



## Open Archive TOULOUSE Archive Ouverte (OATAO)

OATAO is an open access repository that collects the work of Toulouse researchers and makes it freely available over the web where possible.

This is an author-deposited version published in : <http://oatao.univ-toulouse.fr/>  
Eprints ID : 17312

**To cite this version :**

Catays, Guillaume. *Contribution à la caractérisation de la diversité génétique de l'abeille domestique Apis mellifera en France : cas du locus csd de détermination du sexe*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - ENVT, 2016, 313 p.

Any correspondence concerning this service should be sent to the repository administrator: [staff-oatao@listes-diff.inp-toulouse.fr](mailto:staff-oatao@listes-diff.inp-toulouse.fr)

# CONTRIBUTION A LA CARACTÉRISATION DE LA DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE DE L'ABEILLE DOMESTIQUE APIS MELLIFERA EN FRANCE : CAS DU LOCUS *CSD* DE DETERMINATION DU SEXE

---

THESE  
pour obtenir le grade de  
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement  
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

*par*

**CATAYS, Guillaume**

Né, le 06 septembre 1990 à Rodez (12)

---

**Directeur de thèse : M. Alain DUCOS**

---

## JURY

PRESIDENT :

**M. Patrick CALVAS**

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :

**M. Alain DUCOS**

**Mme Christelle CAMUS**

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

MEMBRE INVITE :

**M. Alain VIGNAL**

**Mme Kamila TABET- AOUL**

**Mme Lydia VILAGINES**

Directeur de Recherche, INRA, UMR 1388 GENPHYSE

Ingénieure INRA, UMR 1388 GENPHYSE

Dr Vétérinaire, commission apicole de la SNGTV



*Répartition des Enseignants-Chercheurs par Département.*

Mise à jour : 06/09/2016

**DIRECTRICE : ISABELLE CHMITELIN**

ELEVAGE ET PRODUITS/SANTE PUBLIQUE VETERINAIRE	SCIENCES BIOLOGIQUES ET FONCTIONNELLES	SCIENCES CLINIQUES DES ANIMAUX DE COMPAGNIE, DE SPORT ET DE LOISIRS
<p><b>Responsable : M. SANS</b></p> <p><u>ALIMENTATION ANIMALE :</u> M. ENJALBERT Francis, PR Mme PRIYMENKO Nathalie, MC Mme MEYNADIER Annabelle, MC</p> <p><u>EPIDEMIOLOGIE :</u> Mathilde PAUL, MC</p> <p><u>MALADIES REGLEMENTEES-ZOONOSES- MEDECINE PREVENTIVE DES CARNIVORES DOMESTIQUES-DROIT VETERINAIRE :</u> M. PICAUVET Dominique, PR</p> <p><u>PARASITOLOGIE-ZOOLOGIE :</u> M. FRANC Michel, PR M. JACQUIET Philippe, PR M. LIENARD Emmanuel, MC Mme BOUHSIRA Emilie, MC</p> <p><u>HYGIENE ET INDUSTRIE DES ALIMENTS :</u> M. BRUGERE Hubert, PR M. BAILLY Jean-Denis, PR Mme BIBBAL Delphine, MC Mme COSTES Laura, AERC Mme DAVID Laure, MCC</p> <p><u>PATHOLOGIE DE LA REPRODUCTION :</u> M. BERTHELOT Xavier, PR M. BERGONIER Dominique, MC Mme CHASTANT-MAILLARD Sylvie, PR Mme HAGEN-PICARD Nicole, PR M. NOUVEL Laurent-Xavier, MC Mme MILA Hanna, MC</p> <p><u>PATHOLOGIE DES RUMINANTS :</u> M. SCHELCHER François, PR M. FOUCRAS Gilles, PR M. CORBIERE Fabien, MC M. MAILLARD Renaud, MC M. MEYER Gilles, PR</p> <p><u>PRODUCTION ET PATHOLOGIE AVIAIRE ET PORCINE :</u> Mme WARET-SZKUTA Agnès, MC M. JOUGLAR Jean-Yves, MC M. GUERIN Jean-Luc, PR M. LE LOC'H Guillaume, MC</p> <p><u>PRODUCTIONS ANIMALES AMELIORATION GENETIQUE ECONOMIE :</u> M. DUCOS Alain, PR M. SANS Pierre, PR M. RABOISSON Didier, MC</p>	<p><b>Responsable : Mme GAYRARD</b></p> <p><u>ANATOMIE :</u> M. MOGICATO Giovanni, MC M. LIGNEREUX Yves, PR Mme DEVIERS Alexandra, MC</p> <p><u>ANATOMIE PATHOLOGIQUE - HISTOLOGIE :</u> M. DELVERDIER Maxence, PR Mme LETRON-RAYMOND Isabelle, MC Mme BOURGES-ABELLA Nathalie, PR Mme LACROUX Caroline, PR</p> <p><u>BIOLOGIE MOLECULAIRE :</u> Mme BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle, MC</p> <p><u>MICROBIOLOGIE – IMMUNOLOGIE - MALADIES INFECTIEUSES :</u> M. MILON Alain, PR M. BERTAGNOLI Stéphane, PR M. VOLMER Romain, MC Mme BOULLIER Séverine, MC Mme DANIELS Hélène, MC</p> <p><u>BIOSTATISTIQUES :</u> M. CONCORDET Didier, PR M. LYAZRHI Faouzi, MC</p> <p><u>PHARMACIE-TOXICOLOGIE :</u> M. PETIT Claude, PR Mme CLAUW Martine, PR M. GUERRE Philippe, PR M. JAEG Philippe, MC</p> <p><u>PHYSIOLOGIE –PHARMACOLOGIE THERAPEUTIQUE :</u> M. BOUSQUET-MELOU Alain, PR Mme GAYRARD-TROY Véronique, PR Mme FERRAN Aude, MC M. LEFEBVRE Hervé, PR</p> <p><u>BIOCHIMIE. :</u> Mme BENNIS-BRET Lydie, MC</p> <p><u>ANGLAIS :</u> M. SEVERAC Benoît, PLPA Mme MICHAUD Françoise, PCEA</p>	<p><b>Responsable : Mme CADIERGUES</b></p> <p><u>ANESTHESIOLOGIE</u> M. VERWAERDE Patrick, MC</p> <p><u>CHIRURGIE :</u> M. AUTEFAGE André, PR M. ASIMUS Erik, MC M. MATHON Didier, MC Mme MEYNAUD-COLLARD Patricia, MC Mme PALIERNE Sophie, MC</p> <p><u>MEDECINE INTERNE :</u> Mme DIQUELOU Armelle, MC M. DOSSIN Olivier, MC Mme LAVOUE Rachel, MC Mme GAILLARD-THOMAS Elodie, MCC</p> <p><u>OPHTALMOLOGIE :</u> M. DOUET Jean-Yves, MC</p> <p><u>DERMATOLOGIE :</u> Mme CADIERGUES Marie-Christine, PR</p> <p><u>IMAGERIE MEDICALE</u> M. CONCHOU Fabrice, MC</p> <p><u>BIOLOGIE MOLECULAIRE :</u> Mme TRUMEL Catherine, PR</p> <p><u>PATHOLOGIE DES EQUIDES :</u> M. CUEVAS RAMOS Gabriel, MC Mme PRADIER Sophie, MC Mme LALLEMAND Elodie, AERC</p>



