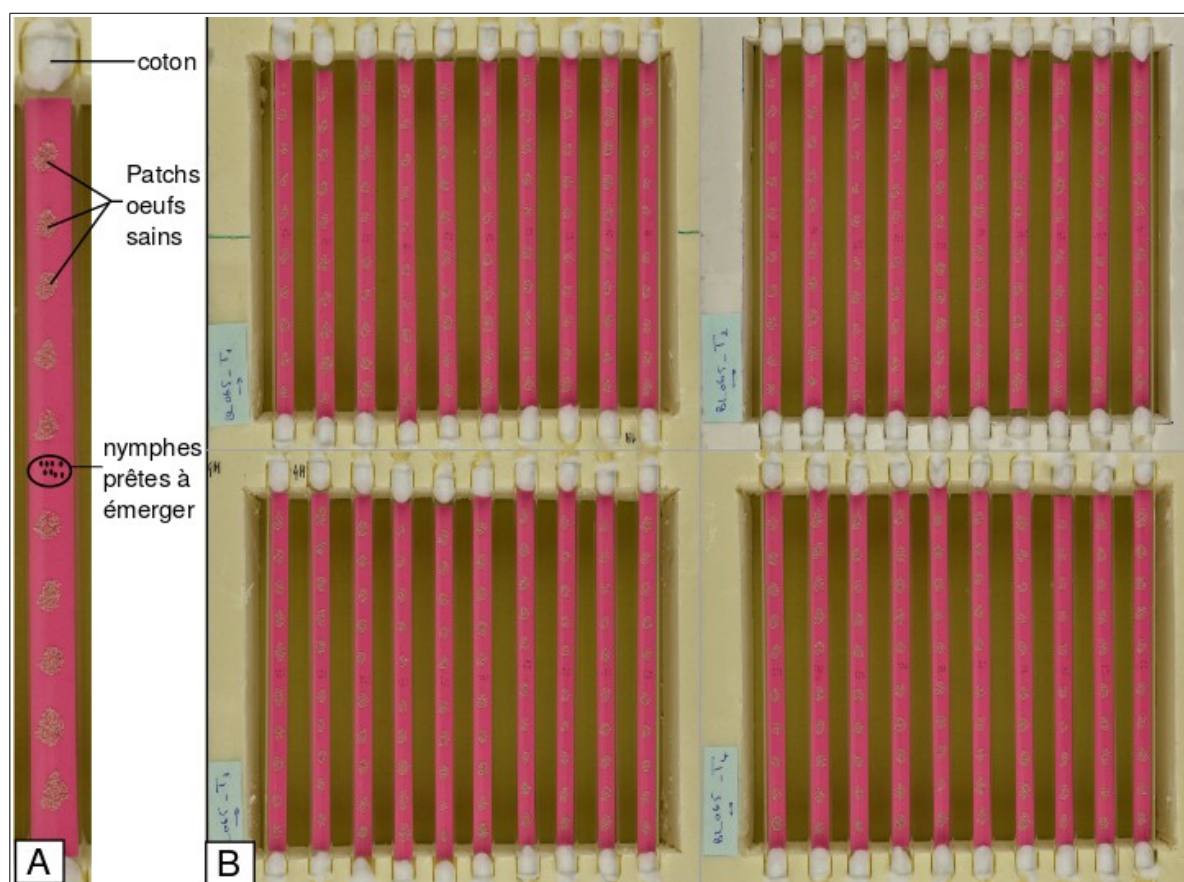


Figure 16 : Présentation de la disposition des œufs pour un réplicat (A) dans un tube. Assemblage de 4 cadres contenant chacun 10 tubes parallèlement disposés (B).

Les cadres sont ensuite installés dans une salle noire (sans lumière extérieure) dont les conditions environnementales sont contrôlées (température : $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$; humidité : $70\% \pm 10\%$, éclairage sous boîte à lumière avec un cycle lumière obscurité 12L:12D). Les cadres sont disposés de la manière présentée dans la figure 17. Nous disposons de deux postes par modalité. Pour éviter un biais expérimental dans les résultats lié à la position des cadres par rapport aux boîtes à lumières, une randomisation maximum de la disposition des cadres est appliquée. Chaque poste (quatre cadres disposés face à une boîte à lumière) est isolé grâce à l'élaboration de paroi en polystyrène enveloppées dans du papier noir mate opaque pour éviter l'influence de la lumière des autres boîtes à proximité. Les cadres sont laissés cinq jours consécutifs dans la salle d'expérimentation. Des photos des cadres sont prises cinq jours après pour laisser le temps de développement nécessaire aux larves de trichogramme et changer le couleur des œufs hôtes parasités. Une fois la dernière photo prise, les tubes sont stockés au congélateur à -10°C pendant quelques jours avant d'être nettoyés et réutilisés lors d'une prochaine session.

2.3. Traitements :

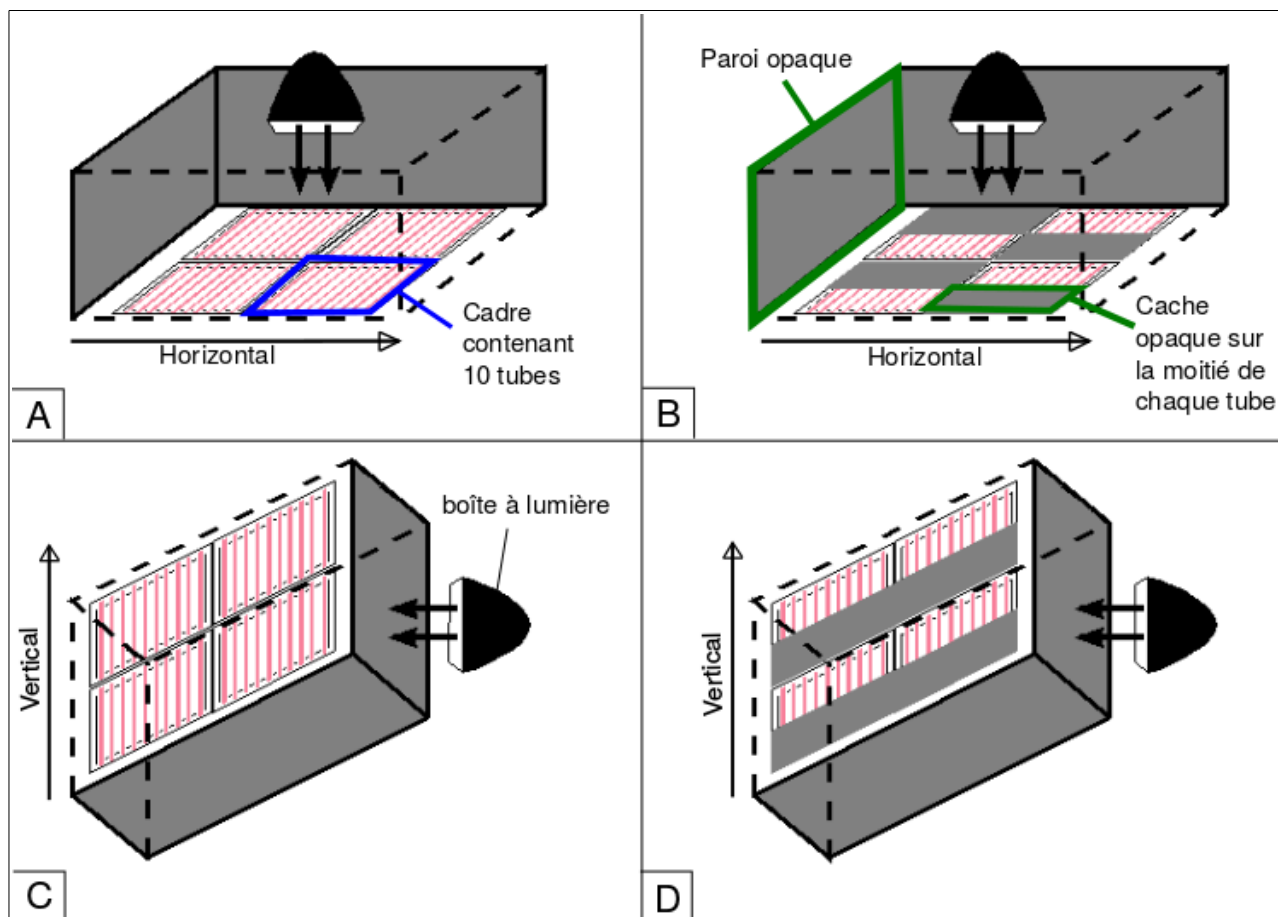


Figure 17 : Disposition des cadres pour chaque modalité : la modalité Témoin (A), effet de la lumière (B), effet de la gravité (C) et interaction entre lumière et gravité (D). (Figure de Faten Ayed)

Pour réaliser cette étude, quatre modalités sont réalisées (figure 17). La première servira de **témoin (T)**. Le dispositif sera horizontal (sans effet de gravité) avec une lumière homogène sur l'ensemble du dispositif (sans effet lumière). La deuxième modalité testera l'**effet de la lumière sur la préférence de pont (H)**. Le dispositif sera également horizontal mais la moitié sera dans l'ombre laissant ainsi le choix aux individus de se déplacer à la lumière (environ 210 lux) ou à l'obscurité (moins de 20 lux). La troisième modalité testera l'**effet de la gravité sur la préférence de pont (V)**. Le dispositif sera positionné verticalement avec une lumière répartie uniformément sur l'ensemble. La dernière modalité testera l'**interaction de l'effet de la lumière et de l'effet de la gravité (I)** de manière à observer la présence ou l'absence d'une synergie entre les deux effets séparés précédemment. Le dispositif sera positionné verticalement et la partie basse sera mise à l'obscurité. L'attendu étant l'observation d'une phototaxie positive et une géotaxie négative, mettre à l'obscurité la partie haute tendrait à annuler les effets sur les réponses. C'est pourquoi, seule la partie basse sera mise à l'obscurité.

2.4. Acquisition des données :

Dans l'objectif d'un phénotypage à haut-débit, afin d'effectuer un nombre suffisant de réplicats rapidement, des tubes contenant des bandelettes avec les œufs d'*E. kuenhiella* sont disposés côte à côte par 10 dans un cadre de polystyrène (figure 18). Une photo prise avec un appareil Nikon D810 © d'un cadre contient les 10 réplicats avec une résolution suffisamment élevée (36,3 Mpx) pour pouvoir en extraire les informations sur le parasitisme dans chaque tube avec précision. Les paramètres de la photo sont : une ouverture à f7.1, les ISO sont à 200, la focale à 60 mm, la vitesse d'ouverture/fermeture du capteur à 1/50 seconde et le format de l'image en extension TIFF. Une totalité de six photos par cadre est prise : une première photo est prise avant émergence des nymphes au jour 0 (J0), puis une photo par jour est prise 5 jours après le début de chaque session expérimentale durant 5 jours (de J1 à J5). La nécessité d'attendre 5 jours avant d'effectuer la première provient du temps nécessaire au noircissement des premiers œufs parasités. Cela permet d'effectuer un suivi temporel des pontes pour chaque modalité. Les images sont renommées selon une nomenclature indispensable pour l'analyse automatique qui suivra (dans notre cas, nous testons différentes souches de trichogrammes : «nom de la souche»_«modalité»_«numéro du cadre»_«numéro du jour»).

Les images sont ensuite analysées en utilisant la première approche d'analyse d'images décrite en section II avec le plugin CODICOUNT. Dans le logiciel ImageJ, nous pouvons assembler les images de 4 cadres (figure 1B de la section II.2) en une seule image pour pouvoir utiliser équitablement les informations de couleurs de chacune d'entre elle pour calibrer la macro d'analyse éditée par CODICOUNT. Pour cela, les différentes étapes sont :

- importer les photos de cadre sous forme de séquence (File → import → image sequence)
- transformer la séquence (stack) en une seule image en conservant le maximum de résolution (Image → stack → Make montage → Scale Factor = 1.0)
- enregistrement de l'image Montage.tiff

L'utilisation de la photo Montage.tiff permet d'avoir accès aux teintes possibles dans toutes les photos assemblées, il est donc préférable de sélectionner équitablement sur toutes les images chacune des trois couleurs à discriminer. La couleur rose a donc été choisie comme promulguant un bon contraste avec les œufs.

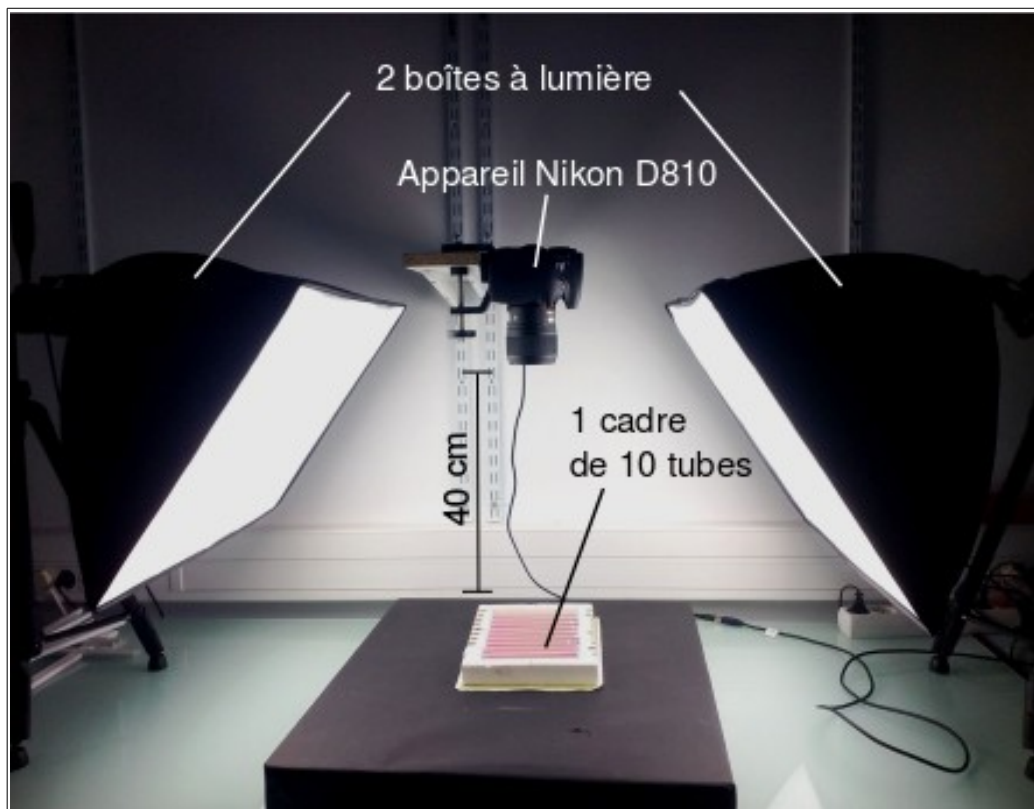


Figure 18 : Disposition du cadre au centre pour la prise de photo. Deux boîtes à lumière sont situées de chaque côté du cadre pour éviter d'éventuelles ombres et limiter les reflets sur le verre.

2.5. Analyses des résultats :

Nous disposons en sortie de l'étape d'analyse d'images, d'une table de données comprenant pour chaque souche testée : le traitement, le numéro du réplicat (du tube), le jour de la photo, le numéro du patch et la proportion d'œufs sains et parasités par patch. Les résultats sont analysés dans le logiciel R en calculant, pour chaque tube, la position moyenne d'un événement de parasitisme, obtenue en numérotant les patches d'œufs de -5 à +5 (-5 et +5 étant les deux patches situés à chacune des extrémités du tube), et en pondérant ces positions par le taux de parasitisme observé dans le patch. Une position négative indique que les œufs ont été préférentiellement parasités du côté obscur et/ou en bas du tube, une valeur positive du côté opposé, et une valeur nulle une absence de préférence. Les réplicats (tubes) sont ensuite pondérés selon leur niveau de parasitisme total. En effet, les différences de fécondité entre femelles ou l'hétérogénéité du nombre de femelles qui émergent dans chaque tube causent une variabilité du taux global de parasitisme, et la mesure de position des pontes est d'autant plus précise qu'elle repose sur un grand nombre de pontes. Les tests statistiques correspondent à une comparaison de moyennes (tests de Student bilatéral pour tester une différence de la valeur zéro, avec ajustement des p-values pour les tests multiples en utilisant la fonction `p.adjust` de R suivant la méthode de « holm ») pour juger de la significativité des traitements expérimentaux (lumière, gravité, interaction), et ce chaque jour de ponte (de J1 à J5). Les expériences témoin ont en outre été réalisées sur huit souches représentatives de cinq des espèces testées pour vérifier l'absence d'effet

(préférence nulle , $p = 0.98$) dans le dispositif présenté dans la figure 2A en l'absence de traitement expérimental (figure 19).

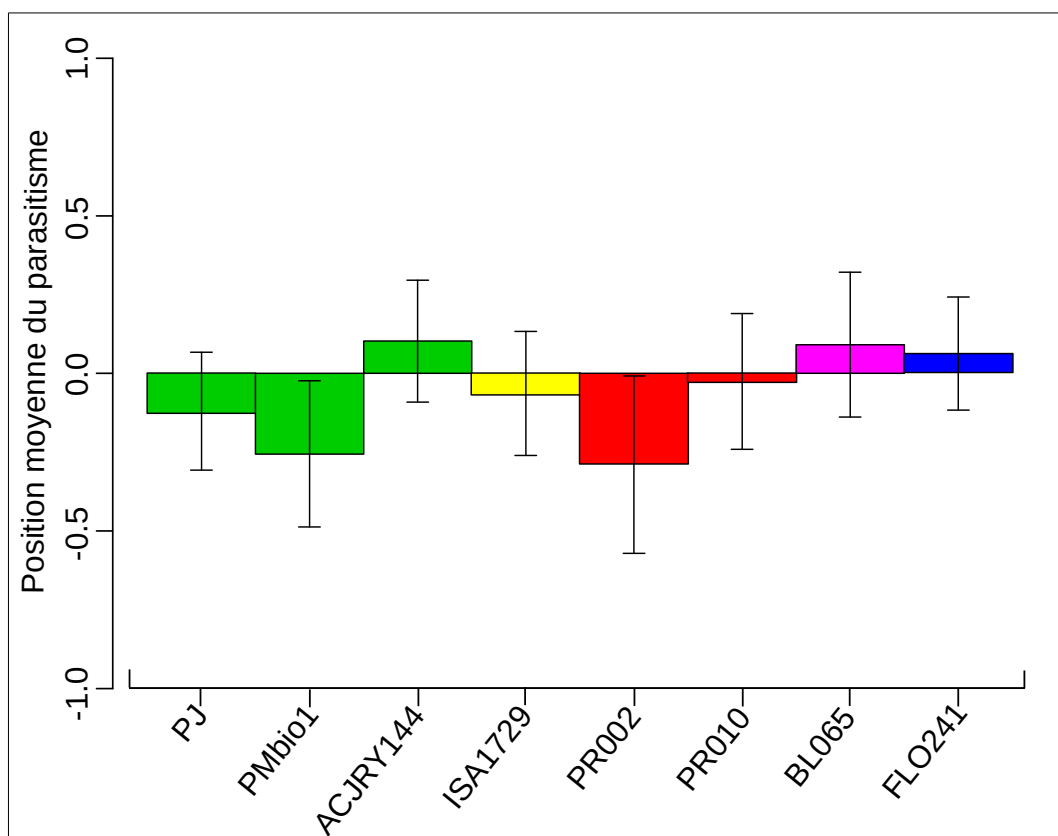


Figure 19 : Histogramme représentant la position moyenne du parasitisme dans le cadre de la modalité témoin (sans effet de lumière ou de gravité) pour l'ensemble des 8 souches testées pour cette modalité. Les barres verticales représentent l'erreur standard.

III.3. Résultats

3.1. Effet de la lumière

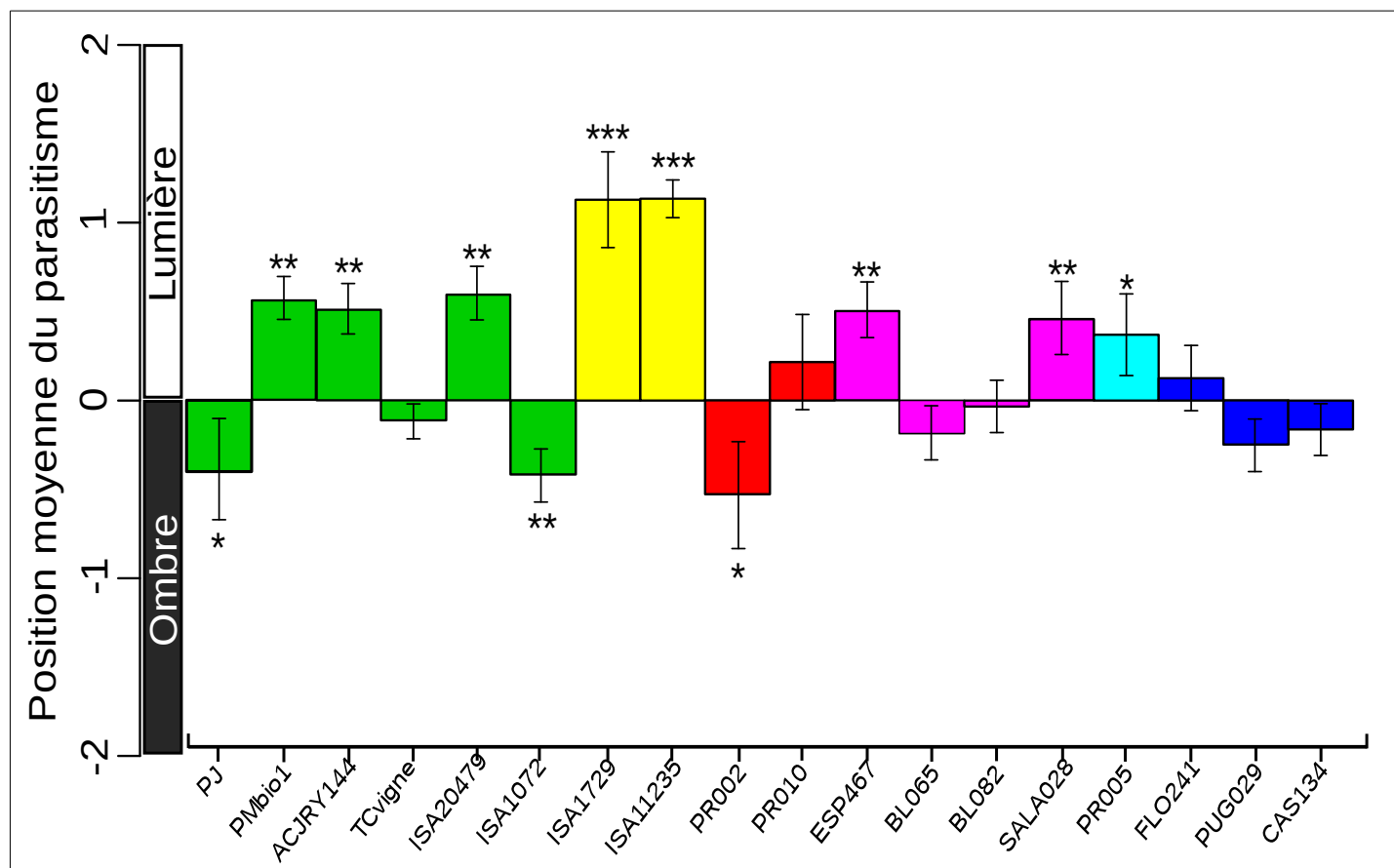


Figure 20 : Histogramme représentant la position moyenne du parasitisme dans les tubes au troisième jour (J3) pour chaque souche testée pour l'effet de la lumière (les barres verticales représentent l'erreur standard). Les valeurs positives indiquent une préférence de ponte vers la lumière. Les couleurs correspondent aux espèces auxquelles les souches appartiennent : *T. cacoeciae*, *T. principium*, *T. brassicae*, *T. evanescens*, *T. euproctidis* et *T. cordubensis*. Les « * » représentent la significativité de l'effet de la lumière sur la préférence de ponte (* : p.value < 0,05 ; ** : p.value < 0,01 et *** : p.value < 0,001).

On observe une variabilité des préférences de pontes à la lumière ou à l'obscurité entre espèces et entre souches d'une même espèce (figure 20). Sur les 18 souches testées 7 n'ont pas montré de préférence de ponte affectée significativement par la lumière : la souche PR010 de *T. brassicae*, deux souches de *T. evanescens* (BL065 et BL082), la souche TCvigne de *T. cacoeciae* et les trois souches de *T. cordubensis* (CAS134, FLO241 et PUG029). L'espèce *T. principium* est, au contraire fortement affectée par la lumière et préfère parasiter son hôte à la lumière (phototaxie positive). La souche de *T. euproctidis* (PR005) est également légèrement attirée par la lumière. Parmi les espèces *T. cacoeciae* et *T. evanescens*, nous observons trois souches de *T. cacoeciae* (ACJRY144, ISA20479 et PMbio1) et deux souches de *T. evanescens* (ESP467 et SALA028) affectées par la lumière. Sur l'ensemble des souches testées, trois souches appartenant à deux espèces différentes ont montré une préférence significative à parasiter les hôtes situés à l'ombre (ISA1072, PJ et PR002).

3.2. Effet de la gravité

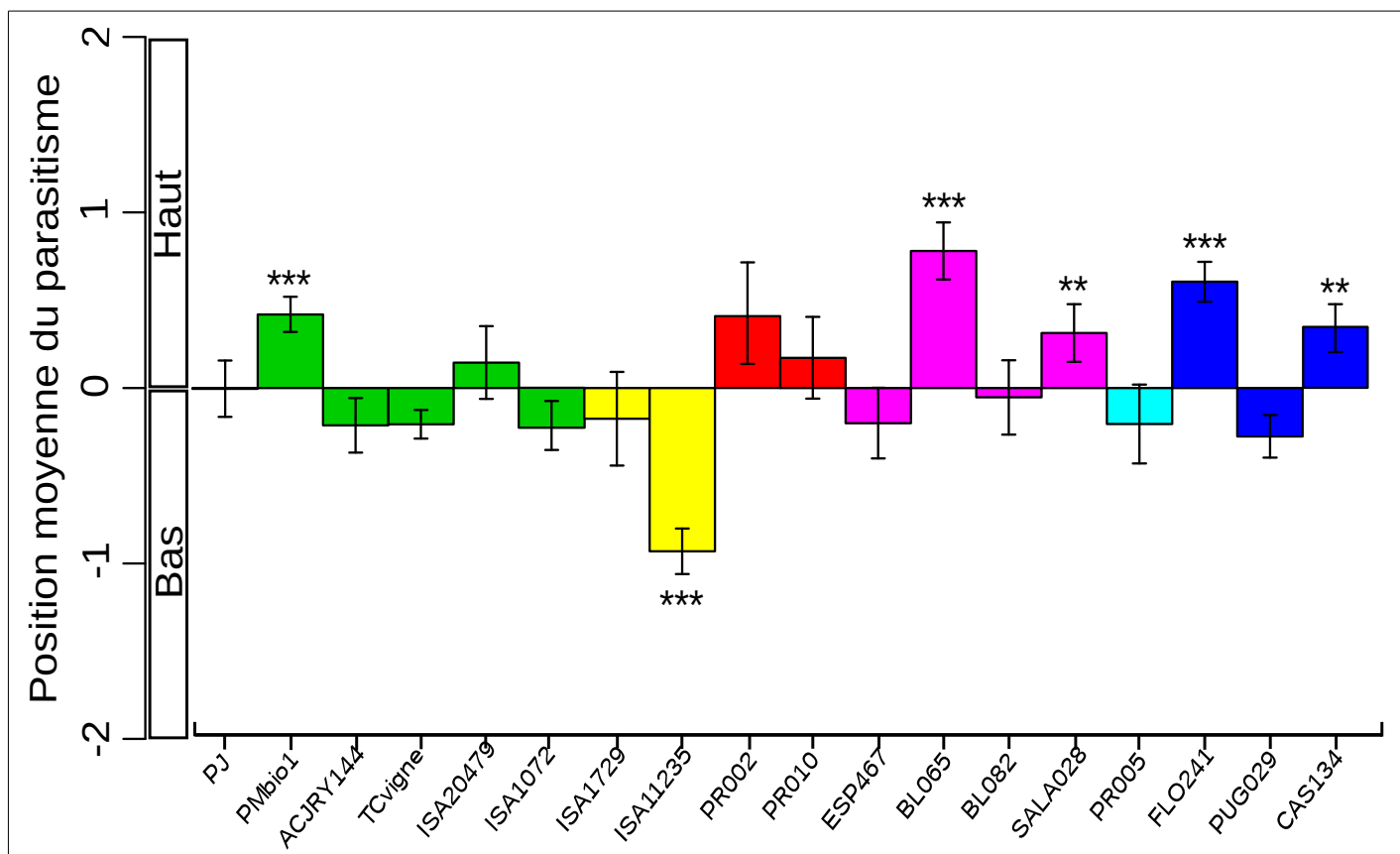


Figure 21 : Histogramme représentant la position moyenne du parasitisme dans les tubes au troisième jour (J3) pour chaque souche testée pour l'effet de la gravité (les barres verticales représentent l'erreur standard). Les valeurs positives indiquent une préférence de ponte vers le haut du tube. Les couleurs correspondent aux espèces auxquelles les souches appartiennent : *T. cacoeciae*, *T. principium*, *T. brassicae*, *T. evanescens*, *T. euproctidis* et *T. cordubensis*. Les « * » représentent la significativité de l'effet de la gravité sur la préférence de ponte (* : p.value < 0,05 ; ** : p.value < 0,01 et *** : p.value < 0,001).

Nous observons une variabilité de réponses à la gravité entre espèces et entre souches d'une même espèce (figure 21). Sur les 18 souches testées, 12 (soit deux tiers des souches) n'ont pas montré d'effet significatif de la gravité sur leur préférence de ponte : cinq souches de *T. cacoeciae* (ACJRY144, ISA1072, ISA20479, PJ et TCvigne), la souche ISA1729 de *T. principium*, les deux souches de *T. brassicae* (PR002 et PR010), deux souches de *T. evanescens* (BL082 et ESP467), la souche PR005 de *T. euproctidis* et enfin la souche PUG029 de *T. cordubensis*. Parmi celles affectées par la gravité, cinq ont présenté une géotaxie négative (préférence vers le haut du tube) et une seule a montré une géotaxie positive (préférence vers le bas du tube). Les cinq souches à géotaxie négative sont : PMbio1 de l'espèce *T. cacoeciae*, BL065 et SALA028 de l'espèce *T. evanescens*, CAS134 et FLO241 de l'espèce *T. cordubensis*. Seule la souche ISA11235 de l'espèce *T. principium* a montré une géotaxie positive.

3.3. Interaction des deux facteurs

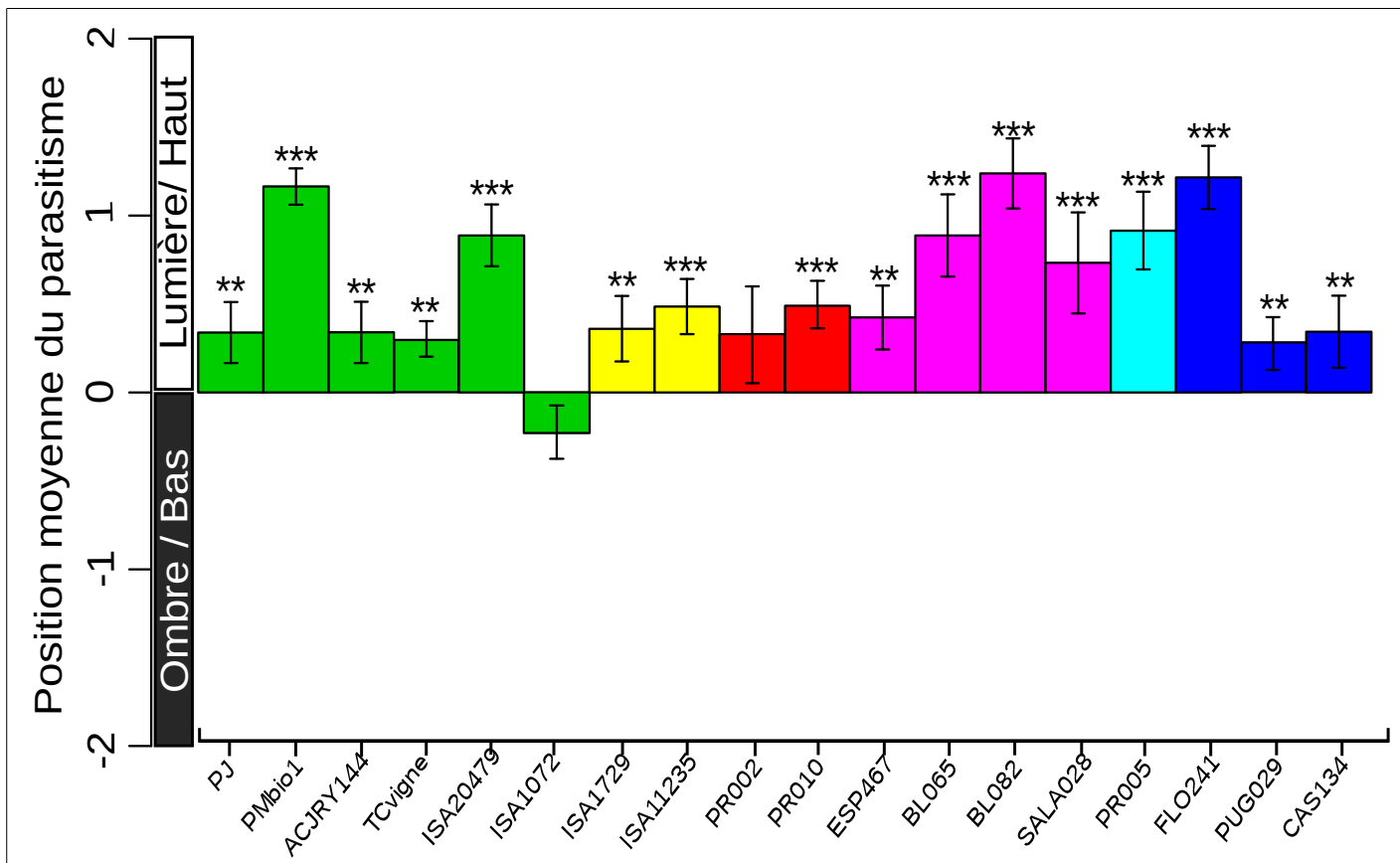


Figure 22: Histogramme représentant la position moyenne du parasitisme dans les tubes au troisième jour (J3) pour chaque souche testée pour l'interaction entre l'effet de la gravité et l'effet de la lumière (les barres verticales représentent l'erreur standard). Les valeurs positives indiquent une préférence de ponte vers le haut du tube. Les couleurs correspondent aux espèces auxquelles les souches appartiennent : *T. cacaoeciae*, *T. principium*, *T. brassicae*, *T. evanescens*, *T. euproctidis* et *T. cordubensis*. Les « * » représentent la significativité de l'effet de l'interaction des facteurs lumière et gravité sur la préférence de ponte (* : p.value < 0,05 ; ** : p.value < 0,01 et *** : p.value < 0,001).