# REMERCIEMENTS

---

## **À Monsieur le Professeur Patrick CALVAS,**

Professeur des Universités

Praticien hospitalier

*Génétique médicale - Pôle biologie - CHU de Toulouse - Hôpital Purpan*

Qui nous fait l'honneur d'accepter de présider notre jury de thèse.  
Hommages respectueux.

## **À Monsieur le Professeur Alain DUCOS,**

Professeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

*Productions Animales – Zootechnie - Génétique Quantitative et des Populations*

Qui nous fait l'honneur d'accepter la direction de cette thèse.  
Pour m'avoir pris sous son aile depuis mon entrée dans cette école.  
Pour avoir su faire en sorte que le thème de cette thèse corresponde à mes attentes ainsi que pour ses corrections rapides, justes et pertinentes.  
Pour sa pédagogie efficace et élaborée doublée d'une rigueur bienveillante.  
Pour ses valeurs, ses idées, ses combats et son sens aigu de l'intérêt général humain.  
Qu'aussi bien l'Homme que le Professeur trouve ici l'assurance de mon immense respect et de ma sincère reconnaissance.

## **À Madame le Docteur Christelle BOUCLAINVILLE-CAMUS,**

Maître de conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

*Biologie cellulaire et moléculaire*

Qui nous fait l'honneur de prendre part à notre jury de thèse.  
Très sincères remerciements.

## **À Monsieur le Docteur Alain VIGNAL,**

Directeur de Recherche à l'Institut National de la Recherche Agronomique  
*UMR 1388 GenPhySE - Génétique Physiologie et Systèmes d'Elevage*

Pour m'avoir accepté en stage au sein de son équipe.  
Pour ses précieux conseils, son savoir et son expertise.  
Pour ses corrections avisées.  
Qu'il trouve ici le témoignage de ma grande sympathie et de ma gratitude

## **À Madame Kamila TABET-AOUL,**

Ingénieure à l'Institut National de la Recherche Agronomique  
*UMR 1388 GenPhySE - Génétique Physiologie et Systèmes d'Elevage*

Pour m'avoir encadré au cours de mes expérimentations  
Pour m'avoir accueilli dans son bureau  
Pour ses conseils judicieux  
Pour sa bonne humeur communicative et son enthousiasme  
Qu'elle soit assurée de mon amitié et de mon estime et qu'elle reçoive mes remerciements

*« La connaissance est une navigation dans un océan d'incertitudes à travers des archipels de certitudes. »*

*Les sept savoirs nécessaires à l'éducation du futur*  
Edgar Morin

# TABLES DES MATIERES

---

LISTE DES ANNEXES.....	14
LISTE DES FIGURES.....	15
LISTE DES TABLEAUX.....	18
LISTE DES PHOTOGRAPHIES.....	19
LISTE DES ABREVIATIONS.....	20
INTRODUCTION.....	23
PARTIE I : BIOLOGIE DE L'ABEILLE.....	25
CHAPITRE 1 : L'ABEILLE AU SEIN DU REGNE ANIMAL.....	27
A. Classification et taxonomie.....	27
a. Histoire de la classification.....	27
b. L'ordre des Hyménoptères.....	30
c. La famille des <i>Apidae</i> .....	31
d. Le genre <i>Apis</i> .....	32
B. Occurrences historiques.....	35
a. De l'origine des abeilles.....	35
i. Des fossiles datant du Crétacé.....	35
ii. L'ancêtre des abeilles.....	36
iii. La coévolution avec les Angiospermes.....	37
b. Représentations, symbolisme et littérature.....	38
i. L'abeille de la Préhistoire à l'Antiquité.....	38
ii. Auteurs célèbres de l'Antiquité au Moyen Âge.....	40
iii. Des avancées majeures permises par le microscope.....	41
C. Rôles de l'abeille dans nos écosystèmes.....	44
a. Le service de pollinisation.....	44
i. Mécanisme de la pollinisation.....	44
ii. Economie de la pollinisation.....	45
iii. De l'intérêt de la biodiversité.....	48
b. Autres services de l'abeille et des pollinisateurs.....	49
i. L'abeille, sentinelle de l'environnement.....	49
ii. L'abeille dans la lutte contre le réchauffement climatique.....	49
iii. Abeilles, plantes et animaux sauvages.....	50