Ce traitement a pour objectif de tester une éventuelle interaction, soit synergique (renforcement de la préférence par rapport à une simple addition des effets), soit antagoniste (affaiblissement de la préférence) des effets de la lumière et de la gravité (figure 22).

Sur l'ensemble des 18 souches testées, une seule n'a pas montré une interaction des deux facteurs significative sur sa préférence de ponte (son mouvement). Il s'agit de la souche ISA1072 de l'espèce *T. cacaoeciae*. Cette souche montre la même tendance que dans la modalité sans l'effet de la gravité soit une tendance à pondre à l'ombre (phototaxie négative).

Toutes les autres souches ont montré une préférence à parasiter les œufs hôtes situés en haut du tube à la lumière. Parmi elles, deux souches de l'espèce *T. cacaoeciae* (PJ et TCvigne), la souche PR010 de l'espèce *T. brassicae*, la souche BL082 de l'espèce *T. evanescens* et la souche PUG029 de *T. cordubensis* n'avaient pas montré de préférences significatives lors des modalités testant les facteurs séparément alors que

l'interaction des deux fait ressortir une préférence à phototaxie positive et géotaxie négative. Une synergie des deux facteurs a donc été montré au moins pour ces souches.

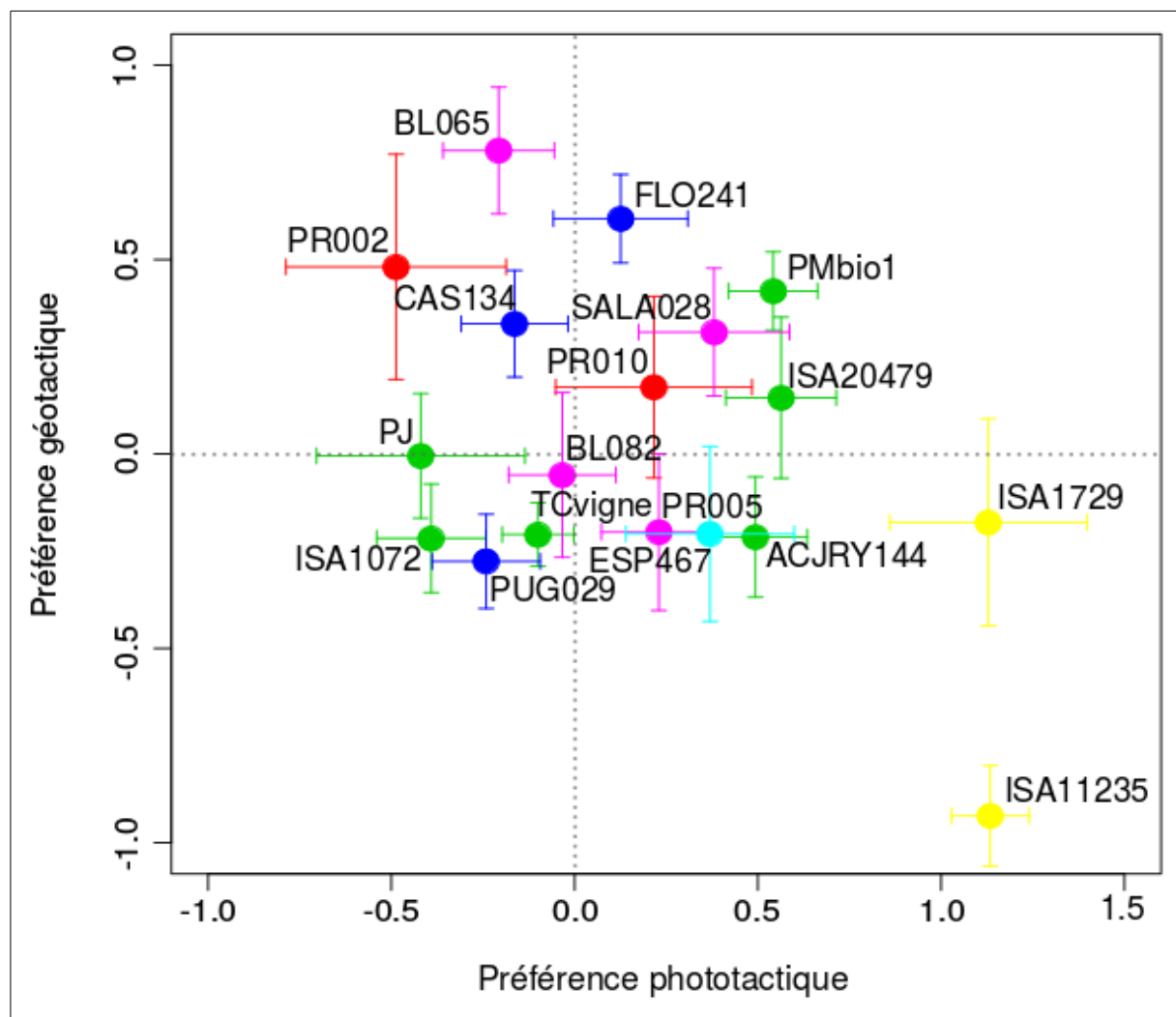


Figure 23 : Corrélation entre la position moyenne pondérée du parasitisme sous l'effet de la lumière et la position moyenne pondérée du parasitisme sous l'effet de la gravité. Chaque point coloré représente la position moyenne d'une souche. Les couleurs correspondent aux espèces auxquelles les souches appartiennent : *T. cacoeciae*, *T. principium*, *T. brassicae*, *T. evanescens*, *T. euproctidis* et *T. cordubensis*. Les barres horizontales et verticales représentent les erreurs standards des préférences pour chaque souche.

Une corrélation entre les résultats obtenus pour les effets isolés de la lumière et de la gravité peut montrer comment se positionnent les souches les unes par rapport aux autres vis à vis de ces deux facteurs (figure 23). Nous ne pouvons pas observer de regroupement de souche d'une même espèce, excepté pour les deux souches de *T. principium* qui présentent les préférences en fonction de la lumière les plus marquées. Les positions des autres souches vis-à-vis de leur préférence phototactique et géotactique ne permettent pas de regrouper les souches d'une même espèce entre elles.

III.4. Discussion

4.1. Liens entre phototaxie, géotaxie et espèces

Les réponses géotactiques et phototactiques ne semblent pas différentes en fonction des espèces mis à part pour l'espèce *T. principium*. En effet, on retrouve des souches ayant soit une préférence phototactique, soit une préférence géotactique soit les deux au sein de chaque espèce.

Les souches présentant une réponse significative à la lumière ou à la gravité ou aux deux facteurs dans les deux modalités précédentes ont également montré une préférence de ponte en haut du tube à la lumière. L'intensité de l'effet semble dans le cas de l'observation d'un seul des effets séparément, supérieure dans le cas de l'observation d'effets significatifs des deux facteurs qui vont dans le même sens que l'effet observé lors dans la modalité d'interaction (phototaxie positive et géotaxie négative) et enfin inférieure dans le cas où les effets des facteurs isolés sont opposés (phototaxie positive et géotaxie positive) comme c'est le cas pour la souche ISA11235 de l'espèce *T. principium*.

Le nombre de souches présentant une attraction à la lumière ou à l'obscurité (11 souches) est en outre plus important que le nombre de souches qui présentent une géotaxie, positive ou négative (6 souches). Par ailleurs il semblerait que l'effet de la lumière l'emporte sur l'effet de la gravité, comme nous pouvons le constater sur la souche ISA11235 de *T. principium* lors de l'interaction des deux facteurs qui présentaient des effets contraires lorsqu'ils étaient testés séparément. D'autre part, nous avons constaté que certaines souches qui ne présentaient ni de préférence vis-à-vis de la lumière, ni de préférence vis-à-vis de la gravité, présentent en revanche une préférence significative de ponte en haut à la lumière dans les tubes de la modalité testant l'interaction. C'est le cas des souches TCvigne, BL082 et PUG029 appartenant à trois espèces différentes. De plus, les souches qui présentaient à la fois une phototaxie positive et une géotaxie négative conservent la même orientation mais plus marquée (supérieure à la somme des deux effets) de leur préférence de ponte lors du test d'interaction. Ceci suggère qu'il existe bien une synergie entre les deux facteurs avec généralement une dominance pour l'effet de la lumière. Pour autant, les souches qui présentaient une phototaxie négative (préférence pour l'obscurité) ont révélé lors du test de l'interaction des deux facteurs, une absence de préférence de ponte (ISA1072) ou une préférence significative de ponte à la lumière en haut du tube (PJ et PR002). La dissociation des facteurs de lumière et de gravité n'est ainsi pas suffisante pour caractériser l'orientation des préférences de pontes. L'interaction des deux (correspondant à des conditions plus proche d'un environnement naturel) permet d'acquérir des informations nécessaires à l'évaluation de la géotaxie et de la phototaxie des espèces de trichogrammes. Cette interaction a révélé une préférence de ponte en hauteur à la lumière pour l'ensemble des souches des trois strates (à l'exception de PR010 et ISA1072). C'est donc la combinaison de ces deux facteurs qui a révélé une préférence de ponte en hauteur à la lumière, telle que communément observé chez les insectes (Bishop 1969; van Grunsven et al. 2014) dont les trichogrammes.

4.2. Taxies et strates :

Il est possible de mettre en lien la préférence de ponte suivant la phototaxie et la géotaxie en fonction de la strate végétale sur laquelle les souches ont été échantillonnées.

Par exemple, l'ensemble des souches échantillonnées sur la strate herbacée et testées dans cette étude présentent une phototaxie positive (ISA20479, ESP467, ISA1729, ISA11235). Notons également que la seule souche qui présente une géotaxie positive a été échantillonnée dans cette strate (ISA11235). Il est possible que les souches se situant dans cette strate basse n'aient pas de préférence géotactique car la hauteur des végétaux de cette strate est de faible amplitude, en revanche les stratégies de recherche pourraient se porter sur les feuilles les plus jeunes des végétaux pour ces strates situées à la lumière et plus propices à la ponte des œufs de certains hôtes (Thompson & Pellmyr 1991).

La plupart des souches de la strate arbustive ne présentent pas de préférence de ponte lors des tests de l'effet de la lumière seule (ou alors une phototaxie positive faible) en revanche la plupart des souches qui ont montré une préférence de ponte en hauteur fait partie de cette strate (Tcvigne*, FLO241, CAS134 et BL065).

Strate	Espèce	Souche	Phototaxie	Géotaxie	Interaction
Herbacée	<i>T. cacoeciae</i>	ISA20479	+ , p = 8.97 10 ⁻³	0, p = 8.56 10 ⁻²	+ , p = 7.39 10 ⁻¹⁶
Herbacée	<i>T. evanescens</i>	ESP467	+ , p = 6.26 10 ⁻³	0 , p = 1.00	+ , p = 1.51 10 ⁻³
Herbacée	<i>T. principium</i>	ISA1729	+ , p = 6.10 10 ⁻¹⁹	0 , p = 1.00	+ , p = 2.32 10 ⁻³
Herbacée	<i>T. principium</i>	ISA11235	+ , p = 1.39 10 ⁻⁵⁵	+ , p = 4.82 10 ⁻⁷	+ , p = 9.87 10 ⁻⁵
Arbustive	<i>T. cacoeciae</i>	TC vigne	0 , p = 5.70 10 ⁻¹	0, p = 5.01 10 ⁻²	+ , p = 2.40 10 ⁻³
Arbustive	<i>T. brassicae</i>	PR002	- , p = 4.23 10 ⁻²	0 , p = 5.70 10 ⁻¹	0 , p = 7.61 10 ⁻²
Arbustive	<i>T. brassicae</i>	PR010	0 , p = 5.13 10 ⁻¹	0 , p = 8.95 10 ⁻²	+ , p = 2.72 10 ⁻¹³
Arbustive	<i>T. euproctidis</i>	PR005	+ , p = 4.18 10 ⁻³	0 , p = 1.00	+ , p = 5.32 10 ⁻⁸
Arbustive	<i>T. cordubensis</i>	FLO241	0 , p = 1.00	- , p = 2.31 10 ⁻²⁴	+ , p = 1.51 10 ⁻³⁷
Arbustive	<i>T. cordubensis</i>	CAS134	0, p = 1.00	- , p = 1.61 10 ⁻⁴	+ , p = 5.03 10 ⁻³
Arbustive	<i>T. evanescens</i>	BL065	0 , p = 1.00	- , p = 1.75 10 ⁻¹⁸	+ , p = 3.89 10 ⁻¹³
Arborée	<i>T. cacoeciae</i>	ACJRY144	+ , p = 4.27 10 ⁻³	0 , p = 1.00	+ , p = 9.36 10 ⁻³
Arborée	<i>T. cacoeciae</i>	ISA1072	- , p = 2.16 10 ⁻³	0 , p = 1.00	0 , p = 1.00
Arborée	<i>T. cordubensis</i>	PUG029	0 , p = 1.00	0 , p = 1.00	+ , p = 1.57 10 ⁻³
Arborée	<i>T. evanescens</i>	BL082	0 , p = 5.41 10 ⁻²	0 , p = 1.00	+ , p = 1.78 10 ⁻²³
Arborée	<i>T. evanescens</i>	SALA028	+ , p = 5.65 10 ⁻³	- , p = 3.28 10 ⁻⁵	+ , p = 1.07 10 ⁻⁸

Tableau 3 : Récapitulatif des réponses phototactiques et géotactiques positives (+), négatives (-) ou nulles (0) avec leur significativité (p-value) en fonction des souches/espèces et strate végétale de trichogrammes au troisième jour de ponte (test t de student bilatéral pour chaque souche et traitement suivi de l'ajustement des p-values sur l'ensemble des souches).

L'ensemble des souches appartenant à la strate arborée a montré une préférence de ponte en hauteur à la lumière dans la modalité du test de l'interaction entre lumière et gravité (exceptée ISA1072). Cependant, seules deux souches de cette strate (ACJRY144 et SALA028) ont montré une phototaxie positive et une seule souche une géotaxie négative (SALA028). De plus, les souches ISA1072 de *T. cacoeciae* et PUG029 de *T. cordubensis* ont montré une tendance à préférer l'ombre à la lumière (phototaxie négative) pour parasiter leurs hôtes. Ceci peut se traduire par une recherche d'atteindre la canopée (partie supérieure de la strate arborée) ainsi qu'une préférence phototactique dépendant de la souche considérée. Les souches provenant de lieu différents, les hôtes naturellement parasités peuvent différer, chaque hôte ayant une stratégie de ponte différente.

III.5. Conclusion

Le dispositif expérimental mis en œuvre permet de phénotyper rapidement les souches échantillonnées et élevées dans le CRB en utilisant la méthode d'analyse d'images décrite en section II.2. Ce dispositif génère des informations supplémentaires dans la caractérisation des souches et espèces de trichogramme apportant des outils supplémentaires lors de la sélection de souche pour leur utilisation en tant qu'auxiliaires de culture. De ce fait, il peut être préférable d'utiliser les souches présentant une phototaxie positive sans effet de la gravité pour contrôler les populations de ravageurs de la strate herbacée car la probabilité que les individus lâchés restent dans cette strate devrait être plus élevées. Des analyses et expériences complémentaires sont néanmoins nécessaires pour affirmer cette hypothèse. Cette expérience peut également servir à étudier d'autres hypothèses que la stratification verticale des souches de trichogramme. Par exemple, dans le cadre du contrôle de la qualité des souches en élevages, il est tout aussi possible d'utiliser ce dispositif et de tester les effets de la lumière et de la gravité sur des souches récemment échantillonnées et des souches élevées en condition de laboratoire depuis longtemps.

IV. Évaluation de la variabilité des mouvements d'exploration au sein du genre *Trichogramma*

Un travail effectué en collaboration avec Guy (2016-2017) Perez, Robin Laugier (2017) et Laura Pinto (2016).

IV.1. Objectifs de l'étude :

Les activités de marche et déplacement du genre *Trichogramma* demeurent mal connus à ce jour. En effet, les études de ce type concernent les stratégies de déplacement en présence d'hôtes (ou d'odeurs) par observation directe à l'œil nu dans des tubes en verres ou au niveau de la plante (Yong et al. 2007; Gingras et al. 2008), ou par suivi vidéo et méthode de tracking sur un individu (Kaâniche et al. 2006). Dans le cas d'observations à l'œil, les trajectoires ne sont pas précisément interprétables et les vitesses mesurées entre deux points distants (point de lâcher et œuf hôte) ne correspondent pas à la vitesse réelle de marche à court terme car celle-ci ne tient pas compte de la sinuosité de la trajectoire réelle effectuée. Dans le cas de tracking à proprement parler sur le trichogramme, il a été montré par Kaâniche et ses collaborateurs (2006) sur un individu à la fois, la possibilité d'automatiser le processus d'analyse comportementale sur les stratégies de découverte et d'exploitation d'œufs hôtes.

Des études effectuées en l'absence d'hôtes (environnement vide) permettraient d'évaluer l'activité de marche de différentes espèces de trichogrammes et de les comparer entre elles sans l'effet potentiel de l'hôte. Cela, en vue de la caractérisation de traits phénotypiques impliqués dans les mouvements du trichogramme dans le cadre d'une exploration non orientée des différentes espèces. La caractérisation des stratégies de mouvement sera ainsi effectuée selon trois critères : le taux d'activité (proportion du temps passé à se déplacer), la vitesse de déplacement ainsi que la sinuosité des trajectoires (Benhamou 2004).

Cette étude cherche donc à déterminer si une variabilité du mouvement intra- et inter-spécifique, ainsi qu' intra- et inter-souche existe. Une faible variabilité intra- et inter-spécifique permettrait d'exploiter ces informations de phénotypage comme critères de sélection. Il serait envisageable de privilégier une souche/espèce qui découvre plus rapidement son environnement qu'une autre pour l'utilisée comme agent de lutte biologique. Par ailleurs, dans le cadre d'une collaboration avec Aline Bertin, post-doctorante de l'équipe de Biologie des Populations et des Invasions (BPI) de l'Institut, nous avons étudié le lien qui peut exister entre les traits phénotypiques liés au mouvement et les capacités de dispersion au niveau populationnel entre générations (Morel-Journel et al., 2015). Il a déjà été montré une sélection des individus présentant une forte capacité de dispersion au niveau des fronts d'expansion de populations invasives (Brown et al. 2014). Via la caractérisation phénotypique des individus situés à différents endroits de la population tels que le front (zone comprenant les individus se situant proche des extrémités de l'aire de

répartition d'une population) ou le cœur (zone restreinte de l'aire de répartition de la population la plus dense en individus), nous pouvons supposer observer des stratégies d'exploration différentes (vitesses et trajectoires) en fonction de cette localisation des individus au sein d'une population et de l'évolution de ces caractères sur plusieurs générations. Néanmoins, les données acquises dans le cadre de cette collaboration n'ont pas pu être interprétées dans le cadre de ma thèse. Je présenterai la quantité de souches filmées et caractérisées mais ne développerai pas les résultats sur les tests d'évolution de la capacité de dispersion.

Les objectifs de cette section seront donc d'évaluer la variabilité intra- et inter-spécifique des stratégies d'exploration du genre *Trichogramma* ainsi que d'établir un lien entre les facteurs mesurés liés au mouvement des individus.

IV.2. Matériel et Méthodes :

2.1. Matériel biologique :

Espèce	Souche	Reproduction	Année	Lieu
<i>T. cacoeciae</i> (Marchal, 1927)	PJ	thélythoque	1987	Mazan (84)
	PMbio1	thélythoque	2014	Pugère (84)
	ISA1072	thélythoque	2015	St-Maurice-de-Beynost (01)
	ACJRY127	thélythoque	2015	Aime (73)
	ACJRY133	thélythoque	2015	Aime (73)
	ACJRY144	thélythoque	2015	Aime (73)
<i>T. brassicae</i> (Bezdenko, 1968)	F1-8	arrhénotoque	NA	Bioline
	F5-11	arrhénotoque	NA	Bioline
	F5-8	arrhénotoque	NA	Bioline
	PR002	arrhénotoque	2015	Aix-en-Provence (13)
	PR010	arrhénotoque	2015	Aix-en-Provence (13)
<i>T. cordubensis</i> (Vargas & Cabello, 1985)	CAS134	thélythoque	2016	Castellane (04)
	FLO241	thélythoque	2015	Le Crouzet (25)
	PUG029	thélythoque	2015	Pugère (84)
<i>T. evanescens</i> (Westwood, 1833)	BL065	arrhénotoque	2016	Le Change (24)
	BL082	arrhénotoque	2016	Le Change (24)
	ESP459	arrhénotoque	2016	Olazti (Espagne)
	ESP467	arrhénotoque	2016	Olazti (Espagne)
<i>T. euproctidis</i> (Girault, 1911)	PR005	arrhénotoque	2015	Aix-en-Provence (13)
	PR009	arrhénotoque	2015	Aix-en-Provence (13)
<i>T. semblidis</i> (Aurivilius, 1897)	FVP-025	arrhénotoque	2015	St-Jean-de-Thurigneux (01)
<i>T. principium</i> (Sugonjaev & Sorokina, 1976)	ISA1729	arrhénotoque	2015	Gréolières (06)

Tableau 4 : Souches et espèces testées. Les temps de développement dépendent de l'espèce considérée ainsi pour toutes les souches d'une même espèce, les temps de développement et les seuils minimums sont identiques. Les modes de reproduction ont également été indiqués. Les souches indiquées en bleu sont celles communes à l'étude de la section III.

Pour cette étude, nous avons testé un ensemble d'espèces et de souches de trichogrammes provenant du CRB de l'Institut. Comme expliqué dans la section précédente, les souches et espèces ont été sélectionnées selon leur disponibilité et la diversité de leur provenance géographique. Par ailleurs nous avons conservé un grand nombre de souches identiques à celles présentées dans la section III. Un total de sept espèces représentées par un ensemble de vingt-deux souches ont été utilisées comme échantillon expérimental (tableau 4).

Les souches ont été élevées dans les mêmes conditions que celles présentées dans la section III avec une calibration des émergences suivant la même méthode. Sur l'ensemble des 22 souches présentées dans le tableau 1, 14 souches sont communes à l'étude des préférences géotactiques et phototactiques.

2.2. Dispositif expérimental :

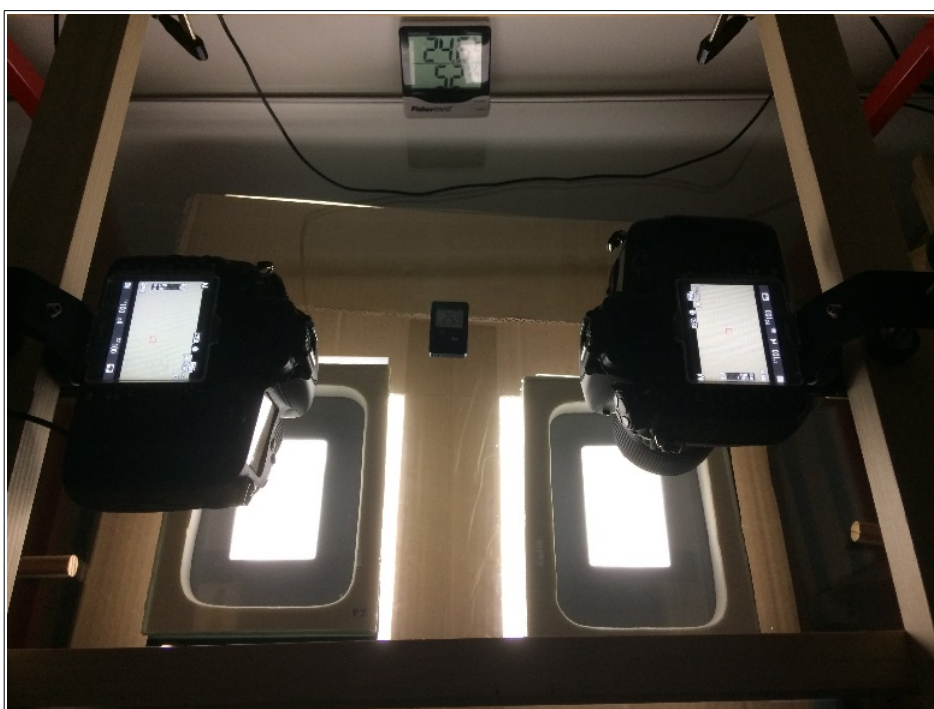


Figure 24 : Photo du dispositif expérimental. Deux postes d'enregistrements placés côte à côte comprenant chacun un appareil photo, une arène (cadre polystyrène, papier calque en fond) avec une zone éclairée au centre, un suivi d'humidité et de température.

Pour cette étude, des groupes d'individus sont filmés dans une pièce sombre (sans lumière naturelle) en laboratoire en conditions d'éclairage, d'humidité et de température contrôlées (éclairage 50W, 5400K ; humidité :50 % RH $\pm$ 10 % ; température :25°C $\pm$ 1°C). Un dispositif sous forme d'arène (14 cm x 19 cm x 2 cm) en polystyrène extrudé (XPS) a été élaboré (figure 24). Celle-ci est placée sur une feuille de papier calque (qui diffuse la lumière), sur une table en verre et recouverte d'une plaque en verre aux dimensions du cadre pour éviter que les individus introduits ne s'échappent. Toute la surface au sol de l'arène n'est pas

filmée, ainsi les appareils photos (Nikon D810 ©) n'enregistrent que les mouvements des individus sur une surface restreinte (6,7 cm x 11 cm). La limite physique d'un environnement comme le bord d'une feuille ou l'arrêt d'un objet influence l'orientation des déplacements de ces organismes. L'utilisation d'un cache opaque noir autour de cette zone d'enregistrement devrait décourager les individus de sortir de la zone éclairée et ainsi limitera les effets des bords de l'arène. Deux postes d'enregistrements sont utilisés. Pour éviter un éventuel effet du poste d'enregistrement, les enregistrements des réplicats de chaque souche ont été équitablement effectués sur les deux postes. Comme plusieurs souches et espèces sont utilisées, nous avons été amenés à nettoyer à l'éthanol à 70° les cadres de polystyrène après chaque utilisation. Le papier calque disposé sous le cadre, sur lequel les individus se déplacent, est également changé entre chaque souche testée. Ces précautions sont à appliquer rigoureusement afin d'éviter toutes perturbations (notamment olfactive) entre les différentes souches.

L'enregistrement des vidéos s'effectue avec une fréquence de 25 images par seconde. L'objectif étant à une distance de 14,5 cm de la zone de netteté, un trichogramme est représenté par une surface de 35 pixels environ. Les vidéos sont prises à contre-jour uniquement sur la zone centrale éclairée de chaque arène pour augmenter le contraste entre le fond clair et les individus sombres, ce qui facilitera l'analyse *a posteriori* des vidéos.

2.3. Protocole expérimental :

a) Isolement des groupes d'individus :

À partir d'un tube d'élevage, dès émergence des adultes (mâles et femelles), ceux-ci doivent être isolés pour réaliser les réplicats (8 réplicats par souche). Seuls les individus adultes âgés de moins de 24 heures sont isolés (afin d'éviter des différences d'état physiologique trop importantes entre les individus). Avant d'isoler les réplicats, les tubes d'élevage sont placés dans une glacière en polystyrène contenant de la glace, sur du coton dans une boîte de pétri (il faut que la température au niveau du tube soit comprise entre 8 °C et 10°C, en dessous de cette température, les individus peuvent potentiellement subir des séquelles s'ils restent trop longtemps) pendant 5 minutes. Le froid agit comme un anesthésiant pour les insectes, leur activité ralentit jusqu'à s'arrêter à basse température. Quand la température ré-augmente, leur activité reprend et ils recommencent à se déplacer. Pour isoler les individus, on utilise le principe d'attraction vers la lumière et vers le haut (voir aussi chapitre précédent) pour orienter les déplacements des individus depuis le tube d'élevage jusqu'à un autre tube à essai miellé (avec une goutte de miel déposée au centre du tube). Les deux tubes sont joints et étanchéifiés à l'aide d'un papier absorbant enroulé à la jointure des tubes. En positionnant les deux tubes verticalement avec le tube miellé proche de la lumière, les individus vont avoir tendance à se diriger vers le tube miellé. À l'aide d'une loupe de table, nous pouvons compter les individus qui passent d'un tube à l'autre. Un isolat correspond à une sous-population d'environ 20 individus. Une fois que le nombre souhaité d'individus est isolé de l'élevage, on replace le tube d'élevage ainsi que le tube

réplicat dans la glacière pour pouvoir isoler un second réplicat à partir du tube d'élevage et compter une seconde fois les individus isolés. Les réplicats sont ensuite placés dans une étuve à 19°C pour la nuit, cela permettra aux individus de se nourrir et d'être dans les meilleures conditions d'activités pour les enregistrements vidéo.

b) Lancement enregistrement vidéo :

Les réplicats isolés la veille sont redispuestos au froid dans la glacière entre 8°C et 10°C pour ralentir l'activité des individus. Pendant le temps nécessaire à leur ralentissement physiologique, les appareils photos des deux postes d'enregistrements sont mis au point et à niveau. Le dispositif en arène est ensuite installé et bien positionné pour l'enregistrement, vitre supérieure ôtée. Avant chaque enregistrement vidéo, les individus sont introduits au centre de l'arène et pris en photo haute résolution (36 Mpx) pour recenser le nombre d'individus effectivement introduits et déterminer le sex-ratio de chaque réplicat (la détermination s'effectue en observant les différences morphologiques des antennes). En moyenne, 15 individus sont introduits pour chaque réplicat. Un délai de 3 minutes est nécessaire entre l'introduction des individus et l'enregistrement vidéo afin que les individus retrouvent un état d'activité en adéquation avec la température ambiante. L'enregistrement vidéo est ensuite lancé pour une durée de 5 minutes.

En utilisant la méthode de tracking basse résolution / haute fréquence décrite en troisième approche de la section II.4 (méthodes d'analyse d'images), cette caractérisation devient accessible comme expérience de routine (avec un phénotypage à haut-débit) et rajoute des informations pour la sélection de souches plus performantes (taux d'activité important, vitesse rapide) en lutte biologique.

2.4. Descripteurs du mouvement et analyses statistiques :

Une fois les vidéos analysées par Ctrax, les tables de données au format « matlab » sont importées dans le logiciel R pour effectuer les analyses. Chaque ligne de la table correspond à la détection d'un individu à un temps donné. L'ensemble des 22 souches comprenant 8 réplicats (8 x 15 individus) par souche représente ainsi une table de données de près de 10 millions de lignes et 11 colonnes indiquant : l'espèce, la souche, le réplicat, l'individu, le nombre d'individus simultanément détectés, le temps (en seconde), les coordonnées cartésiennes X et Y de l'individu, l'orientation estimée par le logiciel de l'individu (en radian), sa longueur et sa largeur (en pixel).

Les données de trajectoires sont analysées d'une part qualitativement, en les dessinant, et d'autre part quantitativement, en utilisant les fonctions du package R « trajr » récemment publié (McLean & Skowron Volponi 2018). Pour toutes les mesures impliquant un paramètre de distance parcourue, les données en pixels sont converties en centimètres (1 cm = 233 pixels).

Pour analyser qualitativement les trajectoires et les classer, celles-ci ont été graphiquement représentées pour chaque réplicat (l'ensemble des trajectoires de tous les individus détectés représentées sur

un seul graphique), imprimées et aléatoirement arrangées dans un document. En collaboration avec Robin Laugier, stagiaire de Master, nous avons séparément tenté de rassembler les réplcats selon le type de trajectoires observées. Nous en avons conclu aux mêmes résultats et classé les trajectoires dans les mêmes groupes.

Pour analyser quantitativement les trajectoires, il a été mesuré pour chaque fragment de trajectoire (non interrompue par un saut, une perte de tracking ou une sortie de la zone filmée), un indice de sinuosité du mouvement (S). Il correspond à la variation d'angles moyennée sur l'ensemble des changements de directions d'une trajectoire (Benhamou 2004). Plus S est faible, plus le parcours est linéaire. Ce facteur a été mesuré pour tout individu détecté en continu sur un minimum de 5 mm de distance parcourue.