D.	Le déclin des abeilles .....	51
a.	Les abeilles domestiques .....	51
i.	Un phénomène mondial .....	51
ii.	Mortalité des ruchers en Europe .....	53
iii.	Des motifs d'espoir ? .....	55
b.	Quid des abeilles sauvages ? .....	56
E.	Revue des menaces actuelles pour l'abeille .....	57
a.	Maladies et parasites .....	57
i.	La loque américaine ( <i>Paenibacillus larvae</i> ) .....	57
ii.	La loque européenne ( <i>Melissococcus plutonius</i> ) .....	59
iii.	Le varroa ( <i>Varroa destructor</i> ) .....	60
b.	Le frelon asiatique .....	63
c.	Effets des pesticides .....	65
d.	Les monocultures .....	68
CHAPITRE 2 : MORPHO-ANATOMIE DE L'ABEILLE .....		69
A.	Anatomie générale d'une abeille ouvrière .....	69
a.	Caractères généraux .....	69
b.	La tête .....	70
i.	Organes sensitifs : les yeux .....	71
ii.	Organes sensitifs : les antennes .....	72
iii.	Appareil buccal .....	73
iv.	Glandes annexes du tube digestif .....	74
v.	Cerveau .....	74
c.	Le thorax .....	75
i.	Les pattes .....	75
ii.	Les ailes .....	76
d.	L'abdomen .....	77
i.	Le jabot .....	77
ii.	Les glandes cirières .....	78
iii.	Organe de Nasonov .....	78
B.	Particularités par type d'abeille .....	79
a.	La reine .....	79
b.	Le mâle .....	80

CHAPITRE 3 : PHYSIOLOGIE DE L'ABEILLE, LA VIE EN COLONIE DANS LA RUCHE .....	82
A. Les différentes castes d'abeilles .....	82
a. La reine.....	83
i. La mère de la colonie .....	83
ii. Evolution d'une colonie sans reine.....	84
b. Les mâles ou faux-bourçons .....	85
c. Les femelles ouvrières.....	85
B. Organisation au sein de la ruche .....	86
a. Répartition des tâches.....	86
i. La ponte : monopole de la reine .....	86
ii. Travaux divers des ouvrières .....	87
b. Communication .....	89
i. La danse des abeilles.....	89
ii. Autres formes de langage .....	94
C. Reproduction .....	95
a. L'essaimage.....	95
b. La supersédure.....	97
c. Influence de l'apiculteur sur la reproduction de ses colonies .....	98
i. Essaimage artificiel .....	98
ii. Greffe de reine .....	99
CHAPITRE 4 : ELEVAGE DE L'ABEILLE : COMPRENDRE L'APICULTURE .....	100
A. L'apiculture au fil des siècles.....	100
B. Les principaux produits de la ruche .....	101
a. Le miel.....	102
i. Production par l'abeille.....	102
ii. Utilisations.....	103
b. La cire.....	104
c. La propolis.....	105
d. Le pollen.....	106
e. La gelée royale .....	107
C. Panorama de la filière française .....	109
a. Dénombrement et profil sociologique des apiculteurs .....	109
b. Localisation .....	110
c. Évolution sur la période 1997-2010 .....	110
d. Chiffres d'affaire de la filière.....	111

CHAPITRE 1 : PARTICULARITES GENETIQUES CHEZ L'ABEILLE .....	117
A. Un génome entièrement séquencé.....	117
B. Déterminisme sexuel .....	118
C. La fécondation multiple de la reine.....	119
a. Principe de la polyandrie.....	119
b. Les lignées paternelles .....	120
D. Structure de l'ADN mitochondrial.....	121
CHAPITRE 2 : METHODES D'EVALUATION DE LA DIVERSITE GENETIQUE ...	122
A. Préambule.....	122
a. Les sous-espèces .....	122
b. Les écotypes .....	122
B. Analyses morphométriques .....	123
a. Morphométrie standard .....	123
b. Morphométrie géométrique.....	124
C. Analyses moléculaires.....	126
a. Utilisation de l'ADNmt.....	126
b. Utilisation des marqueurs microsatellites .....	127
c. Utilisation des marqueurs SNP .....	128
D. Comparaison des différentes méthodes.....	129
a. ADNmt et Microsatellites .....	129
b. Morphométrie standard versus morphométrie géométrique .....	129
c. Méthodes moléculaires versus morphométriques .....	130
CHAPITRE 3 : PRINCIPALES SOUS-ESPECES D'APIS MELLIFERA ET LEURS CARACTERISTIQUES .....	132
A. Géographie des sous-espèces d' <i>Apis mellifera</i> .....	132
B. La lignée M .....	133
a. L'abeille noire : <i>Apis mellifera mellifera</i> .....	133
C. La lignée A .....	135
a. L'abeille africaine : <i>Apis mellifera scutellata</i> .....	135
D. La lignée C .....	137
a. L'abeille jaune italienne : <i>Apis mellifera ligustica</i> .....	137
b. L'abeille carniolienne : <i>Apis mellifera carnica</i> .....	138
c. L'abeille caucasienne : <i>Apis mellifera caucasica</i> .....	139
E. Autres lignées.....	140

F.	Les souches synthétiques .....	140
a.	L'abeille Buckfast .....	140
G.	Structure génétique des populations d'abeilles françaises .....	143
a.	Une information disparate .....	143
b.	L'abeille noire prédominante malgré tout .....	144
CHAPITRE 4 : ETAT DES LIEUX DE LA SELECTION APICOLE EN France .....		147
A.	De l'intérêt de la sélection en apiculture .....	147
a.	Pistes de réflexions pour la mise en place d'une sélection .....	147
b.	Héritabilités des caractères chez l'abeille .....	148
B.	Principaux acteurs de la sélection en France.....	151
a.	Les producteurs de reines .....	151
b.	Les producteurs de gelée royale .....	151
c.	Les Conservatoires de l'abeille noire .....	152
d.	L'ITSAP .....	153
C.	Limites et perspectives .....	155
a.	La maîtrise de l'accouplement .....	155
b.	Des critères de sélection divergents .....	155
c.	L'absence de contrôle de performance.....	156
d.	La sélection de la résistance au Varroa .....	156
PARTIE III : PARTIE EXPERIMENTALE : ETUDE DU LOCUS CSD SUR UN ECHANTILLON REPRESENTATIF D'ABEILLES DU PROJET SeqApiPop .....		161
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION .....		163
A.	La détermination sexuelle chez <i>A. mellifera</i> .....	163
a.	L'haplodiploïdie .....	163
b.	Structure du gène <i>csd</i> .....	164
i.	Localisation chromosomique .....	164
ii.	Région génomique de <i>csd</i> .....	164
iii.	Des domaines remarquables .....	166
c.	CSD, un gène issu d'une duplication .....	168
i.	Origine du gène <i>csd</i> .....	168
ii.	Structure du gène <i>fem</i> .....	171
d.	Mécanisme moléculaire de détermination du sexe .....	172
i.	CSD, un signal primaire.....	172
ii.	L'épissage sexe-spécifique de <i>fem</i> .....	173
iii.	L'action de la protéine <i>tra2</i> .....	173