En outre, un taux d'activité a été calculé, correspondant à la proportion du temps que chaque individu passe à se déplacer activement. Il a fallu en premier lieu identifier le seuil de vitesse minimum pour qualifier un déplacement comme actif. Nous avons estimé un déplacement comme actif à partir d'une vitesse supérieure à 0.1 cm.s^{-1} . Cette vitesse correspond en moyenne au déplacement d'un individu sur une distance de deux fois la longueur de son corps par seconde. Ce seuil a été appliqué à chaque déplacement d'individu de chaque réplcat pour mesurer le taux d'activité.

Enfin, les vitesses linéaires (centimètre par seconde) ont été mesurées en moyennant sur une fenêtre glissante de 25 images (correspondant à une seconde de la vidéo) les distances individuelles cartésiennes, puis analysées par réplcat et par souche. Seuls les individus détectés au moins 3 secondes lors de l'analyse de la vidéo sont utilisés pour l'interprétation de ces résultats. Cela représente environ 95 % du temps cumulé de détections soit environ 35 minutes d'observation de trajectoire par enregistrement de 5 minutes. Nous avons également enregistré les vitesses maximum de marches observées dans chaque réplcat.

Pour chacune des souches employant la parthénogenèse arrhénotoque comme mode de reproduction, le nombre de mâles et de femelles a été compté à partir des photos prises avant les enregistrements vidéos (figure 26). Le sex-ratio mesuré correspond au rapport entre le nombre de femelles et le nombre total d'individus introduits. Les espèces *T. cordubensis* et *T. cacoeciae* présentent naturellement un sex-ratio égal à 1 car ces espèces ne sont représentées que par des femelles.

Les différences entre souches et espèces des facteurs mesurés ont été testées en utilisant une ANOVA suivi d'un test post-hoc de Tuckey. Une analyse en composante principale (ACP) a en outre été réalisée pour tester les corrélations entre sinuosité, vitesse et taux d'activité par espèce (McLean & Skowron Volponi 2018). Les corrélations entre le sex-ratio et les autres variables (vitesse moyenne, taux d'activité moyen et sinuosité moyenne) ont été testées en utilisant le test de corrélation de Pearson. Un modèle linéaire testant les effets du sex-ratio ainsi que des espèces a été mis en œuvre.

IV.3. Résultats

3.1. Contrôle qualité

Afin de valider le dispositif expérimental, nous avons testé la répartition des individus dans l'arène (figure 25). L'objectif étant d'observer essentiellement la détection des individus majoritairement au centre du dispositif pour s'assurer qu'il n'y a pas de biais important induit par le dispositif (effets bords, répartition de la lumière). Nous avons observé que pour chaque souche, la répartition dans l'espace des individus est globalement centrée et symétrique autour du point d'introduction (au centre de l'arène). Ces observations suggèrent une intensité lumineuse répartie de façon suffisamment homogène ainsi que des effets de bords négligeables.

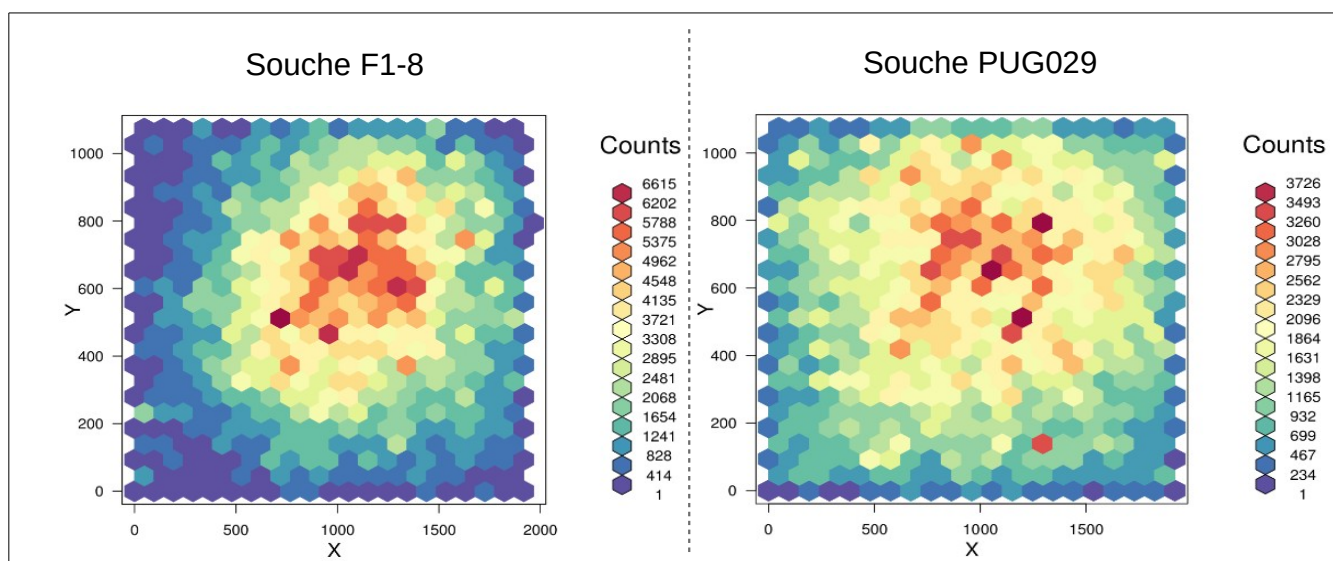


Figure 25 : Schéma représentant la fréquence d'observation des individus dans l'arène lors des enregistrements vidéo pour deux souches d'espèces différentes. Le gradient de couleur représente la densité d'observations effectuées dans chaque cellule hexagonale.

La méthode statistique utilisée pour tester le sex-ratio est la même que pour l'analyse des individus introduits. Les espèces à parthénogenèse arrhénotoque présentent une certaine variabilité intra-souche dans leur sex-ratio (0,85 en moyenne) avec essentiellement une proportion de femelles supérieure à celle de mâles. Cette variabilité s'explique par une sélection aléatoire des individus dans les élevages au moment de l'isolement des réplicats. Néanmoins, il existe quatre souches avec une proportion de mâles légèrement supérieure en moyenne à la proportion de femelles : deux souches de *T. evanescens* (BL082 et ESP459) et deux souches de *T. brassicae* (PR002 et PR010). Ces résultats sur le sex-ratio seront mis en lien avec les facteurs mesurés sur le mouvement pour chaque souche. Il est à ce stade envisageable que des différences soient observables sur le mouvement en raison des proportions de mâles et de femelles.

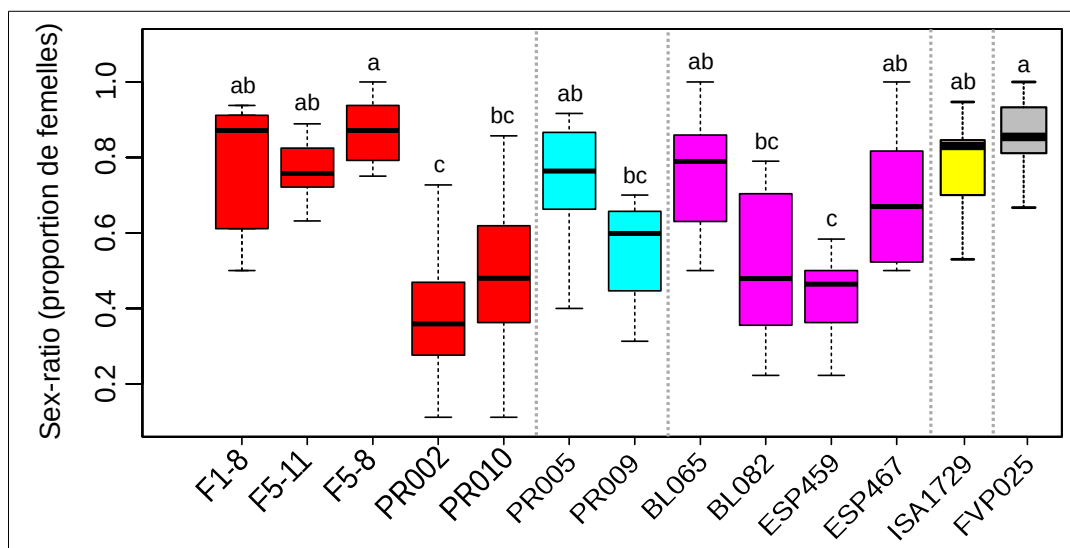


Figure 26 : Boxplot représentant le sex-ratio mesuré des souches à reproduction parthénogénétique arrhénotoque (B). Les couleurs définissent l'espèce à laquelle chaque souche appartient : *T. brassicae*, *T. euproctidis*, *T. evanescens*, *T. principium*, *T. semblidis*. Les lettres a,b,c indiquent les souches qui ne sont pas différentes significativement entre elles.

Le nombre d'individus introduits entre les différentes souches a été contrôlé en utilisant un test ANOVA basé sur les comparaisons de moyennes suivi d'un test post-hoc de Tukey. En moyenne, 16,2 individus ont été introduits pour chaque souche, néanmoins certaines souches (PJ, CAS134, BL082 et F5-11) s'écartent de cette valeur moyenne. Malgré ces quatre souches, les écarts à la moyenne restent modérés et les variations intra-souches restent comparables aux variations inter-souches dans la plupart des cas. Ces densités en individus affectant directement la quantité de données et ayant un impact sur les caractéristiques du mouvement (comme il sera présenté dans la section V), il faudra en tenir compte lors des analyses de vitesses et trajectoires.

3.2. Analyse qualitative des trajectoires :

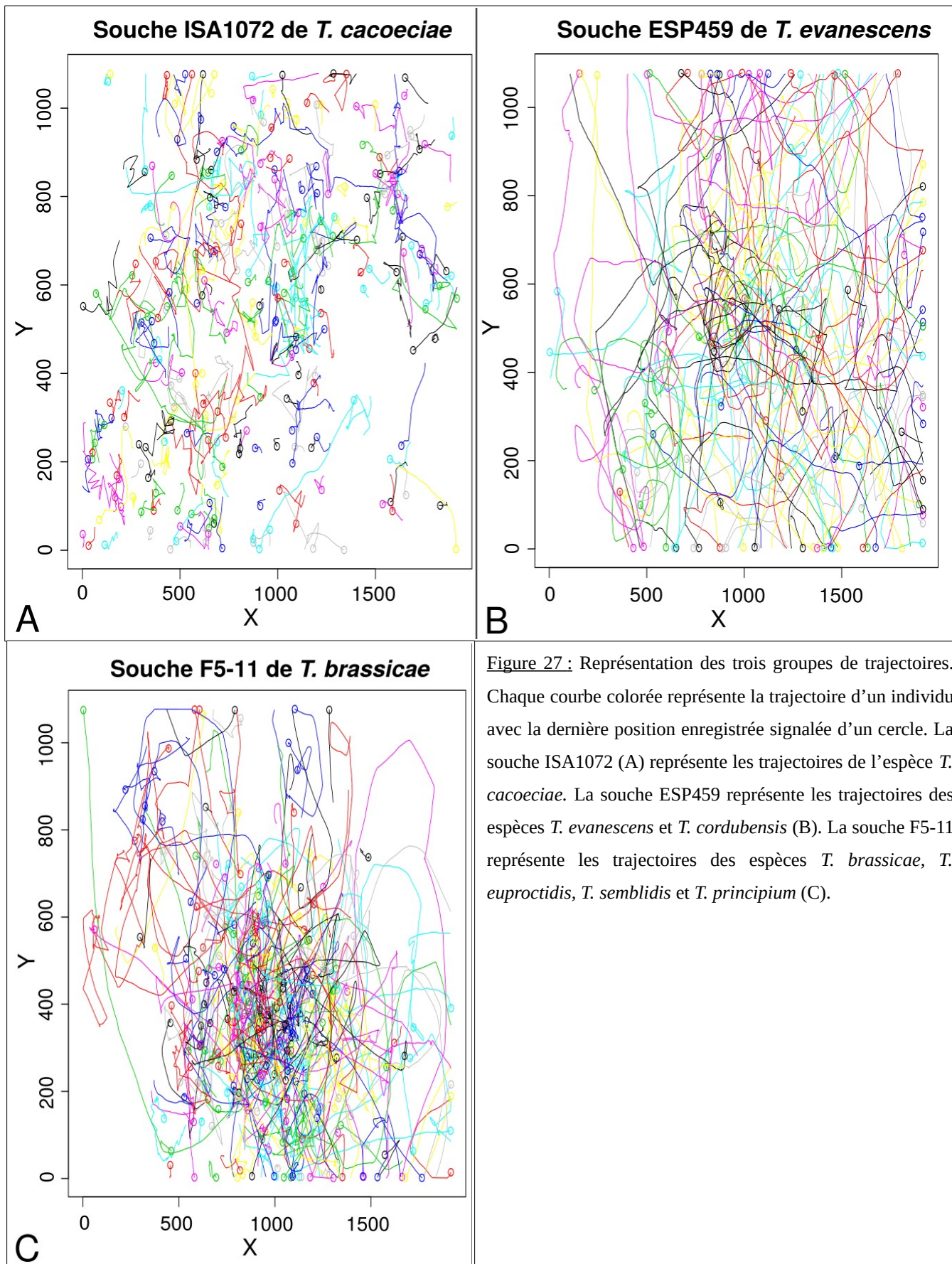


Figure 27 : Représentation des trois groupes de trajectoires. Chaque courbe colorée représente la trajectoire d'un individu avec la dernière position enregistrée signalée d'un cercle. La souche ISA1072 (A) représente les trajectoires de l'espèce *T. cacaoeciae*. La souche ESP459 représente les trajectoires des espèces *T. evanescens* et *T. cordubensis* (B). La souche F5-11 représente les trajectoires des espèces *T. brassicae*, *T. euproctidis*, *T. semblidis* et *T. principium* (C).

Un classement qualitatif visuel des trajectoires a été effectué. Différents types de trajectoires sont représentées dans la figure 27. Le premier type de trajectoire correspond à des trajectoires courtes à faible amplitude et très anguleuses (figure 4A). La totalité des souches de *T. cacoeciae* (PJ, PMbio1, ACJRY127, ACJRY131, ACJRY144 et ISA1072) font parties de ce groupe. Le second type de trajectoire correspond à des trajectoires de grandes longueurs et de fortes amplitudes sous forme d'allers-retours linéaires sans concentration des individus particulières dans l'espace (figure 4B). Ce groupe est caractéristique des espèces de *T. evanescens* et *T. cordubensis* (les 4 souches de ces deux espèces) soit BL065, BL082, ESP459, ESP467 de l'espèce *T. evanescens* et PUG029, CAS134, FLO241 de l'espèce *T. cordubensis*. Enfin, le dernier type de trajectoires se caractérise par des trajectoires plutôt longues et sinueuses, concentrées dans une zone de l'arène (figure 4C). Ce type de trajectoires est caractéristique des espèces *T. euproctidis* (PR005, PR009) et *T. brassicae* (F5-8, F5-11, F1-8, PR002 et PR010). Les souches FVP025 et ISA1729 appartenant respectivement aux espèces *T. semblidis* et *T. principium* appartiennent également à la troisième catégorie de trajectoires.

3.3. Taux d'activité

Nous avons mesuré les taux d'activité de chaque souche par individu pour observer sa distribution par réplicat. La distribution de ce taux d'activité n'est pas significativement différente entre les réplicats de chaque souche. Nous avons regroupé graphiquement les souches qui ne sont pas significativement différentes (figure 28). Nous pouvons observer que l'espèce *T. cacoeciae* est représentée par les souches les moins actives (taux compris entre 0,2 et 0,65). À l'inverse, l'espèce *T. evanescens* est caractérisée par un fort taux d'activité sur l'ensemble de ses souches (taux compris entre 0,8 et 0,95). Les autres espèces sont représentées par des souches dont les taux d'activité sont intermédiaires (entre 0,5 et 0,8) avec une variabilité entre souche d'une même espèce plus grande. Par exemple, l'espèce *T. cordubensis* présente peu de variabilité intra-souche mais une plus forte variabilité inter-souche avec une souche très active (PUG029), une autre peu active (FLO241) et une troisième intermédiaire (CAS134).

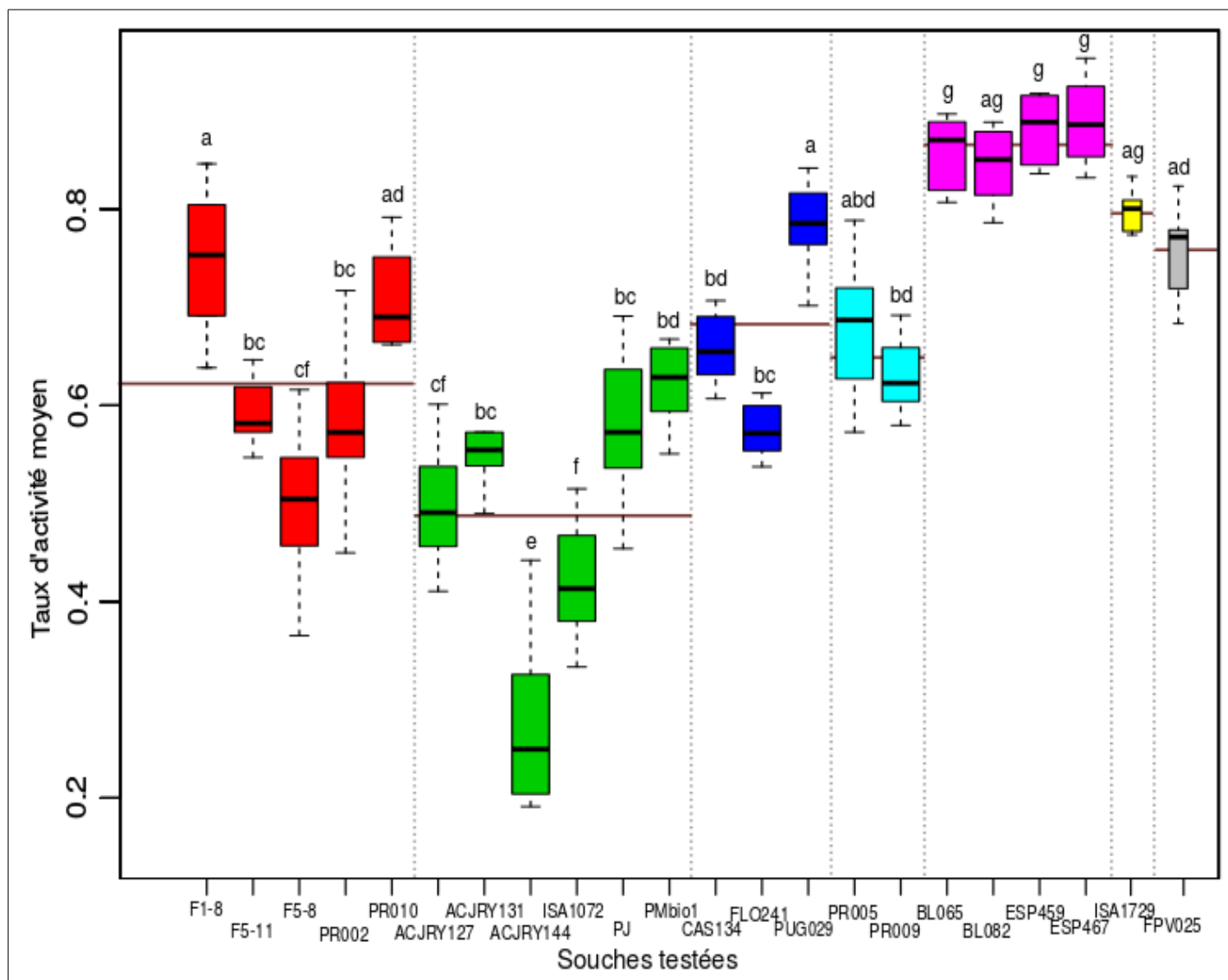


Figure 28 : Boxplot des taux (proportion) d'activité moyens de chaque souche. Les couleurs correspondent à l'espèce à laquelle la souche appartient : *T. brassicae*, *T. cacoeciae*, *T. cordubensis*, *T. euproctidis*, *T. evanescens*, *T. principium*, *T. semblidis*. Les lettres a,b,c,d,e,f,g indiquent les souches qui ne sont pas différentes significativement entre elles. Les segments marrons horizontaux représentent les valeurs moyennes par espèce.

3.4. Vitesse de déplacement :

Nous avons pu mesurer la vitesse moyenne de déplacements actifs (supérieurs à 1 mm.s^{-1}) par souche (figure 29). On observe une faible variabilité intra-souche et une forte variabilité inter-souches. Des groupes de souches dont les vitesses ne sont significativement pas différentes ont pu être établis. Il en ressort principalement que les souches les plus lentes appartiennent à l'espèce *T. cacoeciae* avec une vitesse moyenne comprise entre $0,19 \text{ cm.s}^{-1}$ et $0,32 \text{ cm.s}^{-1}$. Les souches les plus rapides appartiennent à l'espèce *T. evanescens* avec une vitesse moyenne comprise entre $0,4 \text{ cm.s}^{-1}$ et $0,57 \text{ cm.s}^{-1}$. Il existe une hétérogénéité au sein des autres espèces avec des vitesses moyennes plus intermédiaires. D'après ces mesures, un trichogramme se déplace donc à une vitesse différente selon la souche ou l'espèce considérée mais demeure peu variable entre individus d'une même souche.

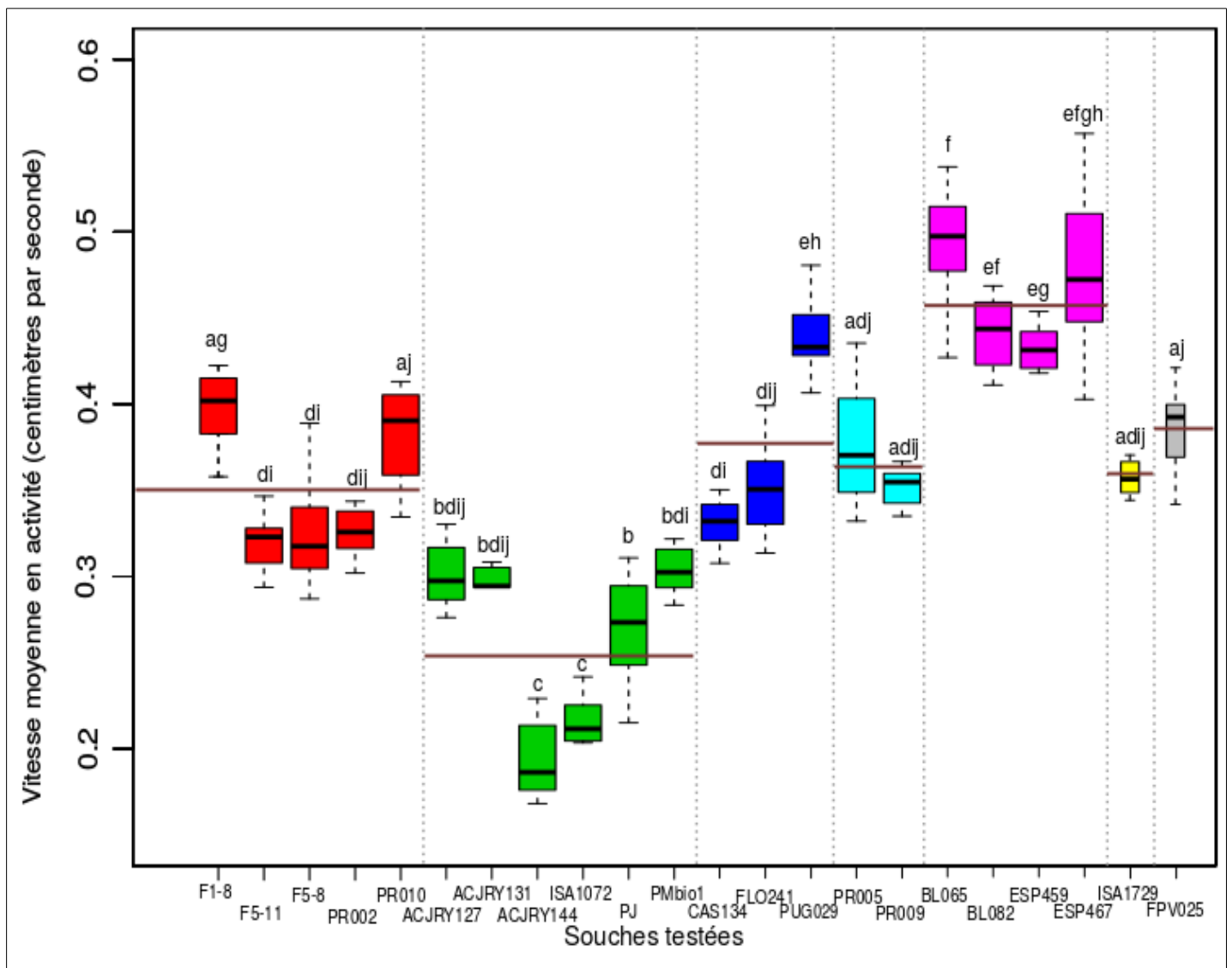


Figure 29 : Boxplot des vitesses moyennes en cm.s^{-1} actives en fonction de la souche testée. Les couleurs correspondent à l'espèce à laquelle la souche appartient : *T. brassicae*, *T. cacoeciae*, *T. cordubensis*, *T. euproctidis*, *T. evanescens*, *T. principium*, *T. semblidis*. Les lettres a,b,c,d,e,f,g,h,i, indiquent les souches qui ne sont pas différentes significativement entre elles. Les segments marrons horizontaux représentent les valeurs moyennes par espèce.

3.5. Sinuosité

L'indice de sinuosité (en radian) des trajectoires a été obtenu pour chaque individu s'étant déplacé d'au moins 5 mm sans interruption lors de l'enregistrement. On observe que cet indice est plus variable au sein de chaque souche que la vitesse et le taux d'activité. Nous avons tout de même pu établir des groupes de souches (figure 30). Les souches ayant les indices de sinuosité les plus faibles (inférieurs à 12) font partie des espèces *T. brassicae* (F5-11, PR002 et PR010), *T. cordubensis* (PUG029), *T. euproctidis* (PR005 et PR009) et *T. evanescens* (BL065). Les indices de sinuosités les plus élevés (supérieurs à 14) ont été mesurés chez les espèces *T. cacoeciae* (ACJRY131 et ISA1072) et *T. principium* (ISA1729). Les autres souches présentent des indices de sinuosités intermédiaires plus ou moins marqués néanmoins les souches de *T. evanescens* ont tendance à rester parmi le groupe des indices faibles de sinuosité.

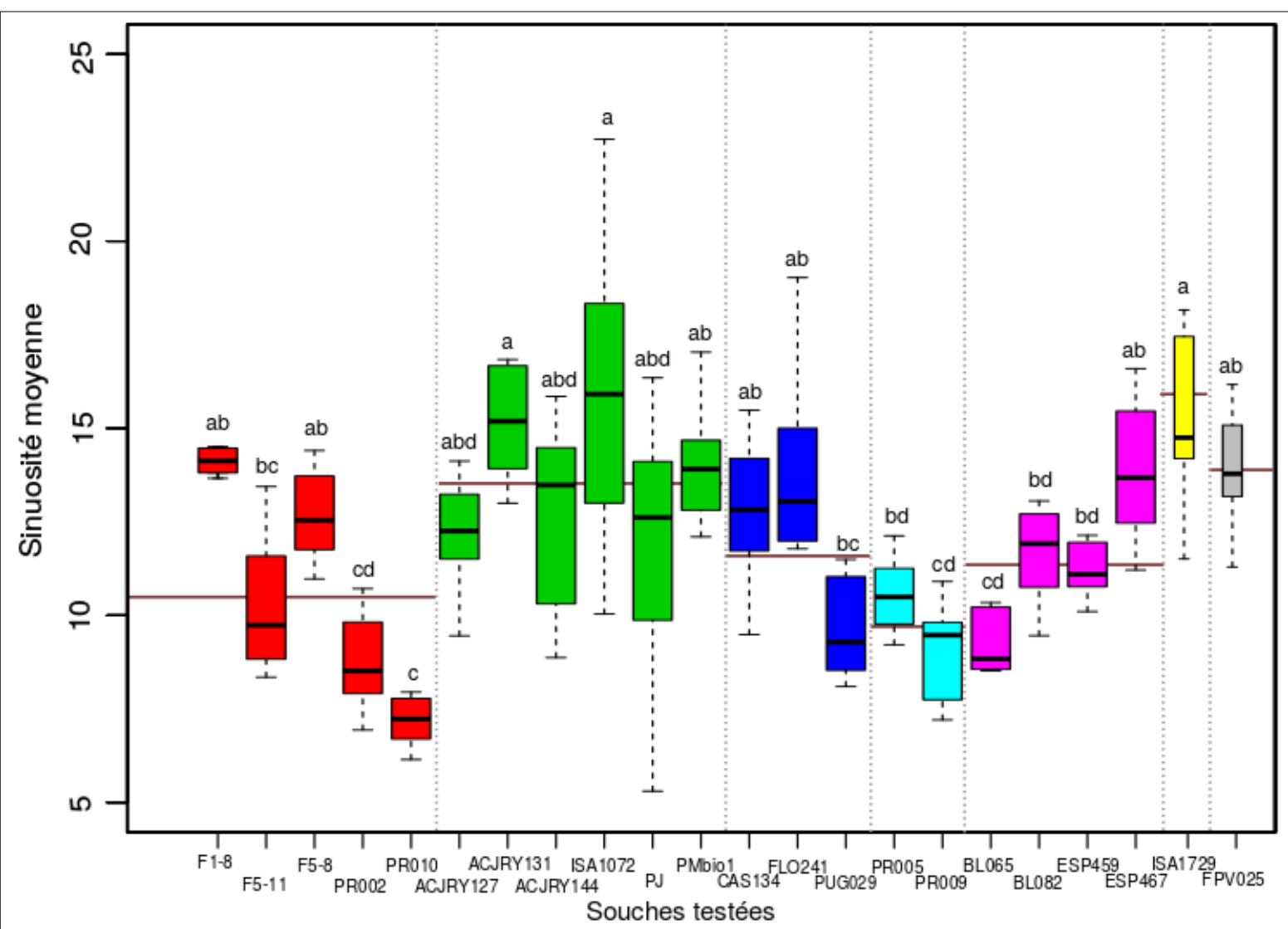


Figure 30 : Boxplot des sinuosités moyennes des trajectoires en fonction de la souche testée. Les couleurs correspondent à l'espèce à laquelle la souche appartient : *T. brassicae* (rouge), *T. cacoeciae* (vert), *T. cordubensis* (bleu), *T. euproctidis* (cyan), *T. evanescens* (magenta), *T. principium* (jaune), *T. semblidis* (gris). Les lettres a, b, c, etc., indiquent les souches qui ne sont pas différentes significativement entre elles. Les segments horizontaux marrons représentent les valeurs moyennes par espèce.

3.6. Corrélations entre les différents facteurs

En utilisant une analyse en composante principale (ACP), nous avons testé les corrélations entre la vitesse moyenne en activité, la vitesse maximum, le taux d'activité moyen et la sinuosité du mouvement au niveau réplicat et au niveau souche. Nous pouvons constater une très forte corrélation ($p < 0.001$ et $R^2 = 0.73$) entre le taux d'activité et la vitesse moyenne, l'absence de corrélation entre ces deux variables et la sinuosité du mouvement et enfin une corrélation faible ($p = 0.032$ et $R^2 = 0.12$) entre ces trois variables avec la vitesse maximum (figure 31).

Les deux variables composites PC1 et PC2 expliquent 61,1 % et 26,5 % de la variance. Elles sont associées respectivement à la vitesse moyenne et à l'activité, et à la sinuosité du mouvement. Au niveau des souches, nous sommes en mesure d'identifier des groupes de souches localisées dans une même zone graphique du plan principal.

Les souches appartenant à l'espèce *T. cacaoeciae* sont caractérisées par une vitesse moyenne faible, une activité moyenne faible et une sinuosité moyenne parmi les plus élevées. Les souches appartenant aux espèces *T. brassicae* et *T. euproctidis* sont caractérisées par une vitesse moyenne intermédiaire, une activité intermédiaire et une faible sinuosité. L'espèce *T. evanescens* se caractérise par une vitesse moyenne et une activité moyenne élevées et une sinuosité intermédiaire. Notons également que la souche la plus rapide est ESP467 appartenant à cette espèce.

Les souches appartenant à l'espèce *T. cordubensis* ne définissent pas un groupe en particulier, les valeurs des différentes variables sont intermédiaires. Il est difficile d'interpréter les résultats pour *T. principium* et *T. semblidis* au niveau des souches car elles ne sont représentées que par une seule souche, néanmoins au niveau réplicat, on observe que les réplicats de *T. principium* présentent une sinuosité moyenne globalement plus élevée que les autres.