iv.	Suite de la cascade de détermination du sexe.....	174
e.	Variabilité allélique de <i>csd</i> .....	176
i.	Polymorphisme au sein de l'espèce <i>A. mellifera</i> .....	176
ii.	Polymorphisme interspécifique.....	176
B.	Le projet SeqApiPop.....	178
a.	Objectifs, enjeux et contexte.....	178
b.	Populations échantillonnées.....	179
c.	Intérêt du projet pour le locus <i>csd</i> .....	180
C.	Objectifs de l'étude.....	181
CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES.....		182
A.	Travaux préliminaires.....	182
a.	Compilation des amorces préexistantes.....	182
b.	Etude de la séquence de référence.....	184
c.	Définition de nouvelles amorces.....	184
B.	Tests d'amplification et de séquençage.....	185
a.	De nombreux couples testés.....	185
i.	Protocole PCR.....	185
ii.	Electrophorèse sur gel d'agarose.....	185
iii.	Résultats.....	186
b.	Des séquences conformes.....	187
i.	Choix des produits à séquencer.....	187
ii.	Protocole du séquençage.....	187
iii.	Résultats des tests de séquençage.....	189
C.	Etude principale.....	191
a.	Échantillonnage.....	191
i.	Les abeilles du projet SeqApiPop.....	191
ii.	Les abeilles de notre étude.....	191
b.	De l'ADN jusqu'aux séquences.....	193
i.	Couples d'amorces utilisés.....	193
ii.	Seconde purification.....	193
c.	Arbres phylogénétiques.....	195
d.	Détection de nouveaux allèles.....	196
e.	Fréquences alléliques.....	196
D.	Etude complémentaire.....	197

CHAPITRE 3 : RESULTATS.....	199
A. Description des séquences.....	199
B. Structure des populations échantillonnées .....	202
C. Inventaire des allèles et calculs des fréquences alléliques .....	204
a. Haplotypes et allèles.....	204
b. Etude de la diversité allélique des sous-populations .....	213
c. Etude des nouveaux allèles .....	215
d. Etude de la taille de la région à motif répété.....	218
D. Reconstitution de la région inconnue de l'intron 5 .....	220
CHAPITRE 4 : DISCUSSION.....	222
A. Bilan des résultats et perspectives .....	222
a. De l'intérêt des SNP dans la genèse de nouveaux allèles .....	222
b. De probables biais d'échantillonnages .....	225
c. Des séquences support de travaux ultérieurs.....	225
d. Etude du mécanisme d'allongement de la région hypervariable.....	226
B. Conséquence pratique de l'homozygotie au locus <i>csd</i> chez une population consanguine.....	227
a. Un couvain clairsemé.....	227
b. Un test rapide pour allèle <i>csd</i> .....	229
C. Haplodiploïdie et insectes sociaux .....	230
a. La théorie de la sélection de parentèle .....	230
b. Asymétries génétiques associées à l'haplodiploïdie .....	231
CONCLUSION .....	233
BIBLIOGRAPHIE .....	237
ANNEXES .....	287

# LISTE DES ANNEXES

---

Annexe 1 : Les 20 acides aminés et leurs symboles internationaux .....	287
Annexe 2 : Correspondance entre codons et acides aminés.....	288
Annexe 3 : Représentation schématique de la réaction de Sanger.....	289
Annexe 4 : Purification de produit PCR : exonucléase I et Shrimp Alcaline Phosphatase avant séquençage .....	292
Annexe 5 : Mode opératoire « séquençage pour le run de service commun ».....	298
Annexe 6 : Mode opératoire « Extraction d'ADN à partir d'abeilles » .....	301
Annexe 7 : Date de prélèvement et département de provenance des abeilles "ITSAP" .....	303
Annexe 8 : Caractéristiques des abeilles de l'étude principale.....	305
Annexe 9 : Mode opératoire « Purification des ddNTP fluorescents ».....	308
Annexe 10 : Caractéristiques des abeilles de l'étude complémentaire .....	309
Annexe 11 : Arbre phylogénétique réalisé selon la méthode Neighbour Joining à partir des séquences de l'étude principale .....	310