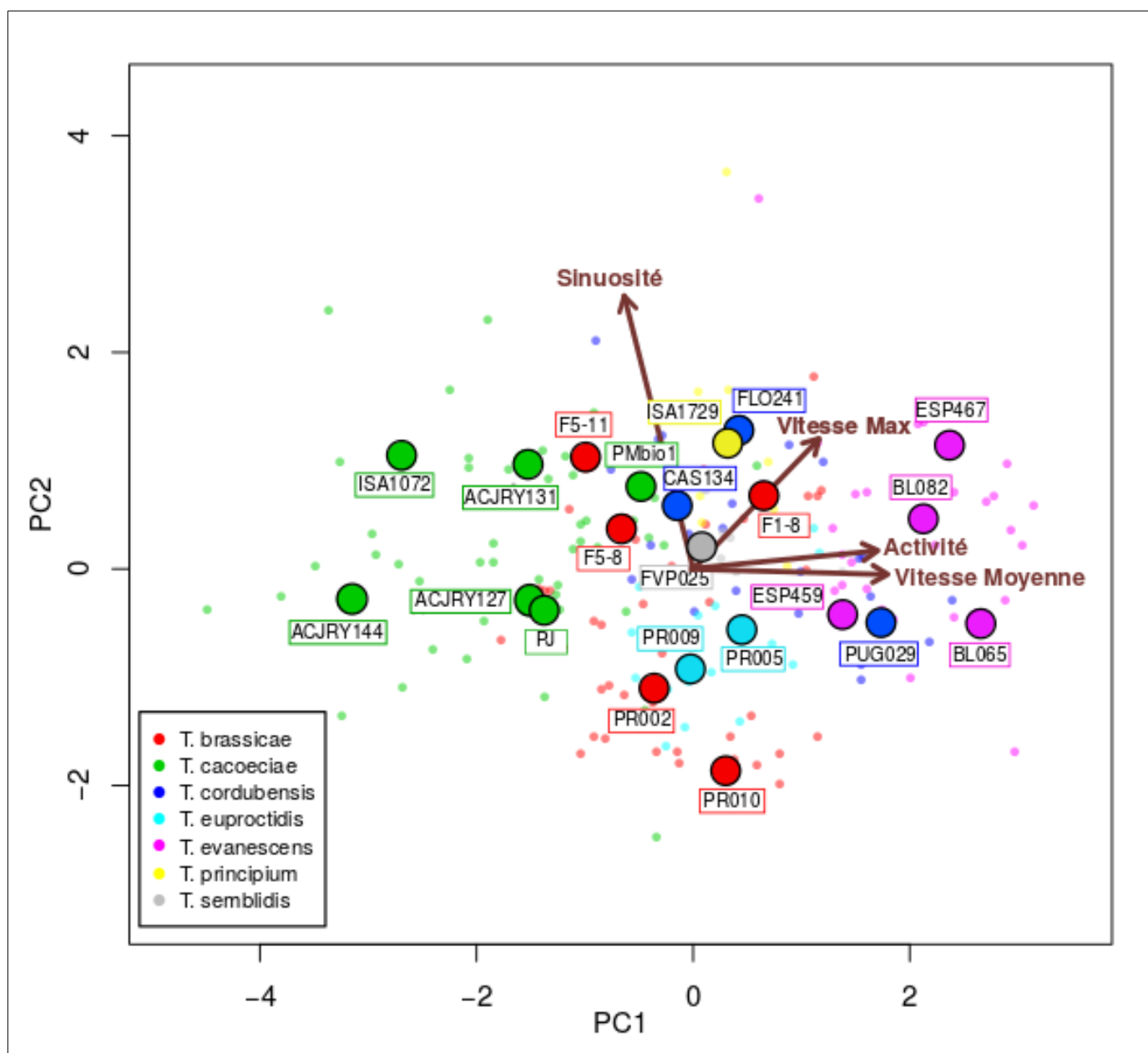


Figure 31: Analyse en composante principale pour tester les corrélations entre vitesse moyenne (mean_speed), activité moyenne (mean_activity), vitesse maximum (max_speed) et sinuosité des trajectoires (mean_sinusosity). Les gros points représentent la position moyenne de chaque souche, les petits points représentent les valeurs moyennes par réplicat.

3.7. Effet du sex-ratio

Nous avons testé la corrélation entre le sex-ratio estimé et les différents facteurs descriptifs pour les espèces à reproduction parthénogénétique arrhénotoque (test de corrélation de Pearson). Il s'est avéré que les corrélations ne sont pas significatives pour aucun des facteurs. La figure 32 présente les résultats pour les corrélations entre le sex-ratio et la vitesse moyenne (figure 32A) ou la sinuosité (figure 32B) du mouvement. Nos résultats n'indiquent pas de différences globales de l'influence des proportions de mâles et de femelles sur la caractérisation du mouvement à cette échelle. Les résultats du modèle linéaire testant l'effet des espèces et du sex-ratio n'ont pas révélé d'effet significatif particulier si ce n'est une interaction entre l'espèce *T. evanescens* et le sex-ratio pour la vitesse ($p\text{-value} = 2,47 \cdot 10^{-3}$) et la sinuosité ($p\text{-value} = 3,31 \cdot 10^{-5}$). Néanmoins, bien que le sex-ratio des répliquats varie entre 0 et 1, la quantité de données sur des répliquats à faible sex-ratio est très limitée (moins de 25 % des données). Les effets observés sur *T. evanescens* sont ainsi biaisés par ce manque de données. Nous pouvons considérer ainsi l'absence d'effet du sex-ratio sur la caractérisation du mouvement à cette échelle.

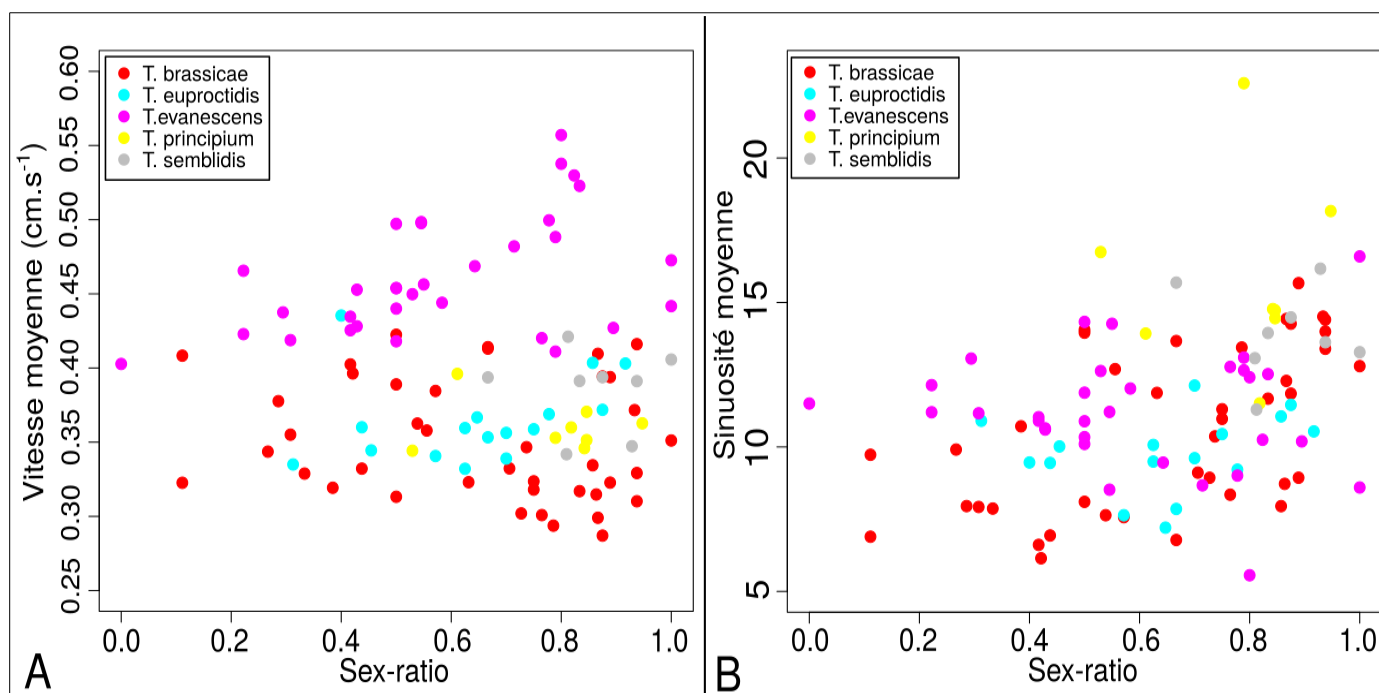


Figure 32 : Corrélations entre le sex-ratio et la vitesse moyenne mesurée par réplikat (A), entre le sex-ratio et la sinuosité moyenne mesurée par réplikat (B). L'effet du sex-ratio, de l'espèce et de l'interaction des deux facteurs ont été testés en utilisant un modèle linéaire.

IV.4. Discussion

4.1. Trajectoires, taux d'activité et vitesses

Le premier fait intéressant sur les interprétations qualitatives est qu'à partir de trajectoires non titrées (sans indications sur la souche) nous avons pu regrouper les souches d'une même espèce dans la même catégorie de trajectoire dans la plupart des cas. Cette expérience confirme donc l'existence d'une variabilité des stratégies de mouvement entre les espèces. La détermination des trajectoires d'exploration des espèces comporterait donc une composante génétique. Il a été montré par Brown et ses collaborateurs (2014), chez le crapaud buffle (*Rhinella marina*), que la tendance à effectuer des trajectoires plus ou moins linéaires peut présenter un déterminisme génétique. Ils ont observé une sélection des individus dont la sinuosité du mouvement est plus faible au front de la population avec une transmission génétique de ce caractère à la future génération (Brown et al. 2014). Ce déterminisme génétique est renforcé par nos résultats sur deux espèces en particulier : *T. brassicae* et *T. euproctidis*. En effet, ces deux espèces sont très proches génétiquement (Sümer Ercan et al. 2012), il est alors peu surprenant que les souches testées de ces espèces se situent dans les mêmes groupes de sinuosité, activité et vitesse. Par ailleurs, bien que nous ayons classé les espèces *T. principium* et *T. semblidis* parmi les trajectoires du deuxième type (figure 3), une seule souche de ces deux espèces est représentée dans cette étude rendant impossible la généralisation au niveau de ces espèces.

L'interprétation des différences quantitatives est plus subtile entre souches d'une même espèce. L'analyse en composante principale a également pu montrer la forte relation entre la vitesse et le taux d'activité avec de grandes valeurs pour l'espèce *T. evanescens* et de faibles valeurs pour *T. cacoeciae*. Il demeure toutefois possible qu'une espèce moins active (comme *T. cacoeciae*) utilise un mode déplacement alternatif qui lui permettrait de parcourir de plus longues distances, par exemple en sautant et se laissant porter par les courants d'airs. En effet, les faibles longueurs de trajectoires de cette espèce sont en grande partie dues à un nombre de sauts pendant l'enregistrement plus important que les autres espèces. D'après nos calculs, on peut estimer à 98 % la probabilité qu'un individu de l'espèce *T. cacoeciae* effectue au moins un saut au cours des 5 minutes de l'expérience alors que cette probabilité est d'environ 70 % pour les espèces *T. brassicae* et *T. evanescens* (qui sont les deux espèces représentées par le plus de souches dans cette étude avec *T. cacoeciae*). Ceci est un descripteur additionnel des trajectoires qui n'a pas été exploré ici mais qu'il sera intéressant d'incorporer aux analyses. Les espèces *T. brassicae*, *T. cordubensis* et *T. euproctidis* (représentées au moins par deux souches) se situent dans une tranche intermédiaire d'activité et de vitesse. La sinuosité des trajectoires représente quant à elle un descripteur indépendant des stratégies de mouvement. Nous pouvons remarquer que l'espèce *T. cacoeciae* a bien montré une sinuosité plus élevée que les autres espèces. Au vue des trajectoires brutes de cette espèce, très anguleuses, nous pouvions nous attendre à ce

résultat. Ceci suggère donc que deux descripteurs au moins sont requis pour caractériser les mouvements exploratoires des souches de trichogramme.

La variabilité des taux d'activités entre souches d'une même espèce et entre espèces pourrait être due à la provenance géographique des souches. Par exemple, les rythmes circadiens de souches de parasitoïdes de drosophiles *Leptopilina heterotoma* ont montré des différences significatives entre des souches provenant du pourtour Méditerranéen et du nord de la France (Fleury et al. 1995). Il est possible qu'une partie de la variation des mesures des taux d'activité soit liée au rythme circadien propre à chaque souche. Des enregistrements à différentes périodes dans la journée pourraient éclaircir cette hypothèse.

Un lien entre l'activité et la performance de parasitisme ne peut être établi avec l'approche menée dans cette étude (il n'y avait pas d'hôtes). Nous pouvons néanmoins supposer, comme il est classiquement fait, qu'une espèce plus active pourrait avoir un taux de rencontre des hôtes plus important qu'une espèce moins active. Il a été montré sur les larves d'espèces de Lépidoptères du genre *Heliothis* sp. (Hopper & King 1984) que le taux de consommation était positivement corrélé avec leur taux d'activité.

En outre, la qualité (composition génétique, pureté) des élevages n'ayant pas été suivie pendant les mois d'expérimentation, il est également envisageable que des changements de composition génétique ou des changements comportementaux liés à une certaine plasticité peuvent être induits par les techniques d'élevages et ont un impact sur la répétabilité des résultats. Par exemple, un changement de comportement a déjà pu être montré par Bergeijk et ses collaborateurs sur le taux d'acceptation d'hôtes différents de l'hôte de laboratoire (van Bergeijk et al. 1989). Une modification de la composition génétique lors de l'élevage de trichogrammes a aussi été observée chez *T. minutum* impliquant des modifications de la qualité des agents de lutte biologique pour l'espèce hôte ciblée (Liu & Smith 2010). La faible variabilité intra-souche observée sur les vitesses de déplacement et les taux d'activité est très prometteuse pour intégrer ces traits phénotypiques à la caractérisation d'une souche. Bien qu'il existe un lien indéniable entre la taille d'un individu et sa vitesse (Heglund and Taylor 1988), un lien tout aussi important existe entre la taille de l'hôte et celle du parasitoïde (Bai et al. 1992). Dans notre expérience, l'hôte utilisé est identique pour chaque souche/espèce testée. Même si nous ne l'avons pas quantifiée à ce stade, il est donc vraisemblable que la variabilité de taille dans nos élevages soit faible. Des études de répétabilité sont néanmoins à approfondir.

4.2. Effet du sex-ratio

Le sex-ratio des souches se reproduisant par parthénogenèse arrhénotoque a été identifié comme très variable et non contrôlé lors de l'introduction d'individus dans le dispositif. Ces hétérogénéités du sex-ratio sont probablement dues à un effet d'échantillonnage lors de l'isolation des réplicats. Il a déjà été observé des stratégies d'exploration différentes selon le sexe chez la mouche méditerranéenne de fruit *Ceratitis capitata* (Hendrichs et al. 1991]) et chez les nématodes entomopathogènes de la famille des Steinernematidae (Lewis

& Gaugler 1994). Les hétérogénéités observées pourraient avoir un impact sur les différences de mouvements observées au sein et entre souches (les mâles et les femelles n'ayant probablement pas les mêmes caractéristiques de mouvement). Bien qu'il soit possible d'identifier mâles et femelles à partir de photo (figure 33), la reconnaissance automatique par l'analyse de la vidéo effectuée sur le logiciel Ctrax ne permet pas de savoir si l'individu détecté est un mâle ou une femelle. Nous n'avons pas été en mesure de discriminer des vitesses et des trajectoires qui permettraient de sexer les individus à cette échelle spatio-temporelle. Il semble toutefois ne pas y avoir d'association forte entre le sex-ratio et les caractéristiques du mouvement à cette échelle. En outre, les deux espèces thélytoques de cette étude (*T. cacoeciae* et *T. cordubensis*) ne ressortent pas comme étant différentes des espèces arrhénotoques. Néanmoins, une amélioration possible du dispositif serait de coupler tracking vidéo avec une approche haute-résolution / basse fréquence (du type de celle utilisée dans la section suivante) afin de pouvoir réattribuer régulièrement un sexe aux individus suivis. Une autre approche serait bien sûr d'étudier séparément des groupes de mâles et des groupes de femelles, toutefois ceci, représente un travail supplémentaire important en amont, réduisant le débit de données atteignable. En outre, les femelles sont naturellement en présence de mâles en conditions de terrain ou de lâchers de lutte biologique, ainsi, l'éventuelle interaction entre les deux sexes est biologiquement pertinente.



Figure 33 : Différenciation mâle / femelle sur les photos prises de chaque réplicat avant le déplacement actif des individus. Remarquez la morphologie distincte des antennes chez le mâle.

IV.5. Conclusion

Cette étude sur la variabilité de traits phénotypiques liés aux mouvements d'exploration a permis d'établir des différences (vitesses, activité et sinuosité) entre espèces. Nous avons pu caractériser un grand nombre de souches (22 souches) et quantifier la variabilité intra- et inter-souche. La principale conclusion de cette section porte sur la faible variabilité intra-souche observée des vitesses et taux d'activité.

Le dispositif utilisé est donc un bon outil de caractérisation à haut-débit de ces traits car pour un enregistrement de quelques minutes, une quantité de données individuelles très importante est récoltée. Les

performances d'analyses de vidéos s'améliorent continuellement, de nouveaux logiciels se développent et des outils d'analyse (comme le package « trajr » : McLean & Skowron Volponi 2018) permettent aux scientifiques en Écologie d'analyser plus finement leur modèle biologique.

Les analyses des vidéos issues de la collaboration avec Aline Bertin sur la caractérisation du mouvement de sous-populations issues du cœur ou du front d'une population en expansion et l'évolution de ces caractères (suivi sur plusieurs générations) tentera d'établir un lien entre la position des individus dans une population en expansion et l'évolution des stratégies de déplacements (sinuosité, vitesses) de ces individus comme il a pu être montré chez le crapaud buffle (Brown et al. 2014). Nous avons utilisé ce dispositif et cette méthode pour étudier cette autre problématique, néanmoins, par manque de temps, la finalisation des analyses des vidéos se fera *a posteriori* de cette thèse.

V. Effets de la densité initiale d'individus et du niveau d'agrégation des ressources sur la dynamique de propagation et le parasitisme de *Trichogramma cacoeciae*

Un travail effectué en collaboration avec Guy Perez (2017-2018) et Aymen Fareh (2017).

Cette section correspond aux travaux les plus avancés dans le cadre de ma thèse. J'ai conduit des études préliminaires sur l'effet de la distribution spatiale de ressources sur le comportement du trichogramme à une échelle individuelle qui m'a permis d'élever ma réflexion au niveau populationnel et d'entreprendre la présente étude. Cette étude sera donc présentée sous la forme d'un article scientifique en anglais dans la perspective d'une soumission prochaine à journal Journal of Animal Ecology. Le matériel et les méthodes d'analyses d'images ont été présentées dans la section II.3 de la thèse et sont re-décrits (plus succinctement) dans le manuscrit qui suit. Les figures ont été numérotées de 1 à 6 et leur légende inscrite à la fin de cette section.

When complex movement yields simple dispersal: a high throughput study of spatial spread and parasitism in an egg parasitoid

Burte, V., Perez, G., Mailleret, L. & Calcagno, V*

Université Côte d'Azur, INRA, CNRS, Institut Sophia Agrobiotech

400 route des Chappes

06903 Sophia Antipolis CEDEX

*author for correspondence: vincent.calcagno@inra.fr

Abstract

1. *Trichogramma* sp. are among the most studied biological control agents around the world and are used against a broad range of pest species. Nonetheless, their use can still be improved and their behavior further understood. Specifically, the movement and dispersal of biological control agent are considered as two of the essential components for the success or failure in the field. The minute size of trichograms makes this particularly challenging to study. Most existing work address either very fine (behavioral) or fairly large (populational) spatial and temporal scales.
2. We propose a novel experimental approach in laboratory conditions to understand the effects of population density, host presence and the spatial distribution of hosts on both distribution and dispersal, and performance of *Trichogramma cacaeciae*.
3. We built an original experimental setting in which a 6-meter long linear arena is folded as a double spiral. By taking high-resolution pictures every minute and using dedicated image analysis methods, we could track a population over several meters and eight hours, thus bridging the behavioral and populational scales.
4. We showed that host presence had a positive impact on the diffusion capacity of trichograms regardless of their spatial distribution. Furthermore, a higher initial density of parasitoids lead to a greater diffusion rate than a lower initial density, at least during the first four hours of the experiment. We also discussed the nature of two types of individuals "explorer" and "sedentary" individuals and its link to dispersal capacity.
5. The presence of hosts in an environment could motivate individuals to keep searching during the whole experimental time. We could predict the dispersal capacity using movement value and estimate it as an objective characteristic to select potential parasitoid biological control agents.

Keywords: Behavior, diffusion, host distribution, image analysis, MSD, Trichogramma

INTRODUCTION

The movement and dispersal of organisms through their environment are fundamental processes affecting a range of biological scales, from individual fitness, to population dynamics and spatial spread, and ultimately to gene flow and evolution (Bowler & Benton 2005). Movement is a complex phenomenon arising from individual behavior and decision-making, but also shaped by population processes and landscape characteristics. As a result, the study of animal movement is intrinsically a multiscale question, requiring the integration of methods and concepts from several disciplines in behavior, ecology and physics (Bovet & Benhamou 1988; Turchin 1998).

Understanding the causes of variability in dispersal and their consequences for ecological dynamics has long been a major focus of ecological research, and remains one. For instance, among the 100 fundamental questions identified in a recent study, one can find the three following questions: “Do individuals in the tails of dispersal or dormancy distributions have distinctive genotypes or phenotypes?”; “How can we upscale detailed processes at the level of individuals into patterns at the population scale?”; and “How do species and population traits and landscape configuration interact to determine realized dispersal distances?” (Sutherland et al. 2013). Indeed, bridging studies of individual behaviour with population-level studies of dispersal is a major and crucial challenge if we are to better predict the response of populations to changing environments and landscape characteristics (Holyoak et al. 2008).

Movement is known to be critically influenced by several factors. First, the impact of population density has been demonstrated in many species. Increasing the density of individuals should increase the diffusion coefficient, as observed for marine biological systems (Rosenberg et al. 1997; Kuefler et al. 2012) or for the parasitoid wasp *Trichogramma minutum* (Riley, 1871; Mills & Lacan 2004). At a populational and intergenerational scale, density of individuals had a huge impact for organisms with density-dependent growth and migration or dispersal. Some organisms have to reach a density threshold to migrate efficiently in fragmented environment as is the case of *Trichogramma chilonis* (Morel-Journel et al. 2016). A positive density-dependence on dispersal could occur for high population density whereas the opposite might be observed for low population density (negative density-dependence dispersal) could be observed for low density populations (Fronhofer et al. 2015). The density of individuals also implied a change in the number of competitors in a given environment. Behaviours such as aggressivity and time allocations could be affected by competitors. For instance, the presence of competitors in environment affected the foraging behavior of parasitoid wasps : time allocation and oviposition strategies were directly and indirectly affected by the presence or absence of competitors even if they came from the same species (Mohamad et al. 2015; Robert et al. 2016).

Second, another important determinant of the rate of population spread is the presence of resources (food or hosts) and their spatial distribution (Costamagna et al. 2004; Prange et al. 2004; Bieber & Ruf 2005; [Sheppard,Preen,Marsh,Lawler,Whiting & Jones 2006]).

Technological innovations have recently revolutionized our capacity to acquire data about animal movement, both in the field (Cagnacci et al. 2010) and in the lab (Mallard et al. 2013; Geissmann et al. 2017). In particular, studies of movement in the lab have benefited from developments in image acquisition and computer vision, allowing for unprecedented avenues in the tracking of entire populations and automatic detection of life-history events and behavioural changes (Holyoak et al. 2008; Reiser 2009; Pennekamp & Schtickzelle 2013; Valetta et al. 2017) while benefiting from the power of experimental laboratory approaches. Long restricted to individual behaviour or specific temporal and spatial scales, experimental studies can now extend to entire groups and larger scales (Kuefleret al. 2013; Schneider & Levine 2014; Fronhofer et al. 2015).

In this study, we propose a novel experimental approach to study population spread of a small insect parasitoid, and examine the effects of population density and resource distribution on movement, dispersal and parasitism. Our study system is a minute parasitoid wasp from genus *Trichogramma*, and a major biological agent (Cônsooli et al. 2010). Taking advantage of the extremely small size of our model (less than half a millimeter), of a dedicated experimental system and of high-definition camera sensors, we were able to track in continuous time the propagation of dozens of individuals at ecologically relevant temporal and spatial scales: several meters and one entire day. These scales are comparable to the dispersal distances typically covered in the field by trichograms in one day, and most movement and parasitism is known to take place within the second and third days (Ayvaz et al.

2008; Pizzol et al. 2012). Furthermore, trichograms are egg parasitoids so that their hosts are immobile and their distribution can be experimentally controlled with great precision.

We used our experimental system to study the effects of population density, host presence and host distribution (diffuse versus clumped) on the propagation dynamics of populations, shading light on the intricate connections between movement, parasitism and dispersal.

MATERIALS & METHODS

Study species and rearing conditions

Experiments were conducted with *Trichogramma cacoeciae*, sampled in 2014 near Pugère (Vaucluse, France). Species identity was confirmed by morphological analyses and COI barcoding. Live individuals from this strain are available (ID code PMBIO1) from the Biological Resource Center in our institute. *Trichogramma cacoeciae* is a strictly thelytokous species, whose females give birth to genetically identical daughters by clonal reproduction (Cònsoli et al. 2010). They were reared on eggs of *Ephestia kuehniella* (the common laboratory host for trichograms, also used for sampling) with a 12:12 light/dark cycle, at 25°C and 19°C in order to get a development time of 14 days from host parasitism to adult emergence.

Experimental microcosm and modalities

Individuals were introduced in the center of a six meter (630 cm) long tunnel (1cm wide and 1cm high). To be able to cover it entirely with digital cameras in the lab, the tunnel was folded in the shape of a double spiral, thereby occupying only a surface of 48 by 60 cm (Fig. 1). The double-spiral arenas were carved into styrofoam plates, placed on a sheet of translucent paper and a glass plate (bottom), and sealed with another glass plate (top). The entire device was uniformly lit from below with a large light box (2600 lumens, color temperature 5400K). All experiments took place in a dark room with controlled temperature (24°C $\pm$ 1°C) and humidity (60% $\pm$ 10%). To control for potential topological effects, half spirals were levogyrous (turning to the left, as in Fig.1) and half dextrogyrous (turning to the right).

At the beginning of an experiment, at 9 a.m., the desired number of individuals (all aged 24 hours, previously isolated in a glass tube with honey as a food source, and briefly put at 9°C to slow them down prior to transfer) were introduced at the center of a double-spiral (spreading over about 10 cm) and immediately confined by putting the glass plate on top. The individuals were let in the double-spiral arena for eight hours, and at 5pm they were manually removed. The entire device was cleaned with 70% ethanol.

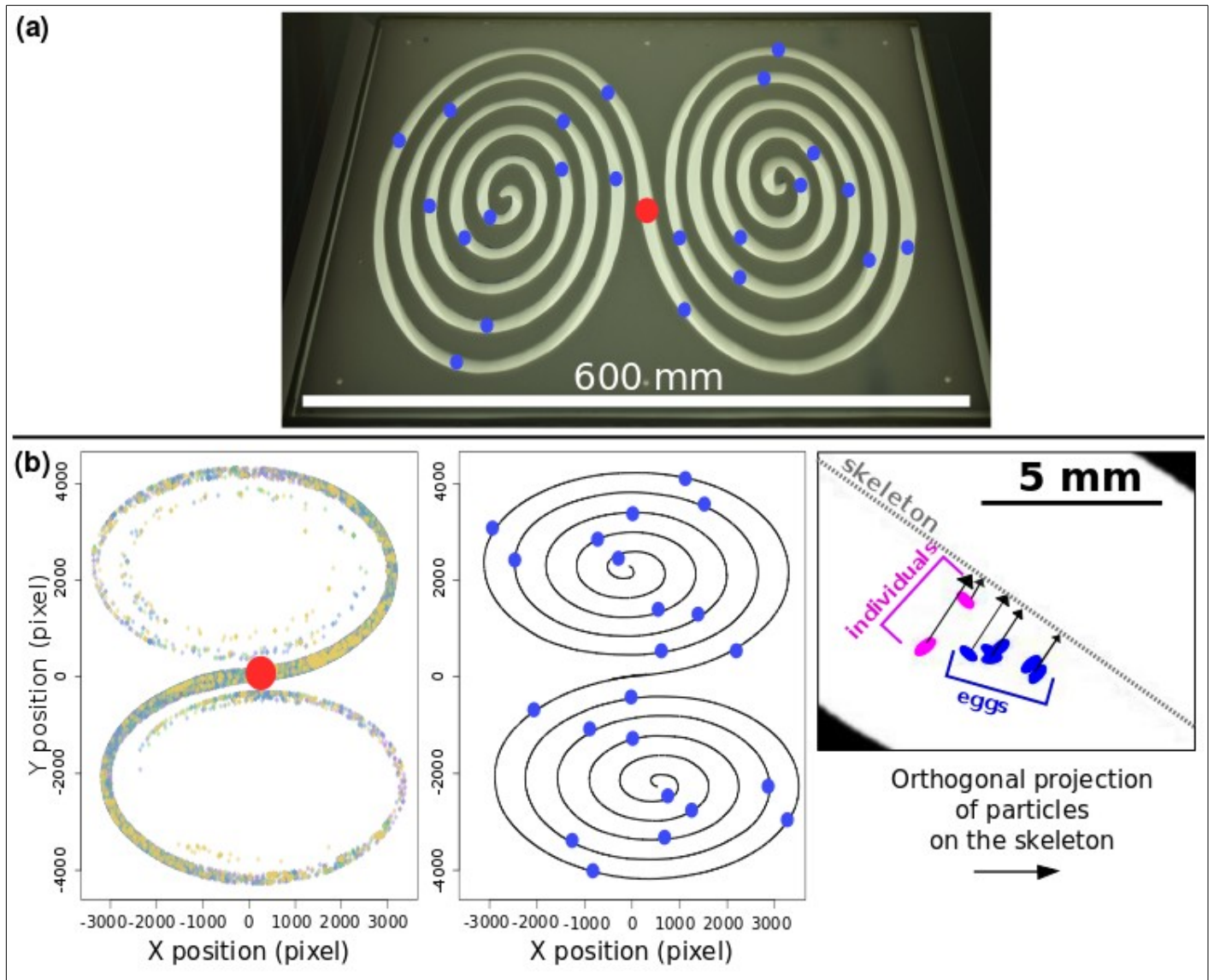


Figure 1

The number of individuals introduced was 25 ± 5 (Low Density treatments) or 70 ± 10 (High Density treatments). In addition, experiments were performed in which *Ephestia kuehniella* (Zeller 1879) host eggs were also put in the arena. In this case, unparasitized host eggs were beforehand placed on the bottom sheet of paper, transferred individually with a fine brush and water. Two types of host distributions were used: Diffuse (one egg every 5cm along the spiral tunnel, the first eggs 2.5 cm each side of the center), or Clumped (one patch of 6 eggs every 30cm along the spiral, the first 15 cm each side of the center). Eggs were approximately centered between the two walls of the tunnel. All experiments with hosts were conducted at High Density. The two host distributions realized on average the same host density (130 ± 2 eggs in total per arena). Overall we conducted four types of experiments, randomized over days between September 2017 and March 2018: (i) Low Density ($n = 20$ replicates), (ii) High Density ($n = 20$ replicates); (iii) High Density + Diffuse hosts ($n = 20$ replicates); and (iv) High Density + Clumped eggs ($n = 22$ replicates).

Image analyses and population tracking

After the introduction of parasitoids, high-definition pictures of the entire double-spiral arena were taken every minute for the entire duration of experiments (8 hours). In order to successfully visualize individual trichograms (0.5 mm long) at this large

spatial scale, two high-definition Nikon digital cameras were used, centered on each end of the spiral and covering half of it, for a total definition of 72 Mpx per minute. This definition ensured that trichograms appeared as dark objects of about 8 pixels on the light background. Images were stored in the memory-efficient RAW format, so that one replicate (2*480 images) represented about 220Go of data.

Images were subsequently analyzed with a custom pipeline written in ImageJ (Schneider et al. 2012) and similar to the method described by Mallard et al. 2013. Images were converted to TIFF RGB, imported to ImageJ, and converted to grayscale using a combination of brightness and saturation channels that maximized trichogram detection. Analysis then consisted in computing for each image a background image (as a moving window of 20 minutes), subtracting the background, thresholding, and particle analysis, yielding an ensemble of particles as putative trichogram detections. In parallel, the geometry of the double-spiral was resolved from the first image. Specifically, the skeleton of the tunnel was reconstructed. Raw particle data were then exported to R (R Development Core Team 2008). Based on coordinates, size, shape and position relative to tunnel boundaries, a filter was applied to remove spurious detections. Finally, data from the two cameras at each time were realigned and combined to obtain one set of particles along the entire spiral. Among other validation tests, the number of detections was checked to accurately predict the number of individuals introduced. Every minute, the settings retained identified on average 33% of all individuals, for various reasons including false negatives (detections incorrectly rejected) and non-detections (trichograms could not be seen on the walls where they occasionally venture). Finally, each particle was projected orthogonally on the skeleton of the double-spiral to be attributed a (linear) distance from the center along the tunnel, and pixel distances were converted to centimeters. In addition, if hosts were used, the location of each host egg was recorded, as well as its parasitism status after the end of the experiment: the bottom paper sheets was kept five days at 25°C, so that parasitized hosts turned black and could be counted.

Statistical analysis

For each replicate at every minute, we computed the Mean Square Displacement (MSD), representing the total quantity of movement. By regressing the MSD over time, we estimated diffusion coefficients (called D ; Turchin 1998). In addition, we computed at every minute the population quantiles, i.e. the distance from the release point within which a certain proportion of individuals is found. Confidence intervals were obtained for the MSD and the diffusion coefficient (D) using bootstrap percentile method, from 1000 resampling of replicates. Pairwise comparisons between modalities were performed with permutation tests. The distribution of individuals was compared to Gaussian by comparing percentiles. Several candidate models, in particular Gaussian mixture models with two or three components, were adjusted to the empirical distributions by maximum likelihood and compared using AIC. From parasitism data, the dispersal distance was calculated as the standard deviation of the distance from the release point and the parasitized hosts. All analyses were performed in R (R Development Core Team 2008). Piecewise linear regressions were performed using package segmented (Muggeo 2008).