# LISTE DES FIGURES

---

Figure 1 : Phylogénie de la super-famille Apoidea Apiformes basée sur la morphologie des adultes et le séquençage de 5 gènes. ....	29
Figure 2 : Classification d' <i>Apis mellifera</i> .....	30
Figure 3 : Fossile de <i>Melittosphex burmensis</i> .....	35
Figure 4 : Peinture néolithique rupestre de la Cueva de la Araña (Valence, Espagne ; -5000 av. J.-C.) représentant la “cueillette” du miel par une silhouette féminine.....	38
Figure 5 : Représentation d’une scène d’apiculture sur la tombe de Pasaba (TT279).....	39
Figure 6 : Première figure d' <i>Apis mellifera</i> examinée sous microscope.....	42
Figure 7 : Appareil génital de l’abeille femelle.....	42
Figure 8 : Impact des pollinisateurs sur l'alimentation humaine.....	46
Figure 9 : Mortalités hivernales des colonies d’abeilles collectées par le programme EPILOBEE 2012-2013.....	53
Figure 10: Taux de mortalité hivernale et en saison apicole (avec intervalles de confiance à 95 %) des colonies d’abeilles au cours de deux campagnes du programme Résabeilles.....	54
Figure 11 : A. Abeille équipée d’une puce RFID sur son thorax ; B. Entrée d’une ruche équipée d’un dispositif de lecture des puces RFID. ....	66
Figure 12 : La tête de l’abeille .....	71
Figure 13 : Structure de l'antenne d'une abeille ouvrière en microscopie électronique.....	72
Figure 14 : Abeille se nettoyant les antennes grâce au peigne antennaire .....	75
Figure 15 : Jabot de l'abeille rempli de nectar. a. Le jabot b. Le proventricule .....	77
Figure 16 : Ultrastructure des glandes cirières et gouttes de cire sortant des puits.....	78
Figure 17 : Chronologie de l’activité des ouvrières .....	88
Figure 18 : La danse en rond.....	90
Figure 19 : La danse frétilante. ....	91
Figure 20 : Indication de la direction, angle d’environ 60° vers la droite.....	92
Figure 21 : Indication de la direction, angle d’environ 60° vers la gauche.....	92
Figure 22 : Indication de la direction, angle nul, source située entre la ruche et le soleil .....	93
Figure 23 : Indication de la direction, angle nul, source située derrière la ruche par rapport au soleil. ....	93
Figure 24 : a. Mesure de la coloration b. L’indice cubital .....	123



Figure 25 : Le logiciel ABIS. a. Image de l'aile antérieure en entrée du logiciel. b. Reconnaissance des cellules et repérage des points-repères par le logiciel .....	124
Figure 26 : Répartition géographique des lignées évolutives et des sous-espèces d' <i>Apis mellifera</i> en Europe, au Moyen Orient et en Afrique.....	142
Figure 27 : a. Proportions des différentes lignées mitochondriales .....	145
Figure 28 : Région génomique du locus <i>csd</i> .....	164
Figure 29 : Première séquence publiée d'ADN codant de <i>csd</i> et correspondance en acides aminés.....	165
Figure 30 : Représentation schématique de la région d'intérêt du locus <i>csd</i> .....	166
Figure 31 : Exemple de région hypervariable chez <i>A. mellifera</i> et <i>A. dorsata</i> .....	167
Figure 32 : Carte génétique de la région SDL.....	169
Figure 33 : Mutations non-synonymes fixées chez <i>csd</i> .....	170
Figure 34 : Représentation schématique de plusieurs séquences protéiques de <i>csd</i> et comparaison à la séquence de <i>fem</i> .....	171
Figure 35 : Représentation schématique des premières étapes moléculaires de la cascade de détermination du sexe.....	175
Figure 36 : Exemple de visualisation d'une séquence avec Chromas® (2.6) .....	189
Figure 37 : a. Région hypervariable de nos abeilles tests. b. Observation de la différence de taille sur le gel d'agarose .....	190
Figure 38 : Aire de répartition des races et variétés d' <i>Apis mellifera</i> , en Europe et dans le pourtour méditerranéen. ....	192
Figure 39 : a. Extrémité 5' des séquences sur l'exon 6. b. Extrémité 3' des séquences sur l'exon 8.....	194
Figure 40 : Région inconnue du gène <i>csd</i> , située entre les exons 5 et 6 (vue à 3 échelles différentes). ....	197
Figure 41 : Stratégie de séquençage pour la région inconnue.....	198
Figure 42 : Polymorphisme des séquences <i>csd</i> . a. Région hypervariable b. Insertions/délétions (flèches vertes) et SNP (flèches rouges) .....	200
Figure 43 : Les 73 allèles <i>csd</i> .....	204
Figure 44 : Variabilité allélique des sous-populations .....	213
Figure 45 : Intervalles de confiance à 95% des ratios estimateurs de diversité allélique .....	214
Figure 46 : Localisation des îles d'Ouessant et de Colonsay.....	214
Figure 47 : Ratio du nombre de nouveaux allèles par le nombre d'abeilles de chaque échantillon .....	217
Figure 48 : Taille moyenne par population de la région à motif répété.....	219

Figure 49 : Relation entre la production de mâles diploïdes, le nombre d'allèles dans la population et la taille de la population .....	227
Figure 50 : Asymétries génétiques associées à l'haplodiploïdie.....	231

# LISTE DES TABLEAUX

---

Tableau 1 : Poids relatif des différents types d'apiculteurs en France en 2010. ....	109
Tableau 2 : Evolution des chiffres-clés sur la période 1994/2004/2010. ....	110
Tableau 3 : Chiffre d'affaires de la filière apicole en 2010 et répartition par produits et services .....	111
Tableau 4 : Variation du taux d'auto-provisionnement en miel entre 2004 et 2010. ....	112
Tableau 5 : Amorces collectées dans la bibliographie .....	183
Tableau 6 : Caractéristiques des amorces .....	184
Tableau 7 : Résultats des tests d'amplification.....	186
Tableau 8 : Couples d'amorces de l'étude principale .....	193
Tableau 9 : Caractérisation du polymorphisme des séquences <i>csd</i> .....	200
Tableau 10 : Caractérisation des indels des séquences <i>csd</i> .....	201
Tableau 11 : Séquences protéiques et fréquences alléliques des 73 allèles <i>csd</i> des abeilles échantillonnées .....	206
Tableau 12 : Nombre d'allèles dans chaque sous-population de notre échantillon .....	213
Tableau 13: Répartition des nouveaux allèles au sein des sous-populations .....	216
Tableau 14 : Longueur de la région à motif répété .....	218
Tableau 15 : Nomenclature internationale des nucléotides.....	221

# LISTE DES PHOTOGRAPHIES

---

Photographie 1 : Individu de l'espèce <i>Apis dorsata</i> .....	33
Photographie 2 : Individu de l'espèce <i>Apis florea</i> .....	33
Photographie 3 : Individu de l'espèce <i>Apis cerana</i> .....	34
Photographie 4 : « Bouillie » larvaire symptomatique de la loque américaine.....	58
Photographie 5 : Couvain atteint de loque européenne, photographie de Preben Kristiansen.	59
Photographie 6 : Femelle de <i>Varroa destructor</i> sur le thorax d'un faux-bourdon et sur une larve .....	61
Photographie 7 : Le Frelon asiatique.....	63
Photographie 8 : Piège pour frelons asiatiques de l'entreprise Vété-Pharma®.....	64
Photographie 9 : Pelotes de pollen sur les pattes d'une abeille butineuse .....	76
Photographie 10 : Une reine marquée au milieu de ses ouvrières .....	79
Photographie 11 : Deux faux-bourdons au milieu des ouvrières .....	80
Photographie 12 : Un essaim d'abeilles autour d'un arbre.....	95
Photographie 13 : Ouvrière battant le rappel en exhibant sa glande de Nasanov .....	96
Photographie 14 : Introduction d'une reine dans une cage grillagée.....	99
Photographie 15 : Gelée royale au sein d'une cellule royale.....	107
Photographie 16 : L'abeille noire <i>Apis mellifera mellifera</i> .....	133
Photographie 17 : L'abeille africaine <i>Apis mellifera scutellata</i> .....	136
Photographie 18 : L'abeille italienne <i>Apis mellifera ligustica</i> .....	137
Photographie 19 : L'abeille carniolienne <i>Apis mellifera carnica</i> .....	139
Photographie 20 : L'abeille Buckfast®.....	140
Photographie 21 : Exemple de couvain clairsemé .....	228

# LISTE DES ABREVIATIONS

---

A, T, G, C : Adénine, Thymine, Guanine, Cytosine

*A. mellifera* : *Apis mellifera*

ABIS : Automatic Bee Identification System (Système d'identification automatique des abeilles)

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ADNmt : ADN mitochondrial

ANERCEA : Association Nationale des Eleveurs de Reines et des Centres d'Elevages Apicoles

ARN : Acide RiboNucléique

ARNi : ARN interférent

ARNt : ARN de transfert

ATP : Adénosine TriPhosphate

BER : abeilles de la région de Berlin

BLUP : Best Linear Unbiased Predictor (meilleur prédicteur linéaire non biaisé)

CCD : Colony Collapse Disorder (Syndrome d'effondrement des colonies)

cM : centi Morgan

CNRS : Centre National de la Recherche Scientifique

CO I : sous-unité 1 de l'enzyme cytochrome c oxydase

CO II : sous-unité 2 de l'enzyme cytochrome c oxydase

COLOSS : prevention of honey bee COLony LOSSes (prévention des pertes de colonies d'abeilles)

*csd* : gène « *complementary sex determiner* »

ddNTP : mélange de plusieurs didésoxyribonucléotides

dNTP : mélange de plusieurs désoxyribonucléotides

*dsx* : gène « *doublesex* »

Exo1 : enzyme exonucléase 1

*fem* : gène « *feminizer* »

GENPHYSE : GENétique PHYsiologie et Systèmes d'Elevage

GPGR : Groupement des Producteurs de Gelée Royale

H<sub>2</sub>O : molécule d'eau

INRA : Institut National de la Recherche Agronomique

ITA : abeilles d'Italie

ITSAP : Institut Technique et Scientifique de l'Apiculture et de la Pollinisation

J-C : Jésus-Christ

kb : kilo-paires de bases

miRNAs : micro ARNs

NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide

OUE : abeilles de l'île d'Ouessant

ORF : open-reading frame (cadre de lecture ouverte)

PACA : Provence-Alpes-Côte d'Azur

pb : paires de bases

PCR : Polymerase Chain Reaction (réaction de polymérase en chaîne)

PDDA : Plan de Développement Durable de l'Apiculture

PSD : Potential Specifying Domain

PrADE : Protection des Abeilles Dans l'Environnement

Protéine RS : protéine riche en motifs contenant les acides aminés arginine et sérine

QMP : Queen Mandibular Pheromon (Phéromone mandibulaire de la reine)

QTL : Quantitative Trait Loci (Locus de caractères quantitatifs)

RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism (Polymorphisme de longueur des fragments de restriction)

RRM : RNA Recognition Motif (Motif de reconnaissance de l'ARN)

SAP : Shrimp Alkaline Phosphatase

SDL : Sex Determination Locus (Locus de détermination du sexe)

SICAMM : *Societas Internationalis pro Conservatione Apis melliferae melliferae*

SIQO : Signes d'Identification de la Qualité et de l'Origine

SLO : abeilles de Slovénie

SMIC : Salaire Minimum Interprofessionnel de Croissance

SNP : Single Nucleotide Polymorphism (polymorphisme nucléotidique)

*tra* : gène « *transformer* »

UK : abeilles de l'île de Colonsay (Royaume-Uni)

UMR : Unité Mixte de Recherche

UNAF : Union Nationale de l'Apiculture Française

UV : Ultra-Violet

VSB : Varroa Surviving Bee (abeille résistante au varroa)

# INTRODUCTION

---

Insecte fascinant pour certains, effrayant pour d'autres, l'abeille n'en reste pas moins un élément essentiel de la vie sur terre. Pour la plupart d'entre nous, elle fait partie, au même titre que les mouches, les fourmis ou encore les guêpes, de ces animaux qui apparaissent exclusivement pour nous déranger lorsqu'ils s'invitent à nos repas en extérieur. Pourtant, elle abat quotidiennement un travail considérable sans lequel la vie des hommes serait fort pénible. Son action déterminante pour l'espèce humaine, via la pollinisation des plantes angiospermes en particulier, n'a pas toujours été appréciée à sa juste valeur. Longtemps, elle fut la grande oubliée des programmes de développement de l'agriculture alors même qu'elle contribuait activement à leur succès, notamment pour l'augmentation des rendements céréaliers. Animal de rente atypique, l'abeille est ainsi restée l'apanage de quelques professionnels et de milliers d'amateurs passionnés et souvent retraités.