RESULTS

Effect of parasitoid density and hosts on the rate of population spread

Population tracking provided, after filtering, a total of 761,409 trichogram detections. In all four treatments, the Mean Square Displacement (MSD) increased in a remarkably linear fashion with time (Fig. 2), conforming with standard random walk and diffusion theory ([Turchin 1998]). A noticeable exception was the High Density treatment, for which there was a marked slowing

down of population spread after about four hours. In this treatment, the variation of MSD with time was significantly better fitted with a piece linear model, with a change in slope occurring at $t = 3.95$ hours (p value = 0.031).

At Low Density, MSD increased linearly over time to reach 0.37 m^2 after eight hours, corresponding to a diffusion coefficient $D = 3.85 \cdot 10^{-2} \text{ m}^2 \cdot \text{h}^{-1}$ (Fig. 2a). At High Density, MSD initially increased at a significantly faster rate, achieving a diffusion coefficient $D = 5.87 \cdot 10^{-2} \text{ m}^2 \cdot \text{h}^{-1}$ (Fig. 2b). However this speed-up effect was only transient: after about 4 hours, the population rate of spread reverted to value not significantly greater than the value observed for Low Density treatments ($D = 2.85 \cdot 10^{-2} \text{ m}^2 \cdot \text{h}^{-1}$).

Such a slowing down was not observed in the presence of eggs. Rather, High Density treatments with hosts, Diffuse or Clumped distribution, population spread occurred at a similar fast rate, as observed in the absence of hosts, and greater than the rate observed at Low Density without hosts. However, no slowing down occurred, and the population kept spreading at this sustained rate throughout the eight hours of the experiments (Fig. 2 cd). As a consequence, the final MSD was much higher in the presence of hosts, reaching more than 0.51 m^2 for both Diffuse and Clumped distribution.

A three-fold increase in initial population density thus caused a roughly two-fold increase in the speed of population spread (diffusion coefficient), at least transiently (for the first four hours, in the absence of hosts). However, in the absence of hosts, the slowing down in the second half of the experiment at High Density made the final quantity of movement after 8 hours not significantly greater than at Low Density (permutation test; $p = 0.926$).

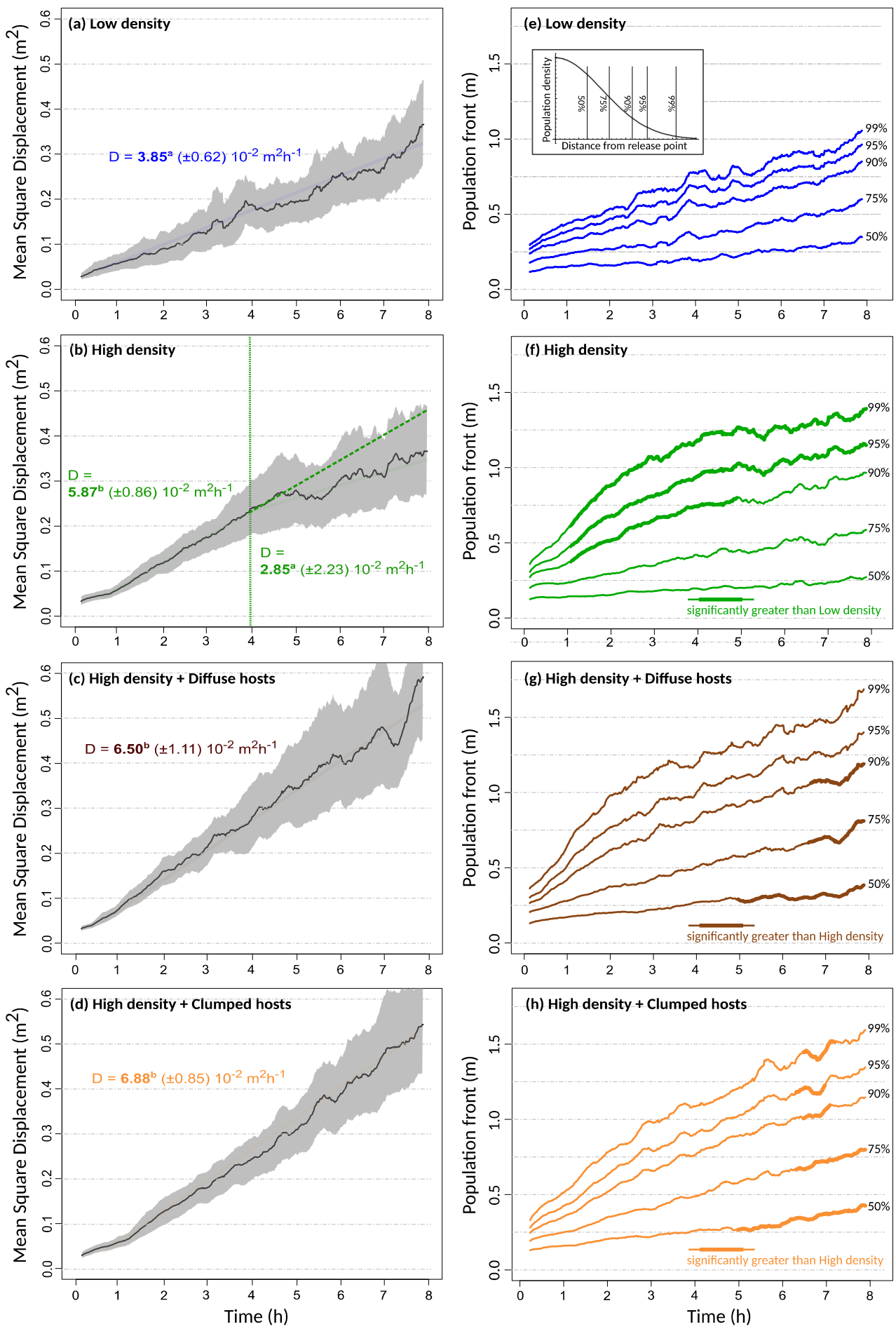


Figure 2

From our data we can further monitor spatial spread through the direct measurement of population quantiles, i.e. the distance from the release point containing a certain percentage of individuals. Figure 2 e-h represents the advancement of the core population (50% and 75% quantiles) and population front (90, 95 and 99% quantiles). At Low Density the tip of populations reached 1 meter at the end of the experiment (Fig. 2e), while High Density treatments went 50% farther, reaching 1.5 meter on average (Fig. 2f). This is fairly consistent with the two-fold increase observed for the diffusion coefficient, since 1.5 is close to the square root of two.

However, differences between treatments without hosts were not consistent depending on the part of the population considered. At High Density, populations spread faster than at low density but the difference was driven only by the tips of the population (90-99% fronts), while no difference was observed in the core of the populations (50 and 75% quantiles), on the contrary (Fig. 2f). As a result, although at High Density the final total quantity of movement (MSD after 8h) was no greater than at Low Density (Fig. 2a-b), high density populations still covered greater distances than low density populations. The 90% and 95% population fronts remained significantly greater throughout the entire experiment (Fig. 2e-f). Actually, populations at High Density covered a distance not significantly different from the treatments with hosts (about 1.5m; Fig. 2f-h). Population fronts behaved similarly at High Density, with or without hosts, despite the difference in the total quantity of movement. It is only the core of populations that caused the sustained rate of spread and greater total quantity of movement observed in the presence of hosts (Fig. 2g-h).

Individual distribution and heterogeneous diffusion

Consistent with the atypical behavior of population quantiles, the distribution of individuals differed markedly from the Gaussian distribution predicted from classical diffusion theory (Fig. 3). Only at the beginning of the experiments did individuals adopt a Gaussian distribution centered on the release point (Fig. 3). From about 30 minutes on, the shape of the distribution changed and became markedly leptokurtic, with an excess of individuals at very short distances and at very long distances (heavy tails), compared to Gaussian distributions with the same mean and variance. This was the case in all treatments and persisted throughout the experiment, though the shape kept changing dynamically.

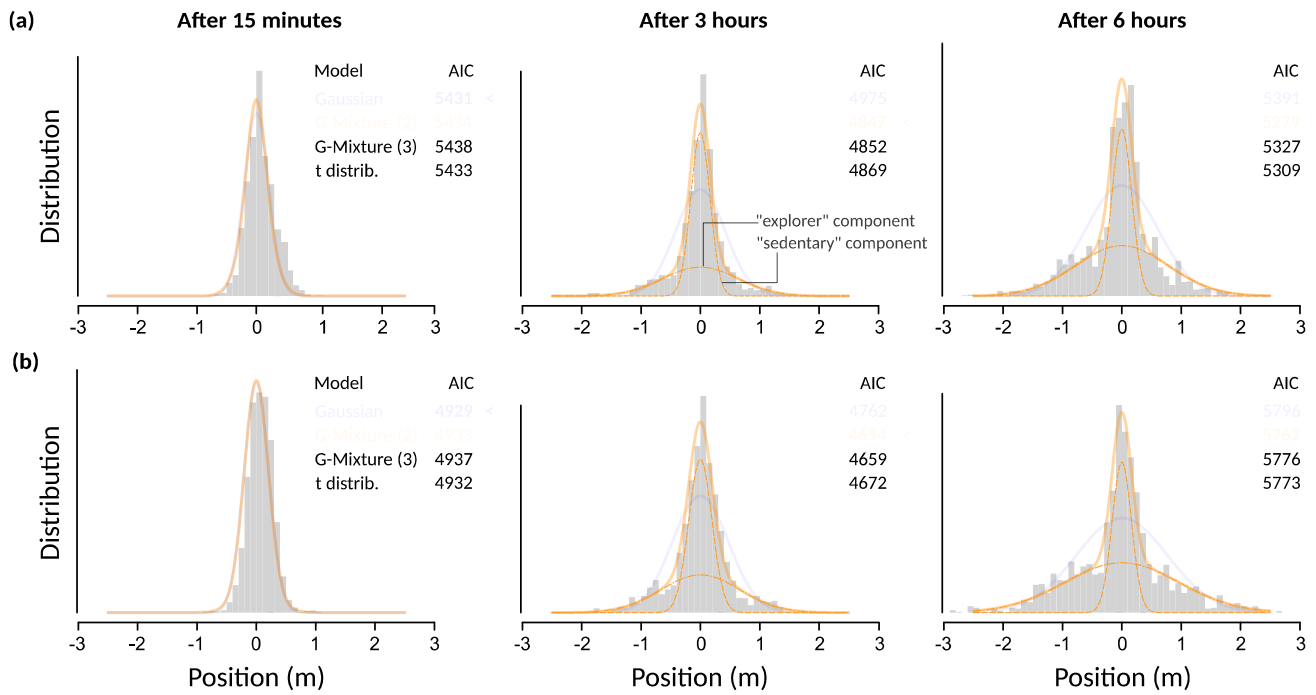


Figure 3

One possible explanation of such leptokurtic distributions is individual heterogeneity, resulting in heterogeneous random-walks (Turchin 1998; Petrovskii et al. 2011; Lewis, Maini & Petrovskii 2013). Gaussian mixture models revealed that a two-component mixture distribution fitted the observed data very well, and statistically outperformed both the simple Gaussian distribution and alternative leptokurtic kernels (3-component Gaussian mixture and t-distribution; Fig. 3). This suggests that two types of individuals, differing in their movement strategies, coexisted in the population. As is visible in Fig. 3, the first component, called the “sedentary” component, remains close to the central release point and diffuses very slowly, whereas the second component, called the “explorer” component, is much broader and constitutes most of the population fronts. From the mixture model fits, we can further infer the relative proportion of the two types.

Figure 4 presents the estimated proportion of “explorer” and “sedentary” individuals through time. In all cases, the initial population comprises a large majority of sedentary individuals, but their proportion steadily decreases, in favor of “explorer” individuals. In the absence of hosts, the two types of individuals end up being in balanced proportions (Fig. 4a-b). In contrast, the presence of hosts accelerated the rate of conversion from sedentary to explorer individuals: the two types of individuals became equally frequent after about three hours, and explorers eventually outnumbered the other type, representing about 60% of the population at the end of the experiments (Fig. 4c-d).

Therefore, parasitoid population density did not importantly affect the rate of switch from sedentary to explorer in the population. However, it made explorer individuals adopt a higher rate of movement, about twice as high ($8.12 \cdot 10^{-2} \text{ m}^2 \cdot \text{h}^{-1} \pm 1.13 \cdot 10^{-2}$), possibly reflecting some form of quorum sensing in the initial group. This explains why the effects of population density were expressed at the population fronts: the explorer individuals that comprise most of these population parts adopt a faster rate of spread.

In contrast, the presence of hosts significantly affect the behavioral dynamics in the group, resulting in a faster conversion from sedentary to explorer. The explorer individuals, however, adopted a rate of spread similar to that without hosts ($1.08 \cdot 10^{-1} \text{ m}^2 \cdot \text{h}^{-1} \pm 0.09 \cdot 10^{-1}$). This explains why the effects of host presence are most visible in the population core: this is where the shift from sedentary to explorer takes place.

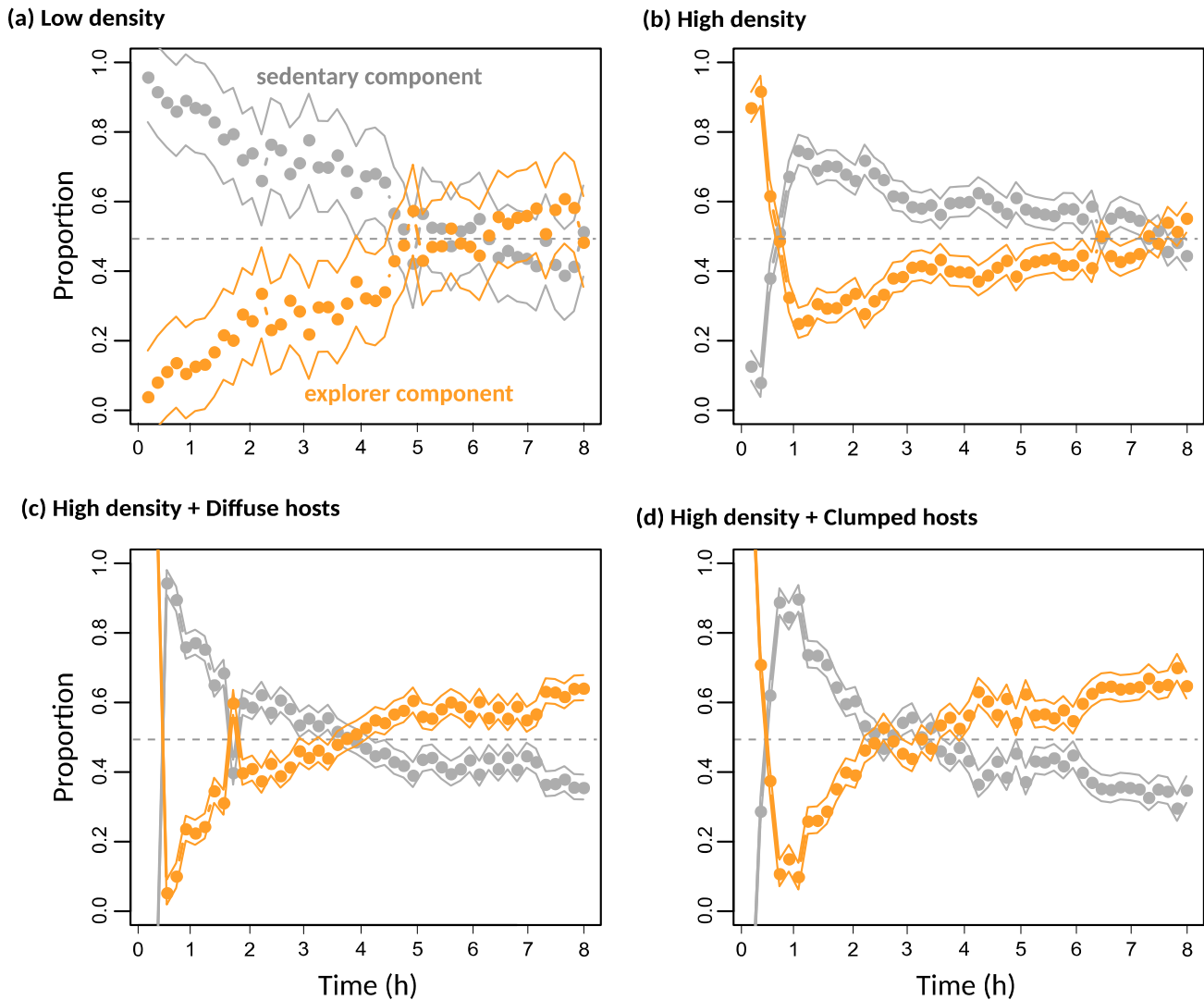


Figure 4

A further effect of host presence is that explorer individuals, in the absence of hosts, reduced their propagation speed after about four hours, explaining the general trend observed in Fig. 2b. In contrast, in the presence of eggs explorer individuals maintained the same elevated rate of spread (not shown). It is therefore likely that in the absence of hosts, the population fronts would eventually start to lag as well. This is also suggested by the appearance of significant differences in the 90-99% quantiles, and by the slower progression of the extreme fronts in the absence of hosts, towards the end of the experiments (Fig. 2f-h).

Predicting parasitism and dispersal

Consistent with the similar patterns of population spread with Diffuse and Clumped host distributions, these two treatments did not significantly differ in the total number of hosts parasitized (Fig. 5a) or in the average distance of parasitism events (defined as

dispersal distance; Fig. 5b). But despite the markedly leptokurtic distribution of individuals during population spread, and thus the even more leptokurtic integrated population density along the environment, the distribution of parasitism was almost perfectly Gaussian (Fig. 5c). In that, it complied with the classical assumption of population biology theory (Comins 1982; Tilman & Kareiva 1997; Gandon & Rousset 1999).

Individuals parasitized hosts at an average distance of 87 cm (Fig. 5b). The total parasitism rate culminated to an average 80% around the release point, and gradually decrease to almost undetectable beyond two meters (Fig. 5c). Note that this value exceeds the 99% population front, that was located at about 1.5m (Fig. 2g-h). This suggests that the explorer individuals, the only ones to be found at such long distances, were major drivers of total population parasitism.

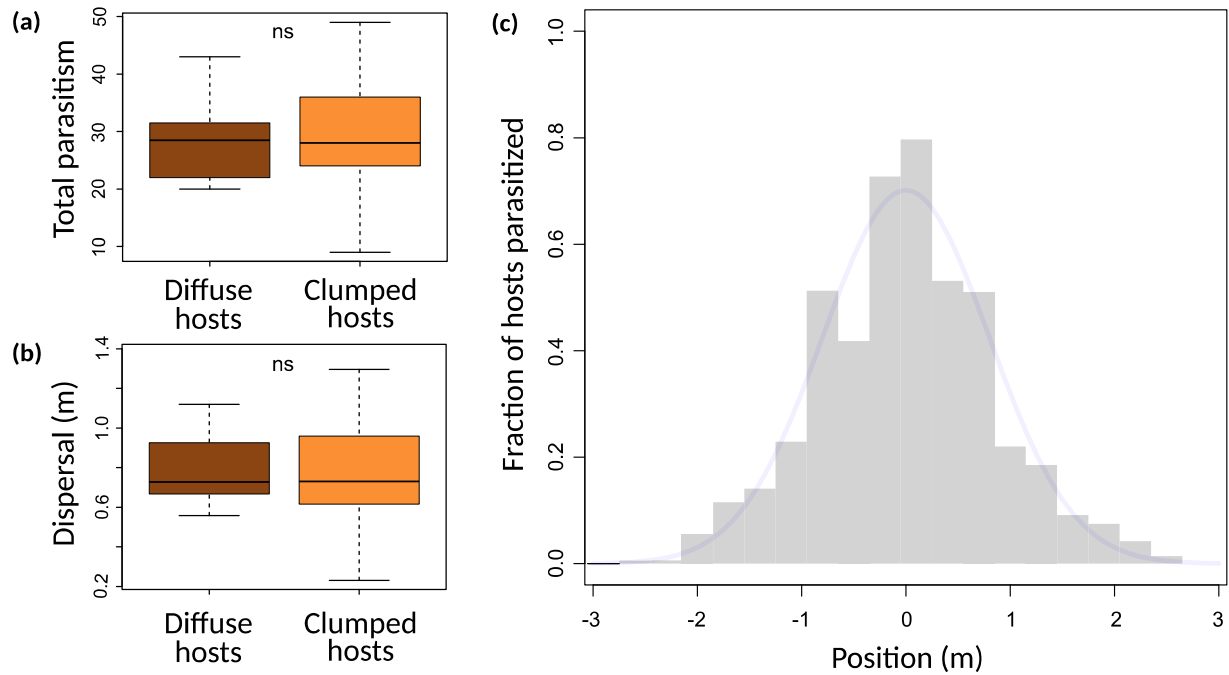


Figure 5

Confirming this, at the replicate level, total rate of parasitism and dispersal were well predicted by the position of extreme population fronts, but not by the position of the core population. Predictive power increases steadily with front position from 70%, and the best predictive power is achieved using the 97 or 98% quantiles (Fig. 6a). Prediction performance drops slightly beyond that point, probably because of the huge estimation uncertainty of extreme quantiles, and/or because the most advanced individuals did not have time to contribute to parasitism. Indicators of population spread were of course better at predicting dispersal (a spatial metric) than total parasitism (Fig. 6A-d). Movement (98% population front) was even better at predicting total parasitism than was dispersal (Fig. 6c-d). More surprisingly, the diffusion coefficient (or the total quantity of movement), albeit estimated with greater precision, were very bad at predicting anything (Fig. 6a). The realized diffusion coefficient failed to significantly predict total parasitism, whereas the advancement of the 98% population front could explain about 25% of the variance (Fig. 6c). Regarding dispersal, the diffusion coefficient achieved only half of the prediction capacity of the 98% population front (Fig. 6a). Therefore, the total quantity of movement turned out to be a poor predictor of dispersal.

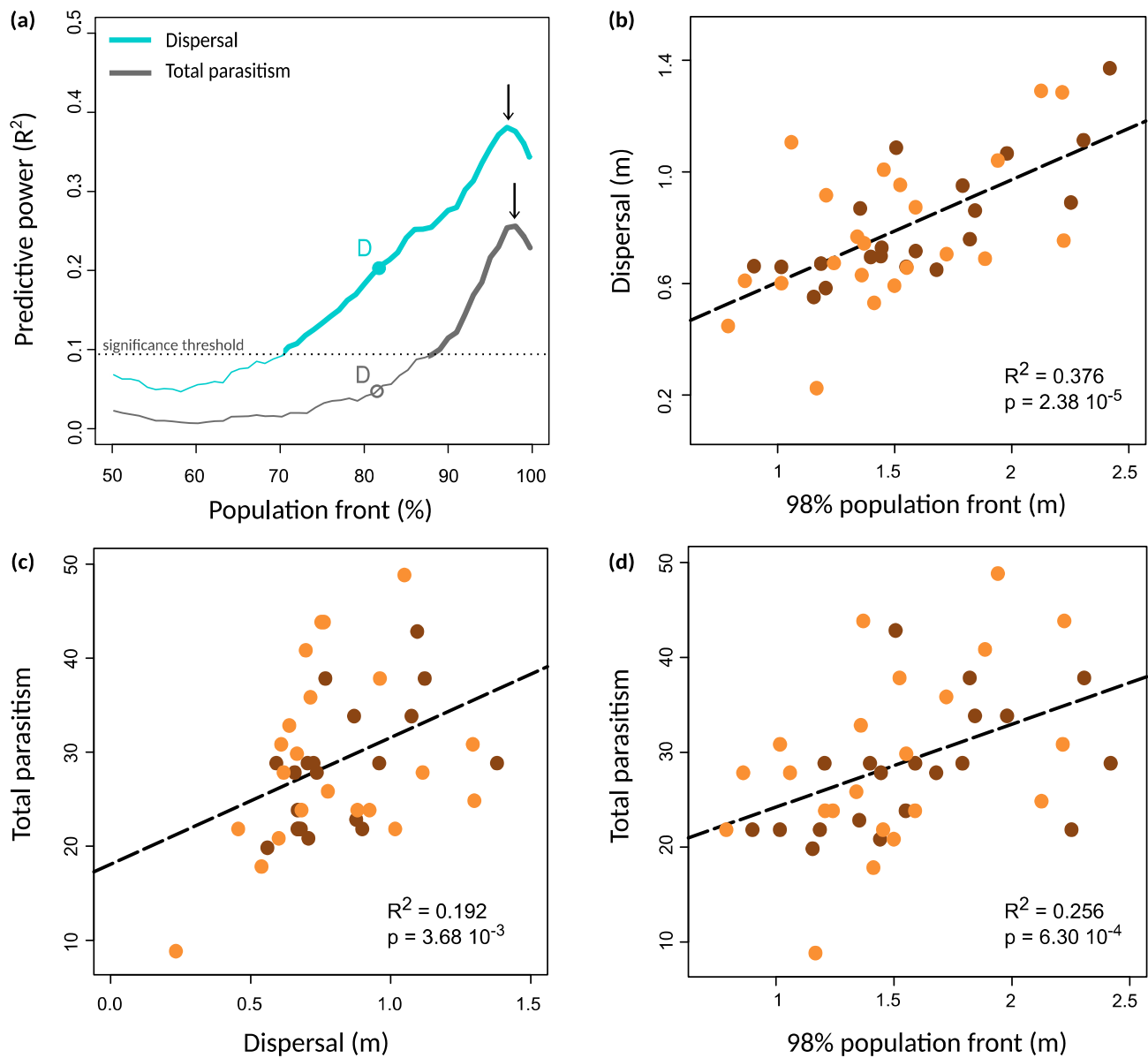


Figure 6

DISCUSSION

Diffusive behavior

Regarding the evolution of the MSD, we attributed a diffusive exploration behavior to this strain of *T. cacoeciae*. This diffusive behavior could not be explained by a normal diffusion model regarding the distribution of individuals (Bartumeus et al. 2016). However we could attribute an anomalous diffusion caused by the superposition of two gaussian distributions of individuals and the linear increase of the MSD. Other animals showed this diffusive behavior. The size of organism could be an important factor to take account. Organism such as rotifer, with similar body size as *Trichogramma* species discover their environment with the same diffusion coefficient (approximately $3.71 \cdot 10^{-2} \text{ m}^2 \cdot \text{h}^{-1}$) under controlled environment (Kuefler et al. 2012), whereas organisms such as cockroach presented higher diffusion coefficient than trichograms (Firle et al. 1998) but were not different between different cockroach species (approximately $1.82 \cdot 10^{-1} \text{ m}^2 \cdot \text{h}^{-1}$) with approximately the same body size. Among insects, Chapman et al. (2009) showed that *Trichogramma ostriniae* can disperse in an agronomic ecosystem diffusely at a higher and

more variable speed ($0.41 \text{ m}^2 \cdot \text{h}^{-1} \pm 0.69$) (because of the uncontrolled environment) than we measured in this study. Those results illustrated the main difference between laboratory studies and field experiment but it could be interesting to compare the potential diffusive capacity of different parasitoid species in the lab to the potential diffusive capacity in the field under the same weather conditions for all species.

Parasitoid density and host aggregation level effects

We found that population density has a strong transient effect on the propagation dynamics. Overall, the effects of population density on spatial propagation were mostly caused by the advance of population fronts, whilst the effects of host presence manifested themselves in the population core. Therefore, although the total quantity of movement was at first sight consistent with classical diffusion theory, the study of population quantiles was not, indicating that different processes operate in different parts of the population. This could be explained by the higher local density of individuals for the treatments with a high density of individuals. It provided higher probability for an individual to directly interact with another individual when they were in a great number. At a point of the experiment (4th hour) individuals in the high density treatment were more distant from one another and the probability to interact with another individual became the same as the low density modality. The fact that extreme front values achieved a higher distance until the end for the high density modality could be explained by the advance that explorer individuals took at the beginning of the exploration caused by the density effect. The presence of hosts could induce places for individuals to interact because when an individual found one, it took time to parasitize it and let some time to other individuals to discover the same host. This could explain that individuals keep searching actively eggs to parasitize until the end of the experiment. We did not have expectations on the differences between the diffuse and clumped host distribution. The host density effect on foraging strategies had already been studied on parasitoids (Hubbard & Cook 1978; Morrison & Strong 1980) but was not clearly established. The effect depended on the considered species as showed by Costamagna et al. (2004), when they studied it in the field on different parasitoid species. Some individual-based studies showed that a higher aggregation level of host implied higher parasitism efficiency (Cloutier 1984) whereas other studies showed no host aggregation level effect on parasitoids (Grieshop et al. 2010) when the global density of host remained constant. In our study, we separated host aggregation level in two different modalities so individuals had no choice between high local density of hosts and low local density when introduced. As showed on *Aphidius rhopalosiphi* by Louâpre et al. (2018), parasitoids could adapt their foraging strategy in response of the complex host distribution. It could be interesting to test a third modality with both high and low local densities of hosts.

From movement to parasitism and dispersal

Studying the dynamic of the propagation of a population of parasitoid was difficult in the field or in greenhouses. Most of the studies looked at the dispersal capacity of parasitoids rather than the effective movement (McDougall & Mills 1997; Chapman et al. 2009). As we observed, the distribution of individuals and the distribution of the parasitism rate were different. By looking only on the localization of the parasitism, we could not deduce the real position of individuals. It seemed to have two different types of individuals whose proportion depended on localized environmental stimuli. The genetic background of each individual should be the same because of the thelytokous parthenogenesis of *T. cacoeciae* species. Some individuals behaved as sedentary individuals and explored locally their environment near the release point whereas another part of the individuals behaved as explorers and adopted another exploratory strategy more distant from the release point. We could assume it because of the superposition of two Gaussian distributions of individuals. This assumption was already discussed by Goubault et al. (2005) observing competition between individuals of the parasitoid *Pachycrepoideus vindemmiae*. We could not validate this

assumption with our study even if the species tested used thelytocal parthenogenesis because we lost individuals identity during the experiment but results made us to build the same assumption as Goubault and collaborators (2005) made with the “remaining” and “retreating” individuals.

Prediction of the parasitism efficiency was a biological control issue we discussed here. We concluded that the best way to predict the parasitism efficiency or the dispersal was to use the front value at 98%. The diffusion coefficient was a great movement indicator but did not predict as much as front values higher than 82%. The dispersal and the total number of parasitized hosts were correlated but not very strongly. In biological control, dispersal capacity was a great factor to take into account to evaluate the efficiency potential of a biological control agent. In our study we showed that the prediction of the parasitism was more efficient on dispersal than the total number of parasitized hosts. The link between the movement, more precisely, the front value at 98% and the dispersal was an interesting result that could inform the dispersal capacity of parasitoids useful in biological control programs. This front value was already measured during a dispersal study of *T. ostrinae* (Chapman et al. 2009) using glue traps in potato field and was established as a good movement indicator by anterior studies (Okubo 1980; Bancroft 2005). We confirmed in this study the efficiency to use this front value to predict parasitism.

REFERENCES

- Ayvaz, A.; Karasu, E.; Karabörklü, S. and Tunçbilek, A. S. (2008). *Effects of cold storage, rearing temperature, parasitoid age and irradiation on the performance of Trichogramma evanescens Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae)*, Journal of Stored Products Research 44 : 232-240.
- Bancroft, J. S. (2005). *Dispersal and Abundance of Lygus hesperus in Field Crops*, Environmental Entomology 34 : 1517-1523.
- Bartumeus, F.; Campos, D.; Ryu, W. S.; Lloret-Cabot, R.; Méndez, V. and Catalan, J. (2016). *Foraging success under uncertainty: search tradeoffs and optimal space use*, Ecology Letters 19 : 1299-1313.
- Bieber, C. and Ruf, T. (2005). *Population dynamics in wild boar Sus scrofa: ecology, elasticity of growth rate and implications for the management of pulsed resource consumers*, Journal of Applied Ecology 42 : 1203-1213.
- Bovet, P. and Benhamou, S. (1988). *Spatial Analysis of Animal's Movement Using a Correlated Random Walk Model*, Journal of Theoretical Biology 131 : 419-433.
- Bowler Diana, E. and Benton Tim, G. (2005). *Causes and consequences of animal dispersal strategies: relating individual behaviour to spatial dynamics*, Biological Reviews 80 : 205-225.
- Cagnacci, F.; Boitani, L.; Powell, R. A. and Boyce, M. S. (2010). *Animal ecology meets GPS-based radiotelemetry: a perfect storm of opportunities and challenges*, Philosophical Transactions of the Royal Society B 365 : 2157-2162.
- Chapman, A.; Kuhar, T.; Schultz, P. and Brewster, C. (2009). *Dispersal of Trichogramma ostrinae (Hymenoptera: Trichogrammatidae) in Potato Fields*, Environmental Entomology 38 : 677-685.
- Cloutier, C. (1984). *The Effect of Host Density on Egg Distribution by the Solitary Parasitoid Aphidius nigripes (Hymenoptera: Aphididae)*, The Canadian Entomologist 116 : 805-811.
- Comins, H. N. (1982). *Evolutionarily stable strategies for localized dispersal in two dimensions*, Journal of Theoretical Biology 94 : 579-606.
- Cônsoli, F.; Zucchi, R. and Parra, J. Cônsoli, F.; Zucchi, R. and Parra, J. (Ed.), 2010. *Egg Parasitoids in Agroecosystems with Emphasis on Trichogramma*. Springer, .
- Costamagna, A. C.; Menalled, F. D. and Landis, D. A. (2004). *Host density influences parasitism of the armyworm Pseudaletia unipuncta in agricultural landscapes*, Basic and Applied Ecology 5 : 347-355.
- Firle, S.; Bommarco, R.; Ekbom, B. and Natiello, M. (1998). *The influence of movement and resting behavior on the range of three carabid beetles*, Ecology 79 : 2113-2122.
- Fronhofer, A. A.; Kropf, T. and Altermatt, F. (2015). *Density-dependent movement and the consequences of the Allee effect in the model organism Tetrahymena*, Journal of Animal Ecology 84 : 712-722.
- Gandon, S. and Rousset, F. (1999). *Evolution of stepping-stone dispersal rates*, Proceedings of the Royal Society B 266 : 2507-2514.
- Geissmann, Q.; Garcia Rodriguez, L.; Beckwith, E.; French, A.; Jambon, A. and Gilestro, G. (2017). *Ethoscopes: An open platform for high-throughput ethomics*, PlosBiology 15 : 1-13.
- Goubeault, M.; Outreman, Y.; Poinot, D. and Cortesero, A. M. (2005). *Patch exploitation strategies of parasitic wasp under intraspecific competition*, Behavioral Ecology 16 : 693-701.
- Grieshop, M.; Flinn, P. and Nechols, J. (2010). *Effects of intra- and interpatch host density on egg parasitism by three species of Trichogramma*, Journal of Insect Science 10 : 1-14.
- Holyoak, M.; Casagrandi, R.; Nathan, R.; Revilla, E. and Spiegel, O. (2008). *Trends and missing parts in the study of movement ecology*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105 : 19060-19065.
- Hubbard, S. F. and Cook, R. M. (1978). *Optimal Foraging by Parasitoid Wasps*, Journal of Animal Ecology 47 : 593-604.