Mais ce manque de considération n'est pas sans conséquences. En effet, comme nous aurons l'occasion de le voir au cours de cette thèse, les colonies d'abeilles domestiques et sauvages ont fortement décliné, et déclinent toujours, ce qui menace gravement l'agriculture mondiale, européenne et française. La répétition des cris d'alerte et la publication d'études scientifiques décrivant une situation devenue objectivement très alarmante ont fini par éveiller les consciences et, désormais, l'abeille ne disparaît plus silencieusement. Au contraire, se préoccuper des abeilles semble être devenu une activité à la mode. On ne compte plus les initiatives publiques ou privées visant à installer un rucher sur un toit, à créer des parterres de fleurs ou des refuges à abeilles. Caution « verte » ou engagement sincère, l'abeille est désormais au centre de multiples débats. Tant et si bien que les pouvoirs publics se sont progressivement emparés de la question. Ainsi, dans le cadre du « Plan de développement durable de l'apiculture sur la période 2013-2016 », le monde de la recherche a été sollicité pour tenter de comprendre les multiples causes de ce déclin et y remédier.

La génétique, au sens large, est l'un des leviers mobilisables pour maîtriser et enrayer le déclin des abeilles, et la publication, en 2006, de la première séquence complète de cet insecte, a ouvert de nouvelles perspectives importantes et intéressantes dans ce domaine. De multiples projets sont actuellement en cours, parmi lesquels le projet INRA-ITSAP SeqApiPop qui vise à caractériser la diversité génétique de l'espèce *Apis mellifera* en France, et dans le cadre duquel s'inscrit cette thèse.



Dans une première partie, de nombreux thèmes en lien avec la biologie de l'abeille seront abordés, de manière synthétique, et actualisés. Ainsi, la place de l'abeille au sein du règne animal sera discutée à travers sa classification, son histoire et ses rôles dans les écosystèmes. Les causes du déclin des abeilles seront brièvement analysées. Des éléments d'anatomie et de physiologie seront ensuite introduits. Il s'agira de mettre en valeur les caractéristiques principales de l'abeille, en lien avec son mode de vie dans la ruche et sa reproduction. Enfin, une présentation sera faite des produits de la ruche et des éléments structurants de la filière apicole.

Dans une seconde partie, des éléments de génétique seront progressivement introduits, à travers les particularités du génome de l'abeille et les moyens disponibles pour étudier la diversité des sous-espèces d'*Apis mellifera*. Ces dernières seront ensuite présentées en soulignant leurs spécificités et leur localisation géographique. Finalement, il sera question de sélection génétique en apiculture, de ce qui existe déjà, des perspectives mais aussi des limites.

Dans la troisième et dernière partie de la thèse, le travail expérimental réalisé lors d'un stage de deux mois et demi au centre INRA de Castanet-Tolosan (UMR 1388 GENPHYSE) sera présenté, en suivant la structure d'un article scientifique. Il sera ainsi question du locus de détermination du sexe *csd* chez l'abeille. Dans une longue introduction bibliographique, ses propriétés seront détaillées puis le matériel, les méthodes et les résultats de notre travail expérimental seront présentés et discutés.

***PARTIE I :***

***BIOLOGIE DE L'ABEILLE***



# CHAPITRE 1 : L'ABEILLE AU SEIN DU REGNE ANIMAL

## A. Classification et taxonomie

### a. Histoire de la classification

Comme tous les autres organismes, les abeilles sont classées selon un système taxonomique à plusieurs niveaux hiérarchiques. Cette classification est basée en grande partie sur la phylogénie, c'est-à-dire l'étude des relations de parenté entre êtres vivants. Dans cette thèse, nous nous concentrerons en grande partie sur l'abeille domestique, *Apis mellifera*. Son nom scientifique complet est *Apis mellifera* Linnaeus 1758. Cette appellation vient du fait qu'elle lui a été attribuée pour la première fois par Carl von Linné, un naturaliste suédois, en 1758 (Linné, 1758). D'autres appellations sont parfois utilisées pour la décrire (Engel, 1999), la plus répandue étant *Apis mellifica*, introduite par Linné lui-même, quelques années après. Les règles de la taxonomie imposant de ne garder que le premier nom apparu historiquement, *Apis mellifera* est donc la seule appellation valable.

En raison des pertes qu'elles subissent actuellement et de leur importance pour l'écosystème humain, les abeilles comptent à l'heure actuelle parmi les insectes les plus étudiés dans le monde. Elles forment un groupe de près de 16 000 espèces (Michener, 2000). Les abeilles sont donc bien loin de se résumer à notre seule abeille domestique. Leur classification n'échappe pas à de régulières mises à jour. Celle-ci est en perpétuelle évolution, parfois sujette à des batailles entre spécialistes. C'est en 1802 que 2 auteurs, un anglais, Kirby (Kirby, 1802) et un français, Latreille, (Latreille, 1802) proposent quasi-simultanément la toute première classification (Michez, 2007). Sous des appellations différentes, les abeilles sont dans les 2 cas déjà classées en 2 catégories : les abeilles à langue courte et les abeilles à langue longue (parmi lesquelles *Apis mellifera*). Au cours du 19<sup>ème</sup> siècle, de nouveaux genres sont décrits et les classifications évoluent sous l'impulsion des travaux de Schenk (Schenk, 1860) et Thomson (Thomson, 1872) notamment. C'est Charles D. Michener, brillant entomologiste américain, qui établit la première classification moderne des abeilles à l'occasion de sa thèse de doctorat (Michener, 1944). Dès lors, il consacra toute sa carrière aux abeilles et publia régulièrement, à mesure de ses découvertes, des mises à jour de sa classification (Michener 1981, 2000). La dernière en date eut lieu en 2007, année au cours de laquelle il publia une seconde édition de son œuvre majeure de près de 1000 pages : *The Bees of the World*.