- Kuefler, D.; Avgar, T. and Fryxell, J. M. (2012). Rotifer population spread in relation to food, density and predation risk in an experimental system, *Animal Ecology* 81 : 323-329.
- Kuefler, D.; Avgar, T. and Fryxell, J. M. (2013). Density- and resource-dependent movement characteristics in a rotifer, *Functional Ecology* 27 : 323-328.
- Lewis, M. A.; Maini, P. K. and Petrovskii, S. V. Lewis, M. A.; Maini, P. K. & Petrovskii, S. V. (Ed.), 2013. *Dispersal, Individual Movement and Spatial Ecology : A Mathematical Perspective*. Springer-Verlag, .
- Louâpre, P.; Le Lann, C. and Hance, T. (2018). When parasitoids deal with the spatial distribution of their hosts: Consequences for both partners, *Insect Science* .
- Mallard, F.; Bourlot, V. and Tully, T. (2013). An Automated Image Analysis System to Measure and Count Organisms in Laboratory Microcosms, *PlosOne* 8.
- McDougall, S. and Mills, N. (1997). Dispersal Of *Trichogramma platneri* Nagarkatti (Hym., Trichogrammatidae) from point-source releases in an apple orchard in California, *Journal of Applied Entomology* 121 : 205-209.
- Mills, N. and Lacan, I. (2004). Ratio dependence in the functional response of insect parasitoids: evidence from *Trichogramma minutum* foraging for eggs in small host patches, *Ecological Entomology* 29 : 208-216.
- Mohamad, R.; Wajnberg, E.; Monge, J. and Goubault, M. (2015). The effect of direct interspecific competition on patch exploitation strategies in parasitoid wasps, *Oecologia* 177 : 305-315.
- Morel-Journel, T.; Girod, P.; Mailleret, L.; Auguste, A.; Blin, A. and Vercken, E. (2016). The highs and lows of dispersal: how connectivity and initial population size jointly shape establishment dynamics in discrete landscapes, *Oikos Synthesising Ecology* 125 : 769-777.
- Morrison, G. and Strong Jr., D. R. (1980). Spatial Variations in Host Density and the Intensity of Parasitism: Some Empirical Examples, *Environmental Entomology* 9 : 149-152.
- Muggeo, V. M. R. (2008). segmented: An R Package to Fit Regression Models with Broken-Line Relationships, *RNews* 8 : 20-25.
- Okubo, A., 1980. *Diffusion and Ecological Problems : (Mathematical Models)*. Springer-Verlag, .
- Pennekamp, F. and Schtickzelle, N. (2013). Implementing image analysis in laboratorybased experimental systems for ecology and evolution: A hands-on guide, *Methods in Ecology and Evolution* 4 : 483-492.
- Petrovskii, S.; Mashanova, A. and Jansen, V. A. A. (2011). Variation in individual walking behavior creates the impression of a Lévy flight, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108 : 8704-8707.
- Pizzol, J.; Desneux, N.; Wajnberg, E. and Thi  ry, D. (2012). Parasitoid and host egg ages have independent impact on various biological traits in a *Trichogramma* species, *Journal of Pest Science* 85 : 489-496.
- Prange, S.; Gehrt, S. D. and Wiggers, E. P. (2004). Influences of Anthropogenic Resources on Raccoon (*Procyon lotor*) Movements and Spatial Distribution, *Journal of Mammalogy* 85 : 483-490.
- R Development Core Team (2008). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*, .
- Reiser, M. (2009). The ethomics era ?, *Nature Methods* 6 : 413-414.
- Robert, F.-A.; Brodeur, J. and Boivin, G. (2016). Patch exploitation by non-aggressive parasitoids under intra- and interspecific competition, *Entomologia Experimentalis et Applicata* 159 : 92-101.
- Rosenberg, R.; Nilsson, H. C.; Hollerts, K. and Hellman, B. (1997). Density-dependent migration in an *Amphiura filiformis* (Amphiuridae, Echinodermata) infaunal population, *Marine Ecology Progress Series* 159 : 121-131.
- Schneider, C. A.; Rasband, W. S. and Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of Image Analysis, *Nature Methods* 9 : 671-675.

Schneider, J. and Levine, J. (2014). *Automated identification of social interaction criteria in Drosophila melanogaster*, *Biology Letters* 10 : 1-5.

Sheppard, J. K.; Preen, A. R.; Marsh, H.; Lawler, I. R.; Whiting, S. D. and Jones, R. E. (2006). *Movement heterogeneity of dugongs, Dugong dugon (Müller), over large spatial scales*, *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 334 : 64-83.

Sutherland, W. J.; Freckleton, R. P.; Godfray, H. C. J.; Beissinger, S. R.; Benton, T.; Cameron, D. D.; Carmel, Y.; Coomes, D. A.; Coulson, T.; Emmerson, M. C. and others (2013). *Identification of 100 fundamental ecological questions*, *Journal of ecology* 101 : 58-67.

Tilman, D. and Kareiva, P. Tilman, D. & Kareiva, P. (Ed.), 1997. *Spatial Ecology : The Role of Space in Population Dynamics and Interspecific Interactions*. Princeton University Press, .

Turchin, P., 1998. *Quantitative Analysis of Movement : Measuring and Modeling Population Redistribution in Animals and Plants*. Sinauer Associates, .

Valetta, J. J.; Torney, C.; Kings, M.; Thornton, A. and Madden, J. (2017). *Applications of machine learning in animal behaviour studies*, *Animal Behaviour* 124 : 203-220.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Double-spiral microcosm used for propagation experiments. (a) A 6 meter long tunnel was folded into a double spiral to fit in a 80*50 cm rectangle. The red dot figures the central point of release, and blue dots represent the location of host patches in the Clumped modality (one patch every 30 cm). (b) Using high definition cameras the distribution of individual trichograms (0,5mm long) could be followed every minute for eight hours. Trichograms and host eggs were located by image analysis techniques, and projected orthogonally on the spiral skeleton to obtain their linear distance from the release point.

Figure 2. Rate of population spread. (a-d) MSD as a function of time. The continuous line shows the average over replicates, with a moving window of 15m minutes. The gray envelope represents the corresponding 95% bootstrap confidence interval. Linear regression lines have slopes equal to the diffusion coefficient D. In the High Density treatment, the slope changed significantly at about 4 hours and a piecewise linear model fit was used. The first 30 minutes were excluded from the regressions to avoid the effect of initial conditions. (e-h) Position of population quantiles as a function of time. Bold sections indicate significant pairwise differences as indicated in the legend.

Figure 3. The distribution of individuals during population spread. (a) High Density and (b) High Density + Diffuse hosts treatments (patterns were similar in other treatments). Histograms show the observed distribution of individual detections over all replicates, in a window of 15 minutes centered on the focal time. Continuous lines show the best fitting Gaussian and 2-component Gaussian mixture (G-mixture (2)) models. AIC values comparing Gaussian, G-mixture (2), G-mixture (3) and Student (t) distributions (with no moving window to avoid pseudoreplication) are presented in each case. Dashed lines represent the two components of the G-mixture (2) model, i.e. the narrow (sedentary) and broad (explorer) components.

Figure 4. Proportion of sedentary versus explorer individuals in the course of population spread. Dots represent the relative proportion of each component, as inferred from the G-mixture (2) model fit (see previous Figure), every 10 minutes throughout the experiment. Solid lines delineate the corresponding 90% confidence intervals.

Figure 5. Total parasitism and dispersal. Distribution of (a) total parasitism (number of parasitized hosts) and (b) dispersal distance (standard deviation of the distribution of parasitism events at the end of the experiment) for Diffuse and Clumped host distributions (comparison: t-test). (c) Average rate of parasitism as a function of distance. The two host distributions yielding very similar distributions only the pooled distribution is shown, in bins of 30 cm centered on each patch of the Clumped treatments. The continuous curve is the best fitting Gaussian density.

Figure 6. Predicting parasitism and dispersal from movement. (a) R² value of the pairwise correlation between dispersal / total parasitism and the different population quantiles, at the end of the experiment. Bold curve sections indicate statistically significant correlations. The values obtained if using the diffusion coefficient (D) instead of a population quantile are also provided (circles). (b-c) Scatter plots of pairwise associations between dispersal, total parasitism, and the final distance covered by the 98% population front. Each dot is one replicate; Diffuse and Clumped host distributions are shown in different colors (same color code as in previous figures).

VI. Discussion sur l'étude du mouvement au sein du genre

Trichogramma

VI.1. Le mouvement des trichogrammes à différentes échelles spatio-temporelles

1.1. L'influence environnementale

Au travers des trois études menées à différentes échelles spatiales (de quelques centimètres à plusieurs mètres) et temporelles (de quelques minutes à plusieurs jours dans le cas de l'orientation de la ponte en fonction de la lumière et de la gravité), nous avons pu renseigner que les trichogrammes présentent principalement une préférence de ponte à la lumière (effet qui domine la préférence géotactique) comme ont déjà pu le montrer Watanabe et ses collaborateurs (2018). Cette préférence de ponte à la lumière se manifeste d'autant plus lorsque les individus sont de plus soumis à un effet de la gravité : ils préfèrent d'autant plus la lumière lorsque celle-ci se trouve en hauteur. La synergie des effets de la lumière et de la gravité sur la préférence de ponte du trichogramme en hauteur à la lumière est confirmée par cette étude. Par ailleurs, cette étude montre bien la dissociation possible entre la phototaxie et la géotaxie dans les stratégies d'exploitation de ressource du trichogramme du fait de la significativité des préférences lors des tests sur les facteurs (lumière et gravité) isolés. Par ailleurs, nous avons pu mettre en évidence un effet de la diversité environnementale (strates végétales) avec notamment l'absence d'effets de la gravité et une phototaxie positive pour les souches provenant de la strate herbacée. Cependant, des analyses complémentaires sont nécessaires pour identifier d'éventuels effets sur les strates arbustive et arborée.

Nous montrons la grande variabilité de réponses à la lumière et à la gravité existante aux niveaux inter- et intra-spécifique chez les souches d'une même espèce, proches génétiquement entre elles, la variabilité des réponses aux effets de la lumière et de la gravité observée dans les résultats peut s'expliquer par les différences environnementales qu'ont connues les souches avant leur échantillonnage. Les souches ayant été échantillonnées sur des strates végétales différentes et sur des espèces végétales différentes, les effets de la structure spatiale de la plante peuvent avoir un impact sur les préférences géotactiques et phototactiques. Des études ont déjà révélé des changements de comportement chez le trichogramme en fonction du niveau de complexité de la plante (Gingras & Boivin 2002) selon l'espèce considérée (Gingras et al. 2003). Contrairement à ces études et aux complexités environnementales, nos études ont, elles, été menées en laboratoire avec un niveau de complexité architectural assez faible (environnement à deux dimensions). La mise au point de nos études a néanmoins demandé un effort important pour atteindre les objectifs de caractérisation du mouvement. Comme il décrit par Gingras et ses collaborateurs (2003), le niveau de complexité architectural entraîne des différences sur l'acquisition de données quantitatives du parasitisme mais pas qualitatives. Quantitativement, le taux de parasitisme diminue lorsque la complexité

architecturale de la plante augmente. Néanmoins qualitativement, a été observé que *T. pretiosum* est toujours moins performant que *T. evanescens* quelque soit le niveau de complexité architectural de la plante (Gingras et al. 2003). Nous pouvons ainsi inférer que la simple architecture des environnements que nous avons testé ne représente pas un frein dans la comparaison entre les souches et les espèces de trichogrammes.

Nous avons testé l'effet du niveau d'agrégation des ressources (facteur environnemental) sur la dynamique de propagation et la performance de parasitisme d'une souche de *T. cacoeciae*. Nous n'avons pas observé d'effet significatif de ce facteur environnemental sur le mouvement ou sur la performance de parasitisme de cette souche. Pour autant, la performance de parasitisme d'autres espèces de trichogrammes, comme *T. pretiosum*, en fonction de la densité en œuf hôte a été étudiée et a montré un effet positif (Arantes Faria et al. 2008) au niveau de la plante. Plus la densité en œuf hôte est élevée, plus la performance de parasitisme est importante (réponse fonctionnelle). Par ailleurs, il est avéré que la spécificité parasitaire des différentes espèces de trichogrammes pour leurs hôtes joue un rôle dans la modification comportementale des individus (Salt 1940; van Bergeijk et al. 1989; Cônsoli et al. 2010). Nous avons utilisé une seule espèce d'hôte pour l'ensemble des souches et espèces testées, d'autres résultats pourraient être observés en utilisant un hôte différent. Il est alors probable que l'espèce d'hôte considérée impacte différemment l'activité et les déplacements des différentes espèces de trichogrammes. Les résultats que nous avons observés lors de nos études sur l'hôte de laboratoire *Ephestia kuehniella* peuvent ne pas être transposables à d'autres espèces d'hôtes. Cependant l'absence d'effets du niveau d'agrégation des ressources pour *T. cacoeciae* a déjà été mentionnée sur un hôte différent, *Tuta absoluta* (Zouba & Mahjoubi 2010). Cette espèce étant considérée comme généraliste, il est possible que la stratégie d'exploitation de ressources soit indépendante de l'hôte ciblé bien que fortement influencée par l'abondance de son hôte (Hawkins & Gross 1992).

Dans le cadre de l'étude de la dynamique de propagation des trichogrammes, nous avons constaté la présence de deux types d'individus : « explorateurs » et « sédentaires ». Pourtant, la souche utilisée de *T. cacoeciae*, utilise exclusivement un mode de reproduction parthénogénétique thélytoque (la descendance est uniquement composé de femelles ayant le même génome que celui de la mère) et serait composée exclusivement de clones. Cette souche a été échantillonnée en 2014 et l'élevage s'est développé à partir de quelques individus fondateurs (moins de 5 individus probablement issus de la ponte d'une seule femelle). Après plusieurs années d'élevage en laboratoire (environ 80 générations), les effets « bottleneck » induits par l'élevage devraient avoir fixé les allèles de cette souche (Roderick & Navajas 2003) les rendant alors tous homozygotes pour l'ensemble de leurs gènes. Bien que nous n'ayons pas vérifié la composition génétique de notre élevage, il est fortement probable que les individus testés lors de nos sessions expérimentales en 2017 soient des clones.

Partant de cette supposition, l'explication de la présence de deux types d'individus (sédentaires ou explorateurs) au sein d'une population de clones viendrait de facteurs environnementaux, et plus précisément de la répartition des hôtes déjà parasités ou non, par des individus appartenant ou non à la même espèce (compétition intra- et inter-spécifique). En effet, la détection d'un hôte déjà parasité peut conduire à différents comportements selon l'espèce compétitrice. De ce fait, un individu peut changer de comportement et devenir explorateur ou sédentaire selon la perception de son environnement. Pour un individu, la perception indirecte de la présence de congénères s'effectue par l'interprétation de signaux chimiques tels que les kairomones ou les phéromones (Jones et al. 1973; Noldus 1991). Si l'hôte a été parasité par un individu de la même espèce, le comportement observé est généralement un rejet antennaire de l'hôte (Robert et al. 2016), c'est à dire que la perception de kairomones lié au parasitisme d'un hôte par un compétiteur s'effectue par le contact des antennes du parasitoïde avec l'œuf hôte. Si celui-ci a été parasité par une espèce différente, l'hôte peut être parasité à nouveau ou non (multiparasitisme). Dans le cas d'un superparasitisme, les descendants se retrouvent en compétition pour la même ressource (Sasaba 1966; Briggs 1993). Les effets de la perception directe de la présence d'autres individus sont moins documentés. Le fait de percevoir la présence d'un compétiteur peut engendrer différentes réactions. Certaines espèces d'hyménoptères parasitoïdes, comme l'espèce *Pachycrepoideus vindemmiae* (Hymenoptera: Pteromalidae), présentent un comportement agressif de garde et sont très territoriaux (Goubault et al. 2005). D'autres patientent à proximité de leurs hôtes pendant qu'un compétiteur d'une autre espèce les parasite puis superparasitent les hôtes déjà parasités pour supplanter le précédent parasitoïde, comme il a été montré pour l'espèce *Eupelmus vuilleti* lorsqu'elle est en compétition avec l'espèce *Dinarmus basalis* pour les mêmes hôtes (Mohamad et al. 2015). Une autre hypothèse relève d'un comportement plus indirectement altruiste puisqu'un hôte déjà parasité par un individu apparenté n'est pas une ressource de bonne qualité pour un nouvel individu (risque d'avortement lié à la compétition entre les descendants). Une partie des individus va, en conséquence, continuer d'explorer son environnement pour trouver des hôtes non parasités, ce qui expliquerait une distribution leptokurtique des individus (Fraser et al. 2001). Notre interprétation s'oriente principalement dans cette dernière catégorie de comportement lié à la perception d'autres individus. Lors de la rencontre entre deux individus sur un même hôte, il est probable que le premier individu arrivé parasite l'hôte et que le second individu (« gêné » par la présence de son congénère) décide de continuer d'explorer l'environnement à la recherche d'un hôte libre. Dans le cas d'un environnement vide (sans hôtes), la proximité initiale des individus peut être interprétée de la même manière que les rencontres sur des hôtes. Il est probable qu'un individu passe d'un état sédentaire à explorateur et inversement suivant ces *stimuli* environnementaux que sont la présence ou l'absence d'autres individus.

1.2. L'influence génétique

Bien que cela dépasse le cadre de ma thèse, l'étude des mouvements bruts des individus caractérisées génétiquement (grâce à l'utilisation de nouveaux marqueurs génétiques en RAD-seq) peut également permettre d'établir un lien entre la position phylogénétique et les capacités à se mouvoir des trichogrammes. Certaines espèces se retrouvent phylogénétiquement très éloignées l'une de l'autre (comme observé dans la figure 2 de la partie introductive) telles *T. principium* et *T. evanescens* (Vanlerberghe-Masutti 1994), d'autres sont très proches et difficilement discernables comme *T. brassicae* et *T. euproctidis* (Sümer Ercan et al. 2012). Dans quelles mesures les caractéristiques phénotypiques du déplacement sont-elles engendrées par les différences génétiques des trichogrammes ? Nous avons constaté un comportement plus atypique chez *T. principium* avec une préférence pour la lumière nettement plus prononcée que chez les autres espèces et une géotaxie positive pour l'une des deux souches testées. De plus la souche de cette espèce dont le mouvement a été phénotypé, effectuait des trajectoires très sinueuses. A l'inverse, l'espèce *T. evanescens* présentait une préférence pour la lumière moins marquée et une géotaxie négative quand l'effet de la gravité est significatif. Cette espèce demeure la plus active, la plus rapide avec des trajectoires plus linéaires. Ces espèces phylogénétiquement très différentes au sein du genre *Trichogramma* se caractérisent par des stratégies de déplacements également très différentes. Au contraire, des espèces très proches phylogénétiquement ont adopté des stratégies de déplacements semblables, comme c'est le cas de *T. brassicae* et *T. euproctidis* lors de nos études.

Un caractère déterminant lors des mesures de taux d'activité et de vitesse de déplacement est la taille des individus (Heglund & Taylor 1988). Les trichogrammes ayant une taille comprise entre 0.3 mm et 1 mm, une telle variation implique indubitablement des vitesses et taux d'activité différents d'une souche/espèce à l'autre. Cependant la taille des individus est un trait phénotypique fortement lié à la taille de l'hôte parasité et au nombre de descendants issus d'un même hôte (Bai et al. 1992). Ainsi, nos élevages étant menés sur une seule espèce d'hôte, nous avons considéré que les adultes émergeant présentaient tous la même taille moyenne indépendamment de l'espèce considérée. Une vérification de cette taille serait d'usage pour confirmer cette hypothèse.

D'autres études ont montré le caractère répétable et héritable du comportement d'exploration d'un ensemble d'animaux phylogénétiquement éloignés. C'est le cas de l'étude menée sur la mésange charbonnière *Parus major*, dont la distance d'exploration depuis un point fixe et la variabilité de cette distance (qui peut s'apparenter à une quantité de mouvements) observées sont héritables (Dingemanse et al. 2002). Les capacités locomotrices (vitesses de déplacement) ont également été définies comme héritables chez le lézard *Sceloporus occidentalis* d'après une étude menée par Garland et ses collaborateurs sur des individus appartenant à deux groupes : les « winners » et les « losers » (Garland et al. 1990). Les capacités de migration des insectes sont aussi étroitement liées à leurs gènes (Dingle 1972) comme l'étude sur la

migration des papillons monarques l'a montré (Urquhart & Urquhart 1978). Ainsi, les caractéristiques du déplacement des trichogrammes, tels que le taux d'activité, la sinuosité, la vitesse et leur capacités de dispersion, peuvent être fortement dépendantes de leurs traits génétiques.

VI.2. L'exploration non orientée chez le trichogramme

Nous avons mis en évidence le comportement diffusif de la souche PMbio1 de *T. cacoeciae* testée lors de notre étude sur sa dynamique de propagation. D'autres animaux ont également montré ce comportement diffusif (Kareiva 1983). Il semblerait que la taille de l'organisme soit un paramètre déterminant dans les mesures de coefficients de diffusion (figure 34). Des organismes comme les rotifères, ont une taille similaire à celle du trichogramme (de l'ordre de 0,5 mm) et découvrent leur environnement de manière diffusive avec un coefficient de diffusion similaire (de l'ordre de $3,71 \cdot 10^{-2} \text{ m}^2 \cdot \text{h}^{-1}$) dans un environnement contrôlé (Kuefler et al. 2012]) alors que des coefficients de diffusions estimés à partir de données sur des organismes comme les cafards (dont le corps mesure environ 2 cm de long) ont atteint des valeurs plus élevées (Firle et al. 1998) sans différences entre les trois espèces de cafards étudiées (de l'ordre de $1,82 \cdot 10^{-1} \text{ m}^2 \cdot \text{h}^{-1}$). Ce coefficient de diffusion élevé s'interprète comme une vitesse d'exploration de l'environnement élevée. Pour aller encore plus loin, le comportement d'exploration du dugong a été aussi qualifié de diffusif (Sheppard et al. 2006). Ce mammifère marin mesurant près de 2,6 m de long, son coefficient de diffusion a été estimé à $1.45 \cdot 10^6 \text{ m}^2 \cdot \text{h}^{-1}$. Nous pouvons constater que le coefficient de diffusion semble positivement corrélé avec la taille de l'organisme ainsi que son mode de déplacement. En effet, un organisme tel que le papillon, se déplaçant principalement en volant, aura un coefficient de diffusion plus important qu'un organisme marcheur de même taille (figure 34).

Parmi les études sur la propagation des insectes, Chapman et ses collaborateurs ont montré que *Trichogramma ostrinae* pouvaient se disperser dans un agro-écosystème de manière diffusive plus rapidement ($D = 0.41 \text{ m}^2 \cdot \text{h}^{-1} \pm 0.69$) bien que de façon plus variable (probablement en raison des conditions environnementales non contrôlées) que ce que nous avons mesuré dans notre étude (Chapman et al. 2009). Cette comparaison illustre la principale différence entre des études menées en laboratoire et des études menées en conditions naturelles. Nous avons réussi à développer un dispositif ainsi qu'une méthode très efficaces pour l'étude de la propagation de groupes d'individus en laboratoire adaptable à un ensemble d'insectes parasitoïdes. Les techniques d'évaluation de cette dynamique en milieu agricole ont déjà été mises au point et permettent d'estimer la dispersion des parasitoïdes à l'aide d'hôtes sentinelles (McDougall & Mills 1997; Chapman et al. 2009). Il serait très intéressant de comparer le potentiel de diffusion (sous la forme de coefficient de diffusion) de différentes espèces d'intérêt agronomique dans des conditions de laboratoire et des conditions naturelles.

La souche PMbio1 de *T. cacoeciae* a été étudiée à différentes échelles de temps et d'espace dans le cadre de cette thèse. Cette souche a révélé une préférence de ponte à la lumière et en hauteur (que les facteurs de lumière et de gravité soient isolés ou non). Nous avons pu estimer son taux d'activité à 61 % en moyenne avec une vitesse de déplacements actifs d'en moyenne $0,31 \text{ cm.s}^{-1}$ (soit $1,12 \text{ m.h}^{-1}$) et un indice de sinuosité de 14 (indice parmi les plus élevés qui ont été mesurés). Il est possible qu'à partir des valeurs mesurées sur une échelle spatio-temporelle réduite (comme celle utilisée dans la caractérisation des vitesses et trajectoires en section IV) nous puissions estimer la quantité de mouvement sur une échelle spatio-temporelle bien plus importante (comme celle utilisée dans l'étude de la dynamique de propagation en section V). Certains modèles mathématiques ont déjà été établis pour estimer ce qui se rapproche d'une quantité de mouvement tel que le « Mean Square Displacement » (MSD) à partir de la longueurs moyennes de pas et de la variation des angles de la trajectoire (Turchin 1998). Il serait intéressant de comparer les valeurs de MSD estimées grâce à un modèle s'appuyant sur des facteurs mesurés à l'échelle spatio-temporelle réduite et les valeurs de MSD mesurées lors de notre étude sur la dynamique de propagation de groupes d'individus sur plusieurs heures. L'étude qui permet de mesurer le MSD étant bien plus longue et ardue à mettre en œuvre sur des organismes de petites tailles, l'estimation de ce facteur à partir de paramètres mesurés plus rapidement (phénotypage à haut-débit) serait un gain de temps important dans la caractérisation des capacités de dispersion d'agents de lutte biologique comme les trichogrammes.

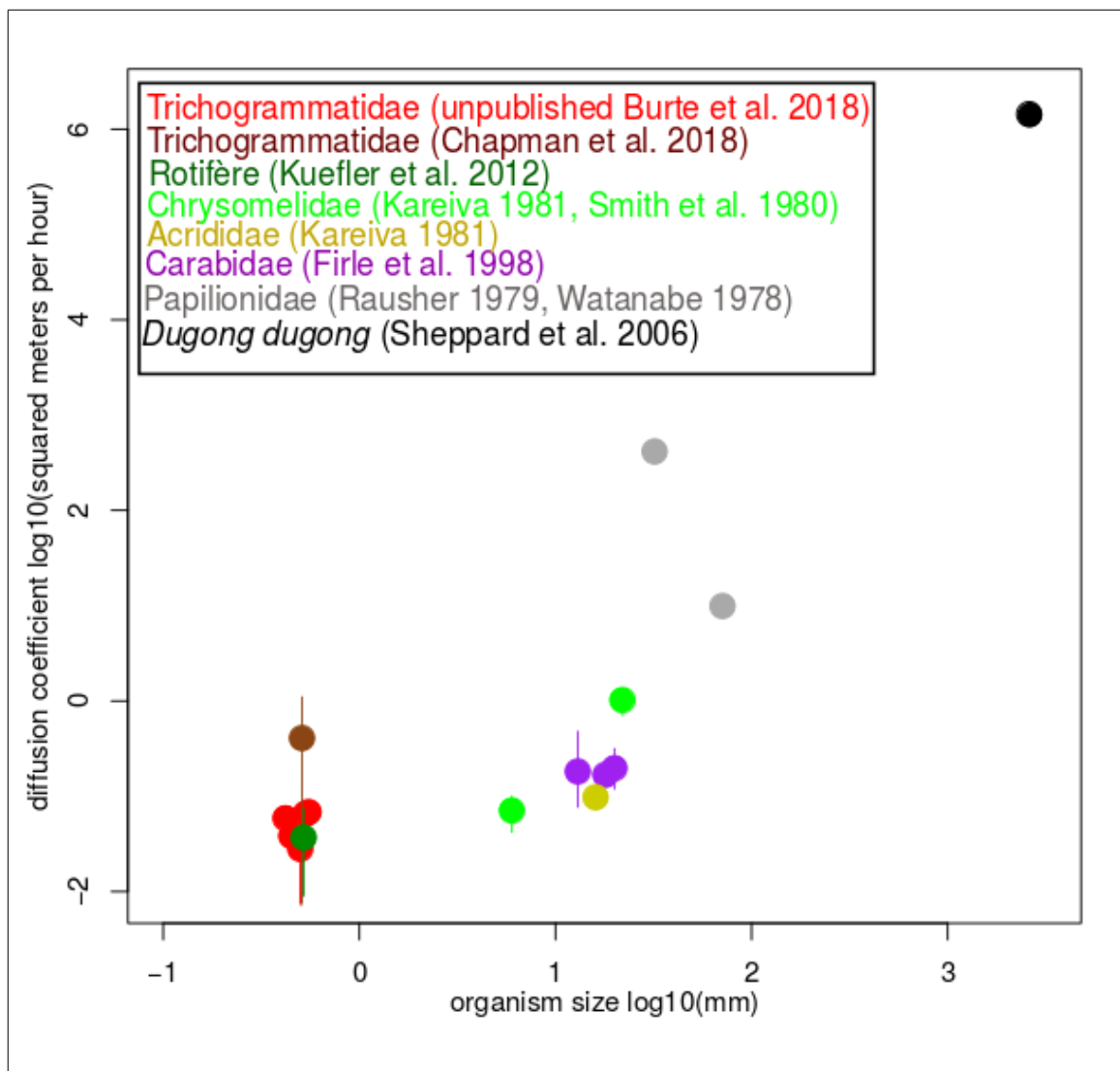


Figure 34 : Comparaison de différents coefficients de diffusions mesurés pour un ensemble d'organismes. Les barres verticales représentent l'erreur standard d'après les données provenant de la littérature.

VI.3. Le mouvement du trichogramme en lutte biologique

Les capacités de dispersion d'un agent de lutte biologique, facteur considéré comme fondamental dans les programmes de lutte biologique (Lewis et al. 1990), peuvent être estimées *via* l'étude du mouvement et la caractérisation du front (en particulier pour le front à 98 %) chez le trichogramme d'après nos observations (Chapman et al. 2009). Il apparaît évident que la spécificité d'un parasitoïde pour un hôte soit un facteur fondamental dans le succès du contrôle d'un ravageur (Vinson 1976; Strand & Obrycki 1996). Une caractérisation fiable du mouvement sur différentes espèces présentant un même niveau d'acceptation de l'hôte serait un net avantage dans la sélection de l'espèce à utiliser dans un programme de lutte biologique.

Soulignons enfin que nous avons pu lever le verrou limitant l'acquisition de données sur le mouvement de parasitoïdes d'une aussi petite taille que celle des trichogrammes en utilisant les technologies avancées d'analyse d'images en laboratoire. La perspective de la caractérisation du mouvement de souches et d'espèces en vue de leur utilisation en lutte biologique s'est révélée comme prometteuse au travers des études présentées dans ce manuscrit.

Cependant, un niveau d'étude n'a pas été abordé dans le cadre de cette thèse. Il s'agit de la caractérisation du mouvement passif des individus. Il a été avancé lors de précédentes études que la dispersion du trichogramme en milieu naturel s'effectuait principalement de manière passive par le vent (Fournier & Boivin 2000). Comme suggéré dans la section IV de ce manuscrit, certaines espèces de trichogrammes effectuent des actions entraînant un mouvement passif en conditions naturelles : la distance parcourue par un saut dépend des conditions environnementales (vent). En adaptant la méthode utilisée dans la section IV de tracking, il est envisageable de compléter la caractérisation du mouvement par la mesure des probabilités d'effectuer un saut par les individus des différentes espèces.

La relation entre les connaissances sur les hôtes ravageurs telles que leurs préférences géotactiques et phototactiques (Watanabe et al. 2018) et les connaissances des stratégies d'exploration des parasitoïdes sont étroitement liées (Burbutis et al. 1977; Thorpe 1985). La caractérisation des trajectoires et vitesses d'une espèce de trichogramme ne sont pas suffisantes pour déterminer la souche ou l'espèce à utiliser. La provenance des souches d'une même espèce est un autre facteur environnemental important à prendre en compte du fait de la variabilité des préférences de pontes au sein de chaque espèce. Le succès du contrôle d'un ravageur réside ainsi tant dans la spécificité d'un parasitoïde à son égard (d'origine principalement génétique), que dans la concordance des effets environnementaux sur les stratégies de déplacement du ravageur et de son parasitoïde.

Les études menées dans le cadre de ma thèse ont ainsi apporté des éléments de réponses quant au comportement exploratoire fondamental du trichogramme (comportement diffusif) dont une des perspectives

est l'étude de la différenciation entre les individus explorateurs et sédentaires observée. Nous avons pu développer des méthodes de phénotypage à haut-débit du mouvement brut (vitesse, activité, trajectoire) ainsi que des préférences de pontes en fonction de leurs préférences phototactiques et géotactiques d'un grand ensemble de souches de trichogrammes. Ces méthodes et ces résultats apporteront des outils d'aide à la décision lors de la sélection des souches/espèces de trichogramme à utiliser lors de la mise en place de programme de lutte biologique.

VII. Annexes

VII.1. Calcul des degrés jours (°D)

Il est possible d'anticiper le temps de développement d'un insecte en utilisant la notion de degrés jour (°D) ([Wilson & Barnett 1983]; [Higley, Pedigo & Ostlie 1986]). Il s'agit d'une quantité de température accumulée chaque jour pour que l'organisme se développe intégralement depuis l'œuf jusqu'au stade imago. Pour calculer une quantité de degrés reçus par jour pour un organisme, il est nécessaire de connaître le seuil de température minimale de développement de l'espèce et de soustraire ce seuil à la température effective de l'environnement de l'organisme. Par exemple, *Trichogramma brassicae* a besoin de cumuler 150°D pour qu'un individu passe du stade œuf au stade adulte ([Bigler 1994]; [van den Heuvel & Bigler 1997]). Son seuil de température minimale de développement est de 10°C. Voici un exemple de calcul du temps de développement nécessaire à 25°C :

$$150 = x (25-10)$$

$$x = 10$$

Avec x le nombre de jours nécessaire pour effectuer la totalité du temps de développement d'un individu de *Trichogramma brassicae*. À 25°C, l'individu recevra 15°C par jour (25°C-10°C), pour cumuler 150°D il faudra 10 jours.

Espèce	Degrés Jour (°D)	Seuil minimal (°C)	référence
<i>T. cacaeciae</i>	165	10	Jeanine Pizzol
<i>T. brassicae</i>	150	10	Bigler 1994
<i>T. euproctidis</i>	150	10	Bigler 1994
<i>T. evanescens</i>	134	11,5	Haile et al. 2001
<i>T. cordubensis</i>	149	10,3	Garcia and Tavares 1994
<i>T. semblidis</i>	108	13,6	Estimation personnelle
<i>T. principium</i>	110	14	Estimation personnelle

Table 1 : Informations sur les temps de développement des différentes espèces testées dans le cadre de cette thèse.

Nous avons utilisé des estimations pour certaines espèces déjà renseignées dans la littérature, les données manquantes sur les autres espèces ont été estimées pour les souches que nous avons testé (table 1)

VII.2. Effet de la paraffine liquide sur le comportement du trichogramme

Pour s'assurer que les individus ne puissent pas passer sous le polystyrène dans le dispositif utilisé pour l'étude présentée en section V, nous avons utilisé de la vaseline (paraffine liquide blanche, CE 232-373-2). C'est un produit dit neutre, facilement nettoyable sur du papier calque ou du polystyrène avec de l'éthanol à 70 %. Ce produit a déjà été utilisé comme substance neutre pour empêcher des insectes comme les cafards de s'échapper ([Sakura & Mizunami 2001]) ou tester la sensibilité olfactive de composants chimiques sur les moustiques ([Konan, Sylla, Doannio & Traoré 2003]). Afin de valider son utilisation sur notre expérience sur *Trichogramma cacoeciae*, nous avons conduit une étude préliminaire pour vérifier que la vaseline, n'a pas d'effet significatif sur le mouvement et l'orientation des individus de cette espèce.

Matériel et méthode :

Nous avons utilisé la même souche de *T. cacoeciae* que celle utilisée dans l'étude de la section V, PMbio1. Nous avons isolé 20 groupes de 50 individus dès leur émergence, dans des tubes en verres contenant une gouttelette de miel. Nous avons ensuite entreposé les isolats dans une étuve à 19°C pendant 24 heures pour leur laisser le temps de s'alimenter. Le lendemain, chaque groupe a été transféré dans un tube en verre de 15 cm de long et 1 cm de diamètre ouvert des deux côtés. Les tubes ont été fermés ensuite avec du coton.

Chaque tube contenait une languette de papier cartonné (14 cm de long et 0,9 cm de large). Nous avons préparé trois types de languettes : (i) des languettes témoins (C), (ii) des languettes avec une tâche de vaseline d'un côté du tube (V1) et (iii) des languettes avec une tâche de vaseline de l'autre côté du tube (V2). Nous avons préparé 8 tubes témoins et six tubes pour chaque autre type de languette.

Nous avons installés les tubes avec les types de languettes différents de manière alternés (randomisation du dispositif) dans une pièce sombre aux conditions contrôlées (température 24°C $\pm$ 1°C et RH 60% $\pm$ 10%) sous une lumière homogène.

Nous avons compté toutes les heures pendant 8 heures le nombre d'individus présents de chaque côté de chaque tube pour comparer les proportions d'individus entre les modalités. Nous avons d'abord vérifié que le nombre d'individus introduits n'était pas différent entre les modalités en utilisant un test ANOVA puis nous avons testé les proportions d'individus présents du même côté de chaque tube en utilisant un modèle mixte linéaire généralisé suivant une distribution binomiale, avec les facteurs fixes de modalité et de temps. Pour cela nous avons utilisé la fonction "glmer" du package lme4 dans R pour comparer les valeurs d'AIC et la validité des modèles testés.

Résultats :

Avant de tester l'effet de la vaseline, nous avons vérifié que le nombre d'individus introduits dans les tubes n'était pas différent.

Nous avons trouvé un peu plus de 50% des individus présents du même côté de chaque tube durant la totalité de l'expérience et plus de 60% des individus durant la première heure (figure 1). Cela peut être causé par le fait que les individus ont tous été introduits du même côté dans les tubes et qu'ils ont besoin de plus d'une heure pour se distribuer dans la totalité du tube.

Nous n'avons pas trouvé de différences significatives entre les trois types de languettes avec ou sans le facteur temps. Nous avons choisi le modèle qui explique le mieux la distribution de nos données (Table 2) en regardant les valeurs d'AIC de chaque modèle. Le meilleur modèle ne prend en compte que l'effet du temps avec un effet aléatoire et le second modèle correspond au modèle nul avec l'effet aléatoire. Nous pouvons conclure que la vaseline n'a pas d'effets significatifs sur l'orientation du mouvement de la souche PMbio1 de *T. cacoeciae* et pouvons donc utiliser ce produit pour notre dispositif en double spirale.

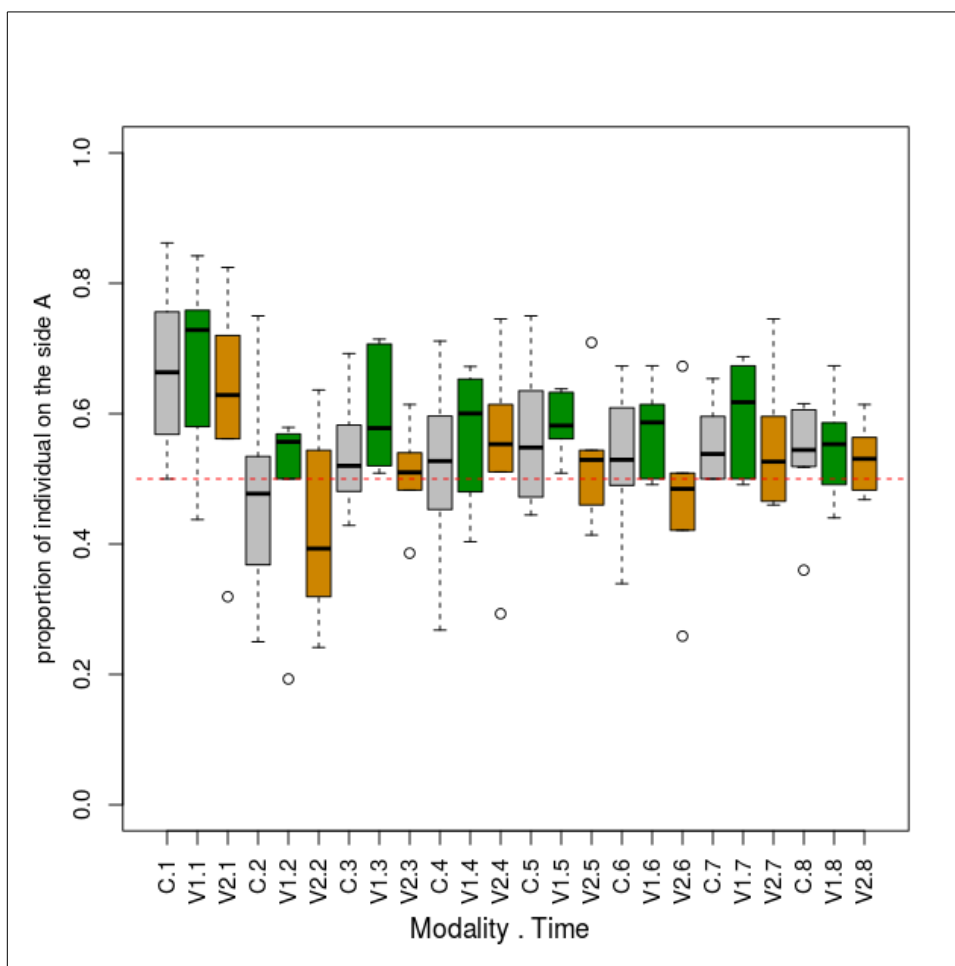


Figure 1: Boxplot représentant la distribution des données de proportion des individus du même côté du tube pour chaque modalité (Témoin (C) :gris, Vaseline 1 (V1) : vert et Vaseline 2 (V2) : orange) pendant les huit heures d'expérimentation. La ligne rouge en pointiller représente une répartition équitable des individus dans le tube.

Model	AIC value	Rank of model
Fixed effect : time, Random effect : tube	1056.756	1
Only random effect : tube	1057.951	2
Fixed effects : modality + time, Random effect : tube	1059.012	3
Fixed effect : modality, Random effect : tube	1060.207	4
Fixed effects : modality * time , Random effect : tube	1062.156	5

Table 2: Les différents modèles mixtes testés, plus la valeur de l'AIC est faible plus le modèle explique la distribution de données.

References

- Abram, P. K.; Brodeur, J.; Burte, V. and Boivin, G. (2016).** *Parasitoid-induced host egg abortion: An underappreciated component of biological control services provided by egg parasitoids*, *Biological Control* 98 : 52 – 60.
- Abram, P. K.; Brodeur, J.; Urbaneja, A. and Tena, A. (2019).** *Nonreproductive Effects of Insect Parasitoids on Their Hosts*, *Annual Review of Entomology* : 259-276
- Alford, R. A.; Brown, G. P.; Schwarzkopf, L.; Phillips, B. L. and Shine, R. (2009).** *Comparisons through time and space suggest rapid evolution of dispersal behaviour in an invasive species*, *Wildlife Research* 36 : 23-28.
- Allemand, R.; Pompanon, F.; Fleury, F.; Fouillet, P. and Bouletreau, M. (1994).** *Behavioural circadian rhythms measured in real-time by automatic image analysis: applications in parasitoid insects*, *Physiological Entomology* 19 : 1-8.
- Alves, T. J.; Silva-Torres Christian S.A. and Wanderley-Teixeira, V.; Teixeira, A. A.; Torres, J. B.; A., L. T. and Ramalho, F. S. (2015).** *Behavioral Studies of the Parasitoid Bracon vulgaris Ashmead (Hymenoptera: Braconidae)*, *Journal of Insect Behavior* 28 : 604-617.
- Arantes Faria, C.; Braz Torres, J.; Vieira Fernandes, A. and Isidro Farias, A. (2008).** *Parasitism of Tuta absoluta in tomato plants by Trichogramma pretiosum Riley in response to host density and plant structures*, *Ciência Rural* 38 : 1504-1509.
- Atkins, M.; Siu, K.; Law, B.; Orchard, J. and Rosenbaum, W. (2002).** *Difficulties of T1 brain MRI segmentation techniques*, *Proceedings - Medical Imaging* 4684 : 1837-1844.
- Bai, B.; Luck, R. F.; Forster, L.; Stephens, B. and Janssen, J. A. M. (1992).** *The effect of host size on quality attributes of the egg parasitoid, Trichogramma pretiosum*, *Entomologia Experimentalis et Applicata* 64 : 37-48.
- Balch, T.; Khan, Z. and Veloso, M. (2001).** *Automatically tracking and analyzing the behavior of live insect colonies*, *Proceedings of the fifth international conference on Autonomous agents* 01 : 521-528.
- Bancroft, J. S. (2005).** *Dispersal and Abundance of Lygus hesperus in Field Crops*, *Environmental Entomology* 34 : 1517-1523.
- Barbosa, P. Barbosa, P. (Ed.), **1998.** *Conservation Biological Control*. Academic Press, .
- Barbosa, P. and Frongillo, E. (1977).** *Influence of light intensity and temperature on the locomotory and flight activity of Brachymeria intermedia [Hym.: Chalcididae] a pupal parasitoid of the gypsy moth*, *Entomophaga* 22 : 405-411.
- Barry, M. J. (2012).** *Application of a novel open-source program for measuring the effects of toxicants on the swimming behavior of large groups of unmarked fish*, *Chemosphere* 86 : 938-944.
- Bearup, D.; Benefer, C. M.; Petrovskii, S. V. and Blackshaw, R. P. (2016).** *Revisiting Brownian motion as a description of animal movement: a comparison to experimental movement data*, *Methods in Ecology and Evolution* .

- Bellwood, P. (2007).** *First Farmers : the Origin of Agricultural Societies*, Cambridge Archeological Journal 17 : 87-109.
- Bendelsky, A. and Bargmann, C. I. (2011).** *Genetic contributions to behavioural diversity at the gene–environment interface*, Nature Reviews Genetics 12 : 809-820.
- Bender John, A.; Simpson Elaine, M.; Tietz Brian, R.; Daltorio Kathryn, A.; Quinn Roger, D. and Ritzmann Roy, E. (2011).** *Kinematic and behavioral evidence for a distinction between trotting and ambling gaits in the cockroach *Blaberus discoidalis**, Journal of Experimental Biology 214 : 2057-2064.
- Benhamou, S. (2004).** *How to reliably estimate the tortuosity of an animal's path: straightness, sinuosity, or fractal dimension?*, Journal of Theoretical Biology .
- Benhamou, S. (2007).** *How Many Animals Really Do the Lévy Walk?*, Ecology 88 : 1962-1969.
- Benton, T. and Beckerman, A. (2005).** *Population Dynamics in a Noisy World: Lessons From a Mite Experimental System*, Advances in Ecological Research 37 : 143-181.
- van Bergeijk, K.; Bigler, F.; Kaashoek, N. and Pak, G. (1989).** *Changes in host acceptance and host suitability as an effect of rearing *Trichogramma maidis* on a factitious host*, Entomologia Experimentalis et Applicata 52 : 229-238.
- Bergl, R. A. and Vigilant, L. (2007).** *Genetic analysis reveals population structure and recent migration within the highly fragmented range of the Cross River gorilla (*Gorilla gorilla diehli*)*, Molecular Ecology 16 : 501-516.
- Berman, G. J.; Choi, D. M.; Bialek, W. and Shaevitz, J. W. (2014).** *Mapping the stereotyped behaviour of freely moving fruit flies*, J. R. Soc. Interface 11 : 1-12.
- Bigler, F. (1994).** *Quality Control in *Trichogramma* Production*, Biological Control with Egg parasitoids : 93-111.
- Bishop, J. E. (1969).** *Light Control of Aquatic Insect Activity and Drift*, Ecology 50 : 371-380.
- Boldt, P. (1974).** *Temperature, Humidity, and Host: Effect on Rate of Search of *Trichogramma evanescens* and *T. minutum* auctt. (not Riley, 1871)*, Annals of the Entomological Society of America 67 : 706-708.
- Bommarco, R.; Kleijn, D. and Potts, S. G. (2013).** *Ecological intensification: harnessing ecosystem services for food security*, Trends in Ecology & Evolution 28 : 230-238.
- Bonetto, P.; Comis, G.; Formiconi, A. and Guarracino, M. (2003).** *A new Approach to Brain Imaging, based on an Open and Distributed Environment*, Proceedings of the 1st International IEEE EMBS 1 : 521-524.
- Borowiec, N.; Thaon, M.; Brancaccio, L.; Warot, S.; Vercken, E.; Fauvergue, X.; Ris, N. and Malausa, J. (2014).** *Classical biological control against the chestnut gall wasp '*Dryocosmus kuriphilus*' (Hymenoptera, Cynipidae) in France*, Plant Protection 29 : 7-10.
- Bovet, P. and Benhamou, S. (1988).** *Spatial Analysis of Animal's Movement Using a Correlated Random Walk Model*, Journal of Theoretical Biology 131 : 419-433.
- Bowler Diana, E. and Benton Tim, G. (2005).** *Causes and consequences of animal dispersal strategies: relating individual behaviour to spatial dynamics*, Biological Reviews 80 : 205-225.

- Branson, K.; Robie, A. A.; Bender, J.; Perona, P. and Dickinson, M. H. (2009).** *High-throughput ethomics in large groups of Drosophila*, *Nature Methods* 6 : 451-457.
- Bravo, A.; Gill, S. S. and Soberon, M. (2007).** *Mode of action of Bacillus thuringiensis Cry and Cyt toxins and their potential for insect control*, *Toxicon* 49 : 426-435.
- Briggs, C. J. (1993).** *Competition Among Parasitoid Species on a Stage-Structured Host and Its Effect on Host Suppression*, *The American Naturalist* 141 : 372-397.
- Brower, J. H. and Cline, L. D. (1984).** *Response of Trichogramma pretiosum and T. evanescens to Whitelight, Blacklight and No-Light Suction Traps*, *The Florida Entomologist* 67 : 262-268
- Brown, G. P.; Phillips, B. L. and Shine, R. (2014).** *The straight and narrow path: the evolution of straight-line dispersal at a cane toad invasion front*, *Proceedings of the Royal Society B* 281 : 1-7.
- Brown, P. M. J.; Adriaens, T.; Bathon, H.; Cuppen, J.; Goldarazena, A. et al. (2008).** *Harmonia axyridis in Europe: spread and distribution of a non-native coccinellid*, *BioControl* 53 : 5-21.
- Bruins, E.; Wajnberg, E. and Pak, G. (1994).** *Genetic variability in the reactive distance in Trichogramma brassicae after automatic tracking of the walking path*, *Entomologia Experimentalis et Applicata* 72 : 297-303.
- Burbutis, P. and Koepke, C. (1981).** *European Corn Borer Control in Peppers by Trichogramma nubilale*, *Journal of Economic Entomology* 74 : 246-247.
- Burbutis, P. P.; Curl, G. D. and Davis, C. P. (1977).** *Host Searching Behavior by Trichogramma nubilale on Corn*, *Environmental Entomology* 6 : 400-402.
- Calcagno, V.; Bonhomme, V.; Thomas, Y.; Singer, M. C. and Bourguet, D. (2010).** *Divergence in behaviour between the European corn borer, Ostrinia nubilalis, and its sibling species Ostrinia scapularis: adaptation to human harvesting?*, *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* .
- Calcagno, V.; Grogard, F.; Hamelin, F.; Wajnberg, E. and Mailleret, L. (2014).** *The functional response predicts the effect of resource distribution on the optimal movement rate of consumers*, *Ecology Letters* 17 : 1570-1579.
- Calvin, D.; Knapp, M.; Welch, S.; Poston, F. and Elzinga, R. (1984).** *Impact of Environmental Factors on Trichogramma pretiosum Reared on Southwestern Corn Borer Eggs*, *Environmental Entomology* 13 : 774-780.
- Calvin, D.; Losey, J.; Knapp, M. and Poston, F. (1997).** *Oviposition and Development of Trichogramma pretiosum (Hymenoptera: Trichogrammatidae) in Three Age Classes of Southwestern Corn Borer Eggs*, *Environmental Entomology* 26 : 385-390.
- Carrière, Y. and Boivin, G. (1997).** *EVOLUTION OF THERMAL SENSITIVITY OF PARASITIZATION CAPACITY IN EGG PARASITOIDS*, *Evolution* 51 : 2028-2032.
- Cerretti, P. and Tschorsnig, H.-P. (2010).** *Annotated host catalogue for the Tachinidae (Diptera) of Italy*, *Stuttgarter Beitragezur Naturkunde A* 3 : 305-340.
- Chacko, M. J. (1969).** *The phenomenon of superparasitism in Trichogramma evanescens minutum Riley - I (Hymenoptera: Trichogrammatidae).*, *Contributions to Entomology* 19 : 617-635.

- Chapin, J. B. and Brou, V. A. (1991).** *Harmonia axyridis (Pallas), the third Species of the Genus to be Found in the United States (Coleoptera: Coccinellidae)*, Proceedings of the Entomological Society of Washington 93 : 630-635.
- Chapman, A.; Kuhar, T.; Schultz, P. and Brewster, C. (2009).** *Dispersal of Trichogramma ostrinae (Hymenoptera: Trichogrammatidae) in Potato Fields*, Environmental Entomology 38 : 677-685.
- Charnov, E. (1976).** *Optimal foraging : The Marginal Value Theorem*, Theoretical Population Biology 9 : 129-136.
- Charoy, C. and Clément, P. (1993).** *Foraging behaviour of Brachionus calyciflorus (Pallas): variations in the swimming path according to presence or absence of algal food (Chlorella)*, Hydrobiologia : 95-100.
- Cloarec, A. (1986).** *Distance and Size Discrimination in a Water Stick Insect, ranatra linearis (Heteroptera)*, Journal of Experimental Biology 120 : 59-77.
- Clobert, J.; Baguette, M.; Benton, T. G. and Bullock, J. M. Clobert, J.; Baguette, M.; Benton, T. G. & Bullock, J. M. (Ed.), **2012.** *Dispersal Ecology and Evolution*. Oxford University Press, .
- Cloutier, C. (1984).** *The Effect of Host Density on Egg Distribution by the Solitary Parasitoid Aphidius nigripes (Hymenoptera: Aphidiidae)*, The Canadian Entomologist 116 : 805–811.
- Coll, M. (1996).** *Feeding and ovipositing on plants by an omnivorous insect predator*, Oecologia 105 : 214-220.
- Cônsoli, F.; Zucchi, R. and Parra, J. Cônsoli, F.; Zucchi, R. & Parra, J. (Ed.), **2010.** *Egg Parasitoids in Agroecosystems with Emphasis on Trichogramma*. Springer, .
- Cook, J. M. and Butcher, R. D. J. (1999).** *The transmission and effects of Wolbachia bacteria in parasitoids*, Researches on Population Ecology 41 : 15-28.
- Coombe, P. E. (1982).** *Visual behaviour of the greenhouse whitefly, Trialeurodes vaporariorum*, Physiological Entomology 7 : 243-251.
- Costamagna, A. C.; Menalled, F. D. and Landis, D. A. (2004).** *Host density influences parasitism of the armyworm Pseudaletia unipuncta in agricultural landscapes*, Basic and Applied Ecology 5 : 347-355.
- Crist, T. O. and MacMahon, J. A. (1991).** *Individual foraging components of harvester ants: movement patterns and seed patch fidelity*, Insectes Sociaux 38 : 379-396.
- Curl, G. and Burbutis, P. (1978).** *Host-Preference Studies with Trichogramma nubilale*, Environmental Entomology 7 : 541-543.
- Darney, K.; Giraudin, A.; Joseph, R.; Abadie, P.; Aupinel, P.; Decourtye, A.; Le Bourg, E. and Gauthier, M. (2016).** *Effect of high-frequency radiations on survival of the honeybee (Apis mellifera L.)*, Apidologie 47 : 703-710.
- Darwin, C. R. Darwin, C. R. (Ed.), **1859.** *On the Origin of Species*. Murray, .
- Dell, A.; Bender, J.; Branson, K.; Couzin, I.; de Polavieja, G. et al. (2014).** *Automated image-based tracking and its application in ecology*, Trends in Ecology & Evolution 29 : 417-428.
- Demetrius, L. and Ziehe, M. (2007).** *Darwinian fitness*, Theoretical Population Biology 72 : 323-345.

- Desowitz, R. S. (1993).** *The Malaria Capers : More Tales of Parasites and People, Research and Reality*, WW Norton & Company .
- Dingemanse, N. J.; Both, C.; Drent, P. J.; van Oers, K. and van Noordwijk, A. J. (2002).** *Repeatability and heritability of exploratory behaviour in great tits from the wild*, *Animal Behaviour* 64 : 929-938.
- Dingle, H. (1972).** *Migration Strategies of Insects*, *Science* 175 : 1327-1335.
- Dunbar, M. L.; David, E. M.; Aline, M. R. and Lofgren, J. L. (2016).** *Validation of a Behavioral Ethogram for Assessing Postoperative Pain in Guinea Pigs (Cavia porcellus)*, *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science* 55 : 29-34.
- Eilenberg, J.; Hajek, A. and Lomer, C. (2001).** *Suggestions for unifying the terminology in biological control*, *BioControl* 46 : 387-400.
- Fagan, W. F.; Lewis, M. A.; Neubert, M. G. and van den Driessche, P. (2002).** *Invasion theory and biological control*, *Ecology Letters* 5 : 148-157.
- Farkas, S. and Shorey, H. (1972).** *Chemical Trail-Following by Flying Insects: A Mechanism for Orientation to a Distant Odor Source*, *Science* 178 : 67-68.
- Farris, S. M. (2016).** *Insect societies and the social brain*, *Current Opinion in Insect Science* 15 : 1-8.
- Fiedler, A. K.; Landis, D. A. and Wratten, S. D. (2008).** *Maximizing ecosystem services from conservation biological control: The role of habitat management*, *Biological Control* 45 : 254-271.
- Field, A. (1905).** *Suggested Explanations of Certain Phenomena in the Lives of Ants; with a Method of Tracing Ants and their Respective Communities*, *Biological Bulletin* 9 : 134-137.
- Firle, S.; Bommarco, R.; Ekbom, B. and Natiello, M. (1998).** *The influence of movement and resting behavior on the range of three carabid beetles*, *Ecology* 79 : 2113-2122.
- Fischer, D. S.; Friedan, D.; Qiu, Z.; Shenker, S. J. and Shenker, S. H. (1985).** *Random walks in two-dimensional random environments with constrained drift forces*, *Physical Review A: Atomic, Molecular, and Optical Physics and Quantum Information* 31 : 3841-3845.
- Flandin, L.; Vouyovitch, L.; Beroual, A.; Bessede, J. and Alberola, N. (2005).** *Influences of degree of curing and presence of inorganic fillers on the ultimate electrical properties of epoxy-based composites: experiment and simulation*, *Journal of Physics D: Applied Physics* 38 : 144-156.
- Fleury, F.; Allemand, R.; Fouillet, P. and Boulétreau, M. (1995).** *Genetic variation in locomotor activity rhythm among populations of Leptopilina heterotoma (Hymenoptera: Eucoilidae), a larval parasitoid of Drosophila species*, *Behavior Genetics* 25 : 81-89.
- Fleury, F.; Pompanon, F.; Mimouni, F.; Chassain, C.; Fouillet, P.; Allemand, R. and Bouletreau, M. (1991).** *Daily rhythmicity of locomotor activity in adult hymenopteran parasitoids*, *Redia* 74 : 287-293.
- Foley, J. A.; DeFries, R.; Asner, G. P.; Barford, C.; Bonan, G. et al. (2005).** *Global Consequences of Land Use*, *Science* 309 : 570-574.
- Formanowicz, D. R. J. (1987).** *Foraging Tactics of Dytiscus verticalis Larvae (Coleoptera: Dytiscidae): Prey Detection, Reactive Distance and Predator Size*, *Journal of the Kansas Entomological Society* 60 : 92-99.

- Fournier, F. and Boivin, G. (2000).** *Comparative Dispersal of Trichogramma evanescens and Trichogramma pretiosum (Hymenoptera: Trichogrammatidae) in Relation to Environmental Conditions*, Environmental Entomology 29 : 55-63.
- Fraser, D. F.; Gilliam, J. F.; Daley, M. J.; Le, A. N. and Skalski, G. T. (2001).** *Explaining Leptokurtic Movement Distributions: Intrapopulation Variation in Boldness and Exploration*, The American Naturalist 158 : 124-135.
- Fronhofer, A. A.; Kropf, T. and Altermatt, F. (2015).** *Density-dependent movement and the consequences of the Allee effect in the model organism Tetrahymena*, Journal of Animal Ecology 84 : 712-722.
- Fukaya, M.; Akino, T.; Yasuda, T.; Yasui, H. and Wakamura, S. (2004).** *Visual and olfactory cues for mate orientation behaviour in male white-spotted longicorn beetle, Anoplophora malasiaca*, Entomologia Experimentalis et Applicata 111 : 111-115.
- Furbank, R. T. and Tester, M. (2011).** *Phenomix – technologies to relieve the phenotyping bottleneck*, Trends in Plant Science 16 : 635-644.
- Garland, T. J.; Hankins, E. and Huey, R. (1990).** *Locomotor Capacity and Social Dominance in Male Lizards*, Functional Ecology 4 : 243-250.
- Gingras, D. and Boivin, G. (2002).** *Effect Of Plant Structure, Host Density And Foraging Duration On Host Finding By Trichogramma evanescens (Hymenoptera:Trichogrammatidae)*, Environmental Entomology 31 : 1153-1157.
- Gingras, D.; Dutilleul, P. and Boivin, G. (2003).** *Effect of plant structure on host finding capacity of lepidopterous pests of crucifers by two Trichogramma parasitoids*, Biological Control 27 : 25-31.
- Gingras, D.; Dutilleul, P. and Boivin, G. (2008).** *Effect of plant structure on searching strategy and searching efficiency of Trichogramma turkestanica*, Journal of Insect Science 8 : 1-9.
- Godden, D. H. and Graham, D. (1983).** *'Instant' analysis of movement*, Journal of Experimental Biology 107 : 505-508.
- Godfray, H. Press, P. U. (Ed.), **1994.** *Parasitoids, Behavioral and Evolutionary Ecology*. Princeton University Press, .
- Godin, C. and Boivin, G. (2000).** *Effects of host age on parasitism and progeny allocation in Trichogrammatidae*, Entomologia Experimentalis et Applicata 97 : 149-160.
- Goubeault, M.; Outreman, Y.; Poinso, D. and Cortesero, A. M. (2005).** *Patch exploitation strategies of parasitic wasp under intraspecific competition*, Behavioral Ecology 16 : 693-701.
- Goulson, D. (1999).** *Foraging strategies of insects for gathering nectar and pollen, and implications for plant ecology and evolution*, Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics 2 : 185-209.
- Goulson, D.; Nicholls, E.; Botias, C. and Rotheray, E. L. (2015).** *Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers*, Science 347 : 1435-1445.
- Greathead, D. (1986).** *Parasitoids in Classical Biological Control*, : 289-318.
- Green, B. C. and Spinks, J. W. T. (1958).** *Lapse-time Motion Picture Studies of Soil-burrowing Insects*, Nature 181 : 434-435.

- Grieshop, M.; Flinn, P. and Nechols, J. (2010).** *Effects of intra- and interpatch host density on egg parasitism by three species of Trichogramma*, Journal of Insect Science 10 : 1-14.
- Grieshop, M.; Flinn, P.; Nechols, J. and Schöller, M. (2007).** *Host-Foraging Success of Three Species of Trichogramma (Hymenoptera: Trichogrammatidae) in a Simulated Retail Environment*, Journal of Economic Entomology 100 : 591-598.
- Gripenberg, S.; Mayhew, P. J.; Parnell, M. and Roslin, T. (2010).** *A meta-analysis of preference-performance relationships in phytophagous insects*, Ecology Letters 13 : 383-393.
- Grünbaum, D. (1998).** *Using Spatially Explicit Models to Characterize Foraging Performance in Heterogeneous Landscapes*, The American Naturalist 151 : 97-113.
- van Grunsven, R.; Donners, M.; Boeke, K.; van Geffen, K.; Groenendijk, D.; Berendse, F. and Veenendaal, E. (2014).** *Spectral composition of light sources and insect phototaxis, with an evaluation of existing spectral response models*, Journal of Insect Conservation 18 : 225-231.
- Hajek, A. E.; McManus, M. L. and Delalibera Junior, I. (2007).** *A review of introductions of pathogens and nematodes for classical biological control of insects and mites*, Biological Control 41 : 1-13.
- Hammer, G. L.; Chapman, S.; van Oosterom, E. and Podlich, D. W. (2005).** *Trait physiology and crop modelling as a framework to link phenotypic complexity to underlying genetic systems*, Australian Journal of Agricultural Research 56 : 947-960.
- Hammond, J. H. (1954).** *An actograph for small insects*, Journal of Scientific Instruments 31 : 43-45.
- Hapca, S. M.; Budha, P.; Crawford, J. W. and Young, I. M. (2007).** *Movement of the nematode, Phasmarhabditis hermaphrodita, in a structurally heterogeneous environment*, Nematology 9 : 731-738.
- Hartl, D. L. and Clark, A. G. Clark, A. G. (Ed.), **1997.** *Principles of Population genetics*. Sinauer Associates, .
- Hassel, M. P. and Southwood, T. R. E. (1978).** *Foraging Strategies of Insects*, Annual Review of Ecology and Systematics 9 : 75-98.
- Hawkins, B. A. and Gross, P. (1992).** *Species Richness and Population Limitation in Insect Parasitoid-Host Systems*, The American Naturalist 139 : 417-423
- Hawltitzky, N. (1992).** *La lutte biologique à l'aide de Trichogrammes*, Courrier de la Cellule Environnement INRA 16 : 9-26.
- Heglund, N. C. and Taylor, C. R. (1988).** *Speed, stride frequency and energy cost per stride : how do they change with body-size and gait ?*, Journal of Experimental Biology 138 : 301-318.
- Heimpel, G. and Asplen, M. (2011).** *A 'Goldilocks' hypothesis for dispersal of biological control agents*, Bio Control 56 : 441-450.
- Hendrichs, J.; Katsoyannos, B. I.; Papaj, D. R. and Prokopy, R. J. (1991).** *Sex differences in movement between natural feeding and mating sites and tradeoffs between food consumption, mating success and predator evasion in Mediterranean fruit flies (Diptera: Tephritidae)*, Oecologia 86 : 223-231.
- van den Heuvel, J. and Bigler, F. Suverkropp, B. P. (Ed.), **1997.** *Host-finding behaviour of Trichogramma brassicae in maize*. CIP-DATA KONINKLIJKE BIBLIOTHEEK, .

- Higley, L.; Pedigo, L. and Ostlie, K. (1986).** *Degday: A Program for Calculating Degree-days, and Assumptions Behind the Degree-day Approach*, Environmental Entomology 15 : 999-1016.
- Hill, M.; Clusella-Trullas, S.; Terblanche, J. and D.M., R. (2016).** *Drivers, impacts, mechanisms and adaptation in insect invasions*, Biological Invasions 18 : 883-891.
- Höfte, H. and Whiteley, H. (1989).** *Insecticidal crystal proteins of Bacillus thuringiensis.*, Microbiology and Molecular Biology Reviews 53 : 242-255.
- Holyoak, M.; Casagrandi, R.; Nathan, R.; Revilla, E. and Spiegel, O. (2008).** *Trends and missing parts in the study of movement ecology*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105 : 19060-19065.
- Hopper, K. R. and King, E. G. (1984).** *Feeding and Movement on Cotton of Heliothis Species (Lepidoptera: Noctuidae) Parasitized by Microplitis croceipes (Hymenoptera: Braconidae)*, Environmental Entomology 13 : 1654-1660.
- Hopper, K. R. and Roush, R. T. (1993).** *Mate finding, dispersal, number released, and the success of biological control introductions*, Ecological Entomology 18 : 321-331.
- Howard, R. W.; Charlton, M. and Charlton, R. E. (1998).** *Host-Finding, Host-Recognition, and Host-Acceptance Behavior of Cephalonomia tarsalis (Hymenoptera: Bethylinidae)*, Annals of the Entomological Society of America 91 : 879-889.
- Hoy, J. B.; Porter, S. D. and Koehner, P. G. (1997).** *A microcomputer-based activity meter for multiple animals*, Journal of Neuroscience Methods 72 : 183-188.
- Hubbard, S. F. and Cook, R. M. (1978).** *Optimal Foraging by Parasitoid Wasps*, Journal of Animal Ecology 47 : 593-604.
- Huston, M. (1979).** *A General Hypothesis of Species Diversity*, The American Naturalist 113 : 81-101.
- Isbell, F.; Calcagno, V.; Hector, A.; Connolly, J.; Harpole, W. S. et al. (2011).** *High plant diversity is needed to maintain ecosystem services*, Nature 477 : 199-202.
- Jander, R. (1963).** *Insect Orientation*, Annual Review of Entomology 8 : 95-114.
- Jian, F.; Jayas, D. S.; White, N. D. and Muir, W. E. (2002).** *Temperature and Geotaxis Preference by Cryptolestes ferrugineus (Coleoptera: Laemophloeidae) Adults in Response to 5°C/m Temperature Gradients at Optimum and Hot Temperatures in Stored Wheat and Their Mortality at High Temperature*, Environmental Entomology 31 : 816-826.
- Jones, R. L.; Lewis, W. J.; Beroza, M.; Bierl, B. A. and Sparks, A. N. (1973).** *Host-Seeking Stimulants (Kairomones) for the Egg Parasite, Trichogramma evanescens*, Environmental Entomology 2 : 593-596.
- Kaâniche, M.; Brémond, F. and Thonnat, M. (2006).** *Monitoring Trichogramma Activities From Videos : An adaptation of cognitive vision system to biology field*, 2nd International Cognitive Vision Workshop in conjunction with the European Conference on Cognitive Vision 1 : 1-9.
- Kaiser, L. (1988).** *Plasticité Comportementale et Role des Médiateurs Chimiques dans la Sélection de l'Hôte par Trichogramma Maidis Pint et Voeg. (Hym. : Trichogrammatidae)*, Centre d'Orsay, Paris-Sud.
- Kant, R. and Minor, M. A. (2016).** *Sexual Receptivity and Mating Behavior of Diaeretiella rapae (Hymenoptera: Aphididae)*, Annals of the Entomological Society of America 109 : 35-41.

- Kareiva, P. M. (1983).** *Local movement in herbivorous insects: applying a passive diffusion model to mark-recapture field experiments*, *Oecologia* 57 : 322-327.
- Kareiva, P. M. and Shigesada, N. (1983).** *Analyzing Insect Movement as a Correlated Random Walk*, *Oecologia* 56 : 234-238.
- Karp, D. S.; Chaplin-Kramer, R.; Meehan, T. D.; Martin, E. A.; DeClerck, F. et al. (2018).** *Crop pests and predators exhibit inconsistent responses to surrounding landscape composition*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1 : 1-8.
- Kaus, M.; Warfields, S.; Nabavi, A.; Black, P.; Jolesz, F. and Kikinis, R. (2001).** *Automated Segmentation of MR Images of Brain Tumors*, *Radiology* 218 : 586-591.
- Kaya, H. K. (1993).** *Entomopathogenic Nematodes*, *Annual Review of Entomology* 38 : 181-206.
- Keller, S.; Schweizer, C.; Keller, E. and Brenner, H. (1997).** *Control of White Grubs (*Melolontha melolontha* L.) by Treating Adults with the Fungus *Beauveria brongniartii**, *Biocontrol Science and Technology* 7 : 105-116.
- Khan, Z. and Saxena, R. (1985).** *Behavioral and Physiological Responses of *Sogatella furcifera* (Homoptera: Delphacidae) to Selected Resistant and Susceptible Rice Cultivars*, *Journal of Economic Entomology* 78 : 1280-1286.
- Kielty, J. P.; Allen-Williams, L. J.; Underwood, N. and Eastwood, E. A. (1996).** *Behavioral responses of three species of ground beetle (Coleoptera: Carabidae) to olfactory cues associated with prey and habitat*, *Journal of Insect Behavior* 9 : 237-250.
- King, B. H.; Crowe, M. L. and Skinner, S. W. (1995).** *Effect of host density on offspring sex ratios and behavioral interactions between females in the parasitoid wasp *Nasonia vitripennis* (Hymenoptera: Pteromalidae)*, *Journal of Insect Behavior* 8 : 89-102.
- King, P. E.; Askew, R. R. and Sanger, C. (1969).** *The detection of parasitised hosts by males of *Nasonia vitripennis* (Walker) (Hymenoptera: Pteromalidae) and some possible implications*, *Proceedings of the Royal Entomological Society of London* 44 : 85-90.
- Konan, Y. L.; Sylla, M. S.; Doannio, J. M. C. and Traoré, S. (2003).** *Comparison of the effect of two excipients (karite nut butter and vaseline) on the efficacy of *Cocos nucifera*, *Elaeis guineensis* and *Carapa procera* oil-based repellents formulations against mosquitoes biting in Ivory Coast*, *Parasite* 10 : 181-184.
- Kot, M.; Lewis, M. A. and van den Driessche, P. (1996).** *Dispersal Data and the Spread of Invading Organisms*, *Ecology* 77 : 2027-2042.
- Kuefler, D.; Avgar, T. and Fryxell, J. M. (2012).** *Rotifer population spread in relation to food, density and predation risk in an experimental system*, *Animal Ecology* 81 : 323-329.
- Laing, J. (1938).** *Host-Finding by Insect Parasites*, *Journal of Experimental Biology* 15 : 281-302.
- Laing, J. and Hamai, J. Huffaker, C. & Messenger, P. (Ed.), **1976.** *Biological control of insect pests and weeds by imported parasites, predators, and pathogens*. Academic Press, New York.
- Le Ralec, A.; Curty, C. and Wajnberg, E. (2005).** *Inter-specific variation in the reactive distance of different aphid-parasitoid associations: analysis from automatic tracking of the walking path*, *Applied Entomology and Zoology* 40 : 413-420.

- Lecocq, N. and Vandewalle, N. (2003).** *Dynamics of crack opening in a one-dimensional desiccation experiment*, Physica A: Statistical Mechanics and its Applications 321 : 431-441.
- van Lenteren, J. C.; Babendreier, D.; Bigler, F.; Burgio, G.; Hokkanen, H. M. T. et al. (2003).** *Environmental risk assessment of exotic natural enemies used in inundative biological control*, BioControl 48 : 3-38.
- Lett, C.; Verley, P.; Mullon, C.; Parada, C.; Brochier, T.; Penven, P. and Blanke, B. (2008).** *A Lagrangian tool for modelling ichthyoplankton dynamics*, Environmental Modelling & Software 23 : 1210 - 1214.
- Lewis, E. E. and Gaugler, R. (1994).** *Entomopathogenic nematode (Rhabdita: Steinernematidae) sex ratio relates to foraging strategy*, Journal of Invertebrate Pathology 64 : 238 - 242.
- Lewis, W. J.; Vet, L. E. M.; Tumlinson, J. H.; Van Lenteren, J. C. and Papaj, D. R. (1990).** *Variations in Parasitoid Foraging Behavior: Essential Element of a Sound Biological Control Theory*, Environmental Entomology 19 : 1183-1193.
- Liu, F.-H. and Smith, S. M. (2010).** *Measurement and Selection of Parasitoid Quality for Mass-Reared Trichogramma minutum Riley Used in Inundative Release*, Biocontrol Science and Technology 10 : 3-13.
- Lloyd, D. C. (1958).** *Studies of Parasite Oviposition Behaviour.: II. Leptomastix dactylopii Howard (Hymenoptera, Encyrtidae)*, The Canadian Entomologist 90 : 450-461.
- Lockwood, J.; Cassey, P. and Blackburn, T. (2005).** *The role of propagule pressure in explaining species invasions*, Trends in Ecology & Evolution 20 : 223-228.
- Louâpre, P.; Le Lann, C. and Hance, T. (2018).** *When parasitoids deal with the spatial distribution of their hosts: Consequences for both partners*, Insect Science .
- Mallard, F.; Bourlot, V. and Tully, T. (2013).** *An Automated Image Analysis System to Measure and Count Organisms in Laboratory Microcosms*, PlosOne 8.
- Mallet, J. and Porter, P. (1992).** *Preventing insect adaptation to insect-resistant crops: are seed mixtures or refugia the best strategy?*, Proceedings of the Royal Society B 250 : 165-169.
- Marchal, P. des Épiphytes et de Phytogénétique, L. A. (Ed.), **1936.** *Les Trichogrammes*. Paris Imprimerie Nationale, .
- Marden, J.; Wolf, M. and Weber, K. (1997).** *Aerial performance of Drosophila melanogaster from populations selected for upwind flight ability.*, Journal of Experimental Biology 200 : 2747-2755.
- Marden, J. H. (2008).** *Dragonfly flight performance: a model system for biomechanics, physiological genetics, and animal competitive behaviour*, Dragonflies and Damselflies: Model Organisms for Ecological and Evolutionary Research 1 : 249-259.
- Marston, N. and Ertle, L. (1969).** *Host Age and Parasitism by Trichogramma minutum (Hymenoptera: Trichogrammatidae)*, Annals of the Entomological Society of America 62 : 1476-1482.
- Marston, N. and Ertle, L. (1973).** *Host Influence on the Bionomics of Trichogramma minutum*, Annals of the Entomological Society of America 66 : 1155-1162.

- Martel, V.; Doyon, J. and Boivin, G. (2010).** *Partial local mate competition in the wasp Trichogramma euproctidis: the role of emergence sex ratio on female mating behaviour*, Ecological Entomology 35 : 698-703.
- Matsumura, K.; Fiuchikawa, T. and Miyatake, T. (2017).** *Decoupling of Behavioral Trait Correlation Across Life Stages in Two Holometabolous Insects*, Behavior Genetics 47 : 459-467.
- Mazzi, D. and Dorn, S. (2012).** *Movement of insect pests in agricultural landscapes*, Annals of Applied Biology 160 : 97-113.
- McDougall, S. and Mills, N. (1997).** *Dispersal Of Trichogramma platneri Nagarkatti (Hym., Trichogrammatidae) from point-source releases in an apple orchard in California*, Journal of Applied Entomology 121 : 205-209.
- McFarlane, D. J.; Rafter, M. A.; Booth, D. T. and Walter, G. H. (2015).** *Behavioral Responses of a Tiny Insect, the Flower Thrips Frankliniella schultzei Trybom (Thysanoptera, Thripidae), to Atmospheric Pressure Change*, Journal of Insect Behavior 28 : 473-481.
- McKenna, S. J.; Jabri, S.; Duric, Z.; Rosenfeld, A. and Wechsler, H. (2000).** *Tracking group of people*, Computer Vision and Image Understanding 80 : 42-56.
- McLaughlin, A. and Mineau, P. (1995).** *The impact of agricultural practices on biodiversity*, Agriculture, Ecosystems & Environment 55 : 201-212.
- McLean, D. J. and Skowron Volponi, M. A. (2018).** *trajr: An R package for characterisation of animal trajectories*, Ethological Methods 124 : 440-448.
- Mills, N. and Lacan, I. (2004).** *Ratio dependence in the functional response of insect parasitoids: evidence from Trichogramma minutum foraging for eggs in small host patches*, Ecological Entomology 29 : 208-216.
- Mohamad, R.; Wajnberg, E.; Monge, J. and Goubault, M. (2015).** *The effect of direct interspecific competition on patch exploitation strategies in parasitoid wasps*, Oecologia 177 : 305-315.
- Morel-Journel, T.; Girod, P.; Mailleret, L.; Auguste, A.; Blin, A. and Vercken, E. (2016).** *The highs and lows of dispersal: how connectivity and initial population size jointly shape establishment dynamics in discrete landscapes*, Oikos Synthesising Ecology 125 : 769-777.
- Morrison, G. and Strong Jr., D. R. (1980).** *Spatial Variations in Host Density and the Intensity of Parasitism: Some Empirical Examples*, Environmental Entomology 9 : 149-152.
- Naïbo, B. and Druesne, C. (2008).** *Les trichogrammes, au secours du maïs*, Perspectives Agricoles 1 : 14-16.
- Nathan, R. (2008).** *An emerging movement ecology paradigm*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 49 : 19050-19051
- Neves Felipe, M. and Pie Marcio, R. (2012).** *Self-organization in the movement activity of social insects (Hymenoptera: Formicidae)*, AIP Conference Proceedings 1479 : 659-663.
- Newton, P. J. (1993).** *Increasing the Use of Trichogrammatids in Insect Pest Management: A Case Study from the Forests of Canada*, Pest Management Science 37 : 381-386.

- Nisbet, I. C. T. and Medway, L. (1972).** *DISPERSION, POPULATION ECOLOGY AND MIGRATION OF EASTERN GREAT REED WARBLERS ACROCEPHALUS ORIENTALIS WINTERING IN MALAYSIA*, Ibis 114 : 451-494.
- Noldus, L.; Van de Loo, E. and Timmers, P. (1989).** *Computers in behavioural Research*, Nature 341 : 767-768.
- Noldus, L. P. J. J. (1991).** *The Observer: A software system for collection and analysis of observational data*, Behavior Research Methods, Instruments & Computers 23 : 415-429.
- Noldus, L. P. J. J.; Spink, A. J. and Tegelenbosch, R. A. J. (2002).** *Computerised video tracking, movement analysis and behaviour recognition in insects*, Computers and Electronics in Agriculture 35 : 201-227.
- Obrycki, J. J. (1998).** *PREDACEOUS COCCINELLIDAE IN BIOLOGICAL CONTROL*, Annual Review of Entomology 43 : 295-321.
- Okubo, A., 1980.** *Diffusion and Ecological Problems : (Mathematical Models)*. Springer-Verlag, .
- Pak, G. A.; Buis, H. C. E.; Heck, I. C. C. and Hermans, M. L. G. (1986).** *Behavioural variations among strains of Trichogramma spp.: Host-age selection*, Entomologia Experimentalis et Applicata 40 : 247-258.
- Palumbi, S. R. (2001).** *Humans as the World's Greatest Evolutionary Force*, Science 293 : 1786-1790.
- Pennekamp, F. and Schtickzelle, N. (2013).** *Implementing image analysis in laboratorybased experimental systems for ecology and evolution: A hands-on guide*, Methods in Ecology and Evolution 4 : 483-492.
- Perez, G.; Burte, V.; Baron, O. and Calcagno, V. (2017).** *Une méthode d'analyse d'image automatique pour quantifier rapidement les nombres d'œufs et les taux de parasitisme chez Trichogramma sp.*, Le Cahier des Techniques de L'INRA Special Entomology : 135-142.
- Phillips, B. L.; Brown, G. P. and Shine, R. (2010).** *Evolutionarily accelerated invasions: the rate of dispersal evolves upwards during the range advance of cane toads*, Journal of Evolutionary Biology 23 : 2595-2601.
- Piccardi, M. (2004).** *Background subtraction techniques: a review*, .
- Pintureau, B. ILV-Edition (Ed.), 2008.** *Les espèces européennes de Trichogrammes*. ILV-Edition, .
- Pizzol, J.; Desneux, N.; Wajnberg, E. and Thiéry, D. (2012).** *Parasitoid and host egg ages have independent impact on various biological traits in a Trichogramma species*, Journal of Pest Science 85 : 489-496.
- Pizzol, J.; Pintureau, B.; Khoualdia, O. and Desneux, N. (2010).** *Temperature-dependent differences in biological traits between two strains of Trichogramma cacoeciae (Hymenoptera: Trichogrammatidae)*, Journal of Pest Science 83 : 447-552.
- Prosper, O.; Ruktanonchai, N. and Martcheva, M. (2012).** *Assessing the role of spatial heterogeneity and human movement in malaria dynamics and control*, Journal of Theoretical Biology 303 : 1-14.
- Read, D. C. (1962).** *Notes on the Life History of Aleochara bilineata (Gyll.) (Coleoptera: Staphylinidae), and on Its Potential Value as a Control Agent for the Cabbage Maggot, Hylemya brassicae (Bouché) (Diptera: Anthomyiidae)*, The Canadian Entomologist 94 : 417-424.

- Reiser, M. (2009).** *The ethomics era ?*, Nature Methods 6 : 413-414.
- Rice, W. C. and Cogburn, R. R. (1999).** *Activity of the Entomopathogenic Fungus Beauveria bassiana (Deuteromycota: Hyphomycetes) Against Three Coleopteran Pests of Stored Grain*, Journal of Economic Entomology 92 : 691-694.
- Riis, L. and Esbjerg, P. (1998).** *Movement, Distribution, and Survival of Cyrtomenus bergi (Hemiptera: Cydnidae) within the Soil Profile in Experimentally Simulated Horizontal and Vertical Soil Water Gradients*, Environmental Entomology 27 : 1175-1181.
- Riley, C. V. Riley, C. V. (Ed.), **1893.** *Reports of observations and experiments in the practical work of the Division*. Washington, D.C. :US Dept. of Agriculture, Division of Entomology, .
- Ritter, F. and Persoons, C. (1974).** *Recent Development in Insect Pheromone Research, in Particular in the Netherlands*, Netherlands Journal of Zoology 25 : 261-275.
- Robert, F.-A.; Brodeur, J. and Boivin, G. (2016).** *Patch exploitation by non-aggressive parasitoids under intra- and interspecific competition*, Entomologia Experimentalis et Applicata 159 : 92-101.
- Roderick, G. K. and Navajas, M. (2003).** *Genes in new environments: genetics and evolution in biological control*, Nature Reviews Genetics 4 : 889-899.
- Rodriguez, A.; Zhang, H.; Klaminder, J.; Brodin, T.; Andersson, P. and Andersson, M. (2017).** *ToxTrac: A fast and robust software for tracking organisms*, Methods in Ecology and Evolution 9 : 460-464.
- Rosenberg, R.; Nilsson, H. C.; Hollerts, K. and Hellman, B. (1997).** *Density-dependent migration in an Amphiuira filiformis (Amphiuridae, Echinodermata) infaunal population*, Marine Ecology Progress Series 159 : 121-131.
- Rosenheim, J.; Meade, T.; Powch, I. and Schoenig, S. (1989).** *AGGREGATION BY FORAGING INSECT PARASITOIDS IN RESPONSE TO LOCAL VARIATIONS IN HOST DENSITY: DETERMINING THE DIMENSIONS OF A HOST PATCH*, Journal of Animal Ecology 58 : 101-117.
- Sakura, M. and Mizunami, M. (2001).** *Olfactory Learning and Memory in the Cockroach Periplaneta americana*, Zoological Science 18 : 21-28.
- Salt, G. (1935).** *Experimental studies in insect parasitism III—host selection*, Proceedings of the Royal Society of Biological Sciences 117 : 413-435.
- Salt, G. (1938).** *Experimental Studies in Insect Parasitism. VI_Host Suitability*, Bulletin of Entomological Research 29 : 223-246.
- Salt, G. (1940).** *Experimental Studies in insect Parasitism. VII. The Effects of Different Hosts on the Parasite Trichogramma evanescens Westw. (Hym. Chalcidoidae)*, Proceedings of the Royal Entomological Society of London 15 : 81-95.
- dos Santos, E. A.; Silva-Torres, C. S. A.; Barbosa, P. R. R.; Torres, J. B. and Blassioli-Moraes, M. C. (2017).** *Sexual behavior in ladybird beetles: Sex with lights on and a twist for Tenuisvalvae notata (Coleoptera: Coccinellidae)*, Behavioural Processes 144 : 93-99.
- Sasaba, T. (1966).** *Interspecific competition between two species of Trichogrammatidae III The analytical study on the competition*, Researches on Population Ecology 8 : 102-106.

- Scheiner, S. M. (1993).** *Genetics and Evolution of Phenotypic Plasticity*, Annual Review of Ecology and Systematics 24 : 35-68.
- Schiffers, B. and Wainright, H. (2011). *Biological Control and integrated protection*, .
- Schneider, C. A.; Rasband, W. S. and Eliceiri, K. W. (2012).** *NIH Image to ImageJ: 25 years of Image Analysis*, Nature Methods 9 : 671-675.
- Schneider, J. and Levine, J. (2014).** *Automated identification of social interaction criteria in Drosophila melanogaster*, Biology Letters 10 : 1-5.
- Schnepf, E.; Crickmore, N.; Van Rie, J.; Lereclus, D.; Baum, J.; Feitelson, J.; Zeigler, D. and Dean, D. (1998).** *Bacillus thuringiensis and Its Pesticidal Crystal Proteins*, Microbiology and Molecular Biology Reviews 62 : 775-806.
- Schwarz, M. and Frenzel, P. (2003).** *Population dynamics and ecology of ciliates (Protozoa, Ciliophora) in an anoxic rice field soil*, Biology and Fertility of Soils 38 : 245-252.
- Sheppard, J. K.; Preen, A. R.; Marsh, H.; Lawler, I. R.; Whiting, S. D. and Jones, R. E. (2006).** *Movement heterogeneity of dugongs, Dugong dugon (Müller), over large spatial scales*, Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 334 : 64-83.
- Shimoda, M. and Honda, K.-I. (2013).** *Insect reactions to light and its applications to pest management*, Applied Entomology and Zoology 48 : 413-421.
- Sih, A. (1982).** *Foraging Strategies and the Avoidance of Predation by an Aquatic Insect, Notonecta Hoffmanni*, Ecology 63 : 786-796.
- Simberloff, D. (2009).** *The Role of Propagule Pressure in Biological Invasions*, Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics 40 : 81-102.
- Simon, J. C. and Dickinson, M. H. (2010).** *A New Chamber for Studying the Behavior of Drosophila*, PlosOne 5 : 1-11.
- Sithanantham, S.; Abera, T. H.; Baumgärtner, J.; Hassan, S. A.; Löhr, B.; Monje, J. C.; Overholt, W. A.; Paul, A. V. N.; Wan, F. H. and Zebitz, C. P. W. (2001).** *Egg parasitoids for augmentative biological control of lepidopteran vegetable pests in Africa: Research status and needs*, International Journal of Tropical Insect Science 21 : 189-205.
- Smith, S. (1996).** *Biological Control with Trichogramma: Advances, Successes, and Potential of Their Use*, Annual Review of Entomology 41 : 375-406.
- Smouse, P.; Focardi, S.; Moorcroft, P.; Kie, J.; Forester, J. and Morales, J. (2010).** *Stochastic modelling of animal movement*, Philosophical Transactions of the Royal Society B 365 : 2201-2211.
- Soares, M.; Leite, G.; Zanuncio, J.; Rocha, S.; de Sa, V. and Serrao, J. (2007).** *Note: Flight capacity, parasitism and emergence of five Trichogramma (Hymenoptera: Trichogrammatidae) species from forest areas in Brazil*, Phytoparasitica 35 : 314-318.
- Soberón, J. M. (2010).** *Niche and area of distribution modeling: a population ecology perspective*, Ecography 33 : 159-167.
- Spieser, H.; Alling and Frisch, H. (1988). *Method of measuring the types of motion and configuration of biological and non-biological objects*, .

- Stanton, L. A.; Sullivan, M. S. and Fazio, J. M. (2015).** *A standardized ethogram for the felidae: A tool for behavioral researchers*, *Applied Animal Behaviour Science* 173 : 3-16.
- Strand, M. R. and Obrycki, J. J. (1996).** *Host Specificity of Insect Parasitoids and Predators*, *BioScience* 46 : 422-429.
- Sümer Ercan, F.; Öztemiz, S.; Özcan, S. and Tunçbilek, A. S. (2012).** *Detection of genetic polymorphism by RAPD-PCR in two Trichogramma (Hymenoptera: Trichogrammatidae) species in Turkey*, *Turkish Journal of Entomology* 36 : 177-182.
- Sümer Ercan, F.; Öztemiz, S.; Tunçbilek, A. S. and Stouthamer, R. (2011).** *Sequence Analysis of the Ribosomal DNA ITS2 Region in two Trichogramma Species (Hymenoptera: Trichogrammatidae)*, *Archives of Biological Sciences* 63 : 949-954.
- Suverkropp, B.; Bigler, F. and van Lenteren, J. (2001).** *Temperature influences walking speed and walking activity of Trichogramma brassicae (Hym., Trichogrammatidae)*, *Journal of Applied Entomology* 125 : 303-307.
- Suzuki, Y.; Tsuji, H. and Sasakawa, M. (1984).** *Sex allocation and effects of superparasitism on secondary sex ratios in the gregarious parasitoid, Trichogramma chilonis (Hymenoptera: Trichogrammatidae)*, *Animal Behaviour* 32 : 478 - 484.
- Tabashnik, B. E. (1994).** *Evolution of Resistance to Bacillus thuringiensis*, *Annual Review of Entomology* 39 : 47-79.
- Tabashnik, B. E.; Cushing, N. L.; Finson, N. and Johnson, M. W. (1990).** *Field Development of Resistance to Bacillus thuringiensis in Diamondback Moth (Lepidoptera: Plutellidae)*, *Journal of Economic Entomology* 83 : 1671-1676.
- Thomas, B.; Holland, J. and Minot, E. (2008).** *Elephant (Loxodonta africana) Home Ranges in Sabi Sand Reserve and Kruger National Park: A Five-Year Satellite Tracking Study*, *PlosOne* 3 : 1-8.
- Thompson, J. N. and Pellmyr, O. (1991).** *Evolution of Oviposition Behavior and Host Preference in Lepidoptera*, *Annual Review of Entomology* 36 : 65-89.
- Thorpe, K. W. (1985).** *Effects of height and habitat type on egg parasitism by Trichogramma minutum and T. pretiosum (Hymenoptera: Trichogrammatidae)*, *Agriculture, Ecosystems & Environment* 12 : 117 - 126.
- Thorpe, W. H. and Caudle, H. B. (1938).** *A study of the olfactory responses of insect parasites to the food plant of their host*, *Parasitology* 30 : 523-528.
- Tilman, D. (1999).** *Global environmental impacts of agricultural expansion: The need for sustainable and efficient practices*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 : 5995-6000.
- Travis, J. M. J. and Dytham, C. (1999).** *Habitat persistence, habitat availability and the evolution of dispersal*, *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 266 : 723-728.
- Tsuchida, K. (1991).** *Temporal behavioral variation and division of labor among workers in the primitively eusocial wasp, Polistes jadwigae Dalla Torre*, *Journal of Ethology* 9 : 129-134.
- Turchin, P., 1998.** *Quantitative Analysis of Movement : Measuring and Modeling Population Redistribution in Animals and Plants*. Sinauer Associates, .

- Urquhart, F. A. and Urquhart, N. R. (1978).** *Autumnal migration routes of the eastern population of the monarch butterfly (Danaus p. plexippus L.; Danaidae; Lepidoptera) in North America to the overwintering site in the Neovolcanic Plateau of Mexico*, Canadian Journal of Zoology 56 : 1759-1764.
- Vanlerberghe-Masutti, F. (1994).** *Molecular identification and phylogeny of parasitic wasp species (Hymenoptera: Trichogrammatidae) by mitochondrial DNA RFLP and RAPD markers*, Insect Molecular Biology 3 : 229-237.
- Vinson, S. (1976).** *Host Selection by Insect Parasitoids*, Annual Review of Entomology 1 : 109-134.
- Voegelé, J.; Daumal, J.; Brun, P. and Onillon, J. (1974).** *Action Du Traitement au Froid Et Aux Ultraviolets De L'œuf D'Euphestia kuehniella [Pyralidae] sur le taux de multiplication de Trichogramma evanescens et T. brasiliensis [Hymenoptera: Trichogrammatidae]*, Entomophaga 19 : 341-348.
- Wadley, F. M. (1957).** *Some Mathematical Aspects of Insect Dispersion*, Annals of the Entomological Society of America 50 : 230-231.
- Wajnberg, E. (1989).** *Analysis of variations of handling-time in Trichogramma maidis*, Entomophaga 34 : 397-407.
- Waloff, N. (1941).** *The Mechanisms of Humidity Reactions of Terrestrial Isopods*, Journal of Experimental Biology 18 : 115-135.
- Wanner, H.; Gu, H. and Dorn, S. (2006).** *Nutritional value of floral nectar sources for flight in the parasitoid wasp, Cotesia glomerata*, Physiological Entomology 31 : 127-133.
- Watanabe, T.; Nakamura, K. and Tagawa, J. (2018).** *Host-plant leaf-surface preferences of young caterpillars of three species of Pieris (Lepidoptera: Pieridae) and its effect on parasitism by the gregarious parasitoid Cotesia glomerata (Hymenoptera: Braconidae)*, European Journal of Entomology 115 : 25-29.
- Wehrhahn, C.; Poggio, T. and Bülthoff, H. (1982).** *Tracking and Chasing in Houseflies (Musca)*, Biological Cybernetics 45 : 123-130.
- Weseloh, R. (1971).** *Behavioral Responses of the Gypsy Moth Egg Parasitoid Ooencyrtus kuwanai to Abiotic Environmental Factors*, Annals of the Entomological Society of America 64 : 1050-1057.
- Westneat, D. F. and Fox, C. W. Westneat, D. F. & Fox, C. W. (Ed.), **2010.** *Evolutionary Behavioral Ecology*. Oxford University Press, .
- Whitham, T. G.; Bailey, J. K.; Schweitzer, J. A.; Shuster, S. M.; Bangert, R. K. et al. (2006).** *A framework for community and ecosystem genetics: from genes to ecosystems*, Nature Reviews Genetics 7 : 510-523.
- Williams, C. E. (1988).** *Movement, Dispersion, and Orientation of a Population of the Colorado Potato Beetle, Leptinotarsa decemlineata (Coleoptera: Chrysomelidae)*, in Eggplant, The Great Lakes Entomologist 21 : 31-38.
- Wilson, L. and Barnett, W. (1983).** *Degree-days: An aid in crop and pest management*, California Agriculture 37 : 4-7.
- Wright, R. H. (1958).** *The Olfactory Guidance of Flying Insects*, The Canadian Entomologist 90 : 81-89.

Yong, T.-H.; Pitcher, S.; Gardner, J. and Hoffmann, M. P. (2007). *Odor specificity testing in the assessment of efficacy and non-target risk for Trichogramma ostrinae (Hymenoptera: Trichogrammatidae)*, Biocontrol Science and Technology 17 : 135-153.

Zaslavski, V. A. and Umarova, T. Y. (1990). *Environmental and endogenous control of diapause in Trichogramma species*, Entomophaga 35 : 23-29.

Zouba, A. and Mahjoubi, K. (2010). *Biological Control of Tuta absoluta (Lepidoptera: Gelechiidae) with Release of Trichogramma cacoeciae (Hymenoptera: Trichogrammatidae) in Tomato Greenhouse in Tunisia*, The African Journal of Plant Science and Biotechnology 4 : 85-87.