La classification a fait l'objet de nombreuses études dans les années 2000 (Melo, 1999 ; Brothers, 1999 ; Michener, 2000 ; Engel, 2005 ; Melo et al., 2005 ; Michener, 2007). En 2005, Melo et Gonçalves (Melo et al., 2005) proposent une modification de la classification traditionnelle établie par Michener (Michener, 1944, reprise et modifiée par Michener, 2000), avec pour objectif de regrouper l'ensemble des abeilles au sein d'une seule et même famille : les *Apidae*. Ils partent du constat que les abeilles forment un groupe monophylétique (Alexander et Michener, 1995 ; Brothers, 1999; Melo, 1999), c'est-à-dire que, d'une part, l'ensemble des espèces contenues dans le groupe proviennent d'un seul ancêtre commun et que, d'autre part, tous les descendants de cet ancêtre commun sont dans le groupe. Or, la classification traditionnelle de Michener ne traduit pas cet aspect puisque les abeilles (regroupées sous le terme Apiformes) forment avec quelques familles de guêpes (les *Sphecidae* ; Engel, 2005), la superfamille des *Apoidea*. Pourtant, Michener lui-même liste dans son livre les caractères synapomorphiques (Michener, 2007) qui font de l'abeille un groupe monophylétique. Un caractère synapomorphique est un caractère dérivé commun à deux ou plusieurs taxons. Dans cette nouvelle classification, la famille des *Apidae* était désormais composée de 7 sous-familles formant 51 tribus, elles-mêmes réparties en 27 sous-tribus. En réalité, le principal changement par rapport à la classification traditionnelle (Michener, 2000) était la rétrogradation des autres familles que les *Apidae* au rang de sous-familles et des sous-familles autres que les *Apinae* au rang de tribus.

En 2007, Michener rétablit sa classification à l'occasion de la publication de son ouvrage, *The Bees of the World*. De même, Danforth (Danforth et al., 2006a) publie un an auparavant des travaux réalisés avec des outils moléculaires et prend la classification de Michener comme référence. Nous la considérerons donc comme telle. Dans celle-ci, les abeilles, formant le groupe des Apiformes, sont divisées en 7 familles (Michener, 2000) que l'on répartit toujours en 2 catégories : les abeilles à langue courte (contenant les familles *Colletidae*, *Stenotritidae*, *Andrenidae*, *Halictidae*, et *Melittidae*) et les abeilles à langue longue (contenant les familles *Megachilidae* et *Apidae*). Traditionnellement, les abeilles à langue courte, en particulier les *Colletidae*, étaient considérées comme les abeilles les plus primitives, donc celles à la base de l'arbre phylogénétique. Cette hiérarchie était établie à tort sur le postulat qu'une langue bifide était un caractère ancestral (Danforth et al., 2006a). Mais via l'analyse des séquences protéiques issues de 2 gènes nucléaires fortement conservés, Danforth (Danforth et al., 2006a) a montré que les abeilles les plus primitives étaient en fait les abeilles à langue longue (*Apidae*, *Megachilidae*) et les *Melittidae*, confirmant finalement l'une des hypothèses émise par Alexander (Alexander et Michener, 1995). Par ailleurs, cette découverte est en accord avec

l'abondance de fossiles d'individus issus de ces 3 familles plutôt que des 4 autres dans les sédiments les plus vieux (Michez, 2007 ; Engel, 2000 ; Michener et Grimaldi, 1988a, 1988b) ce qui jusqu'alors constituait une incohérence notable. D'autres auteurs avaient déjà remis en cause auparavant la « modernité » de l'abeille mellifère (Rozen Jr et McGinley, 1974 ; Michener et Greenberg, 1980 ; Michener, 1981 ; Radchenko et Pesenko, 1994 ; Alexander, 1992 ; Roig-Alsina et Michener, 1993).

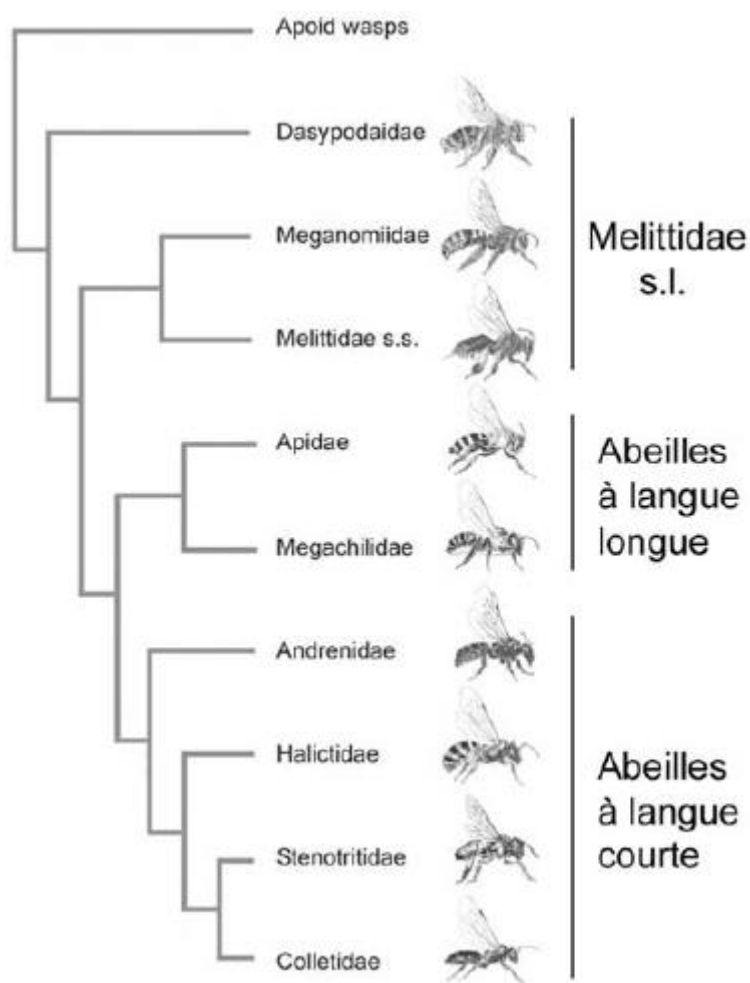


Figure 1 : Phylogénie de la super-famille *Apoidea* Apiformes basée sur la morphologie des adultes et le séquençage de 5 gènes (d'après Danforth et al. 2006b).

## b. L'ordre des Hyménoptères

La classification complète de l'espèce *Apis mellifera* est résumée par la figure 2 ci-dessous.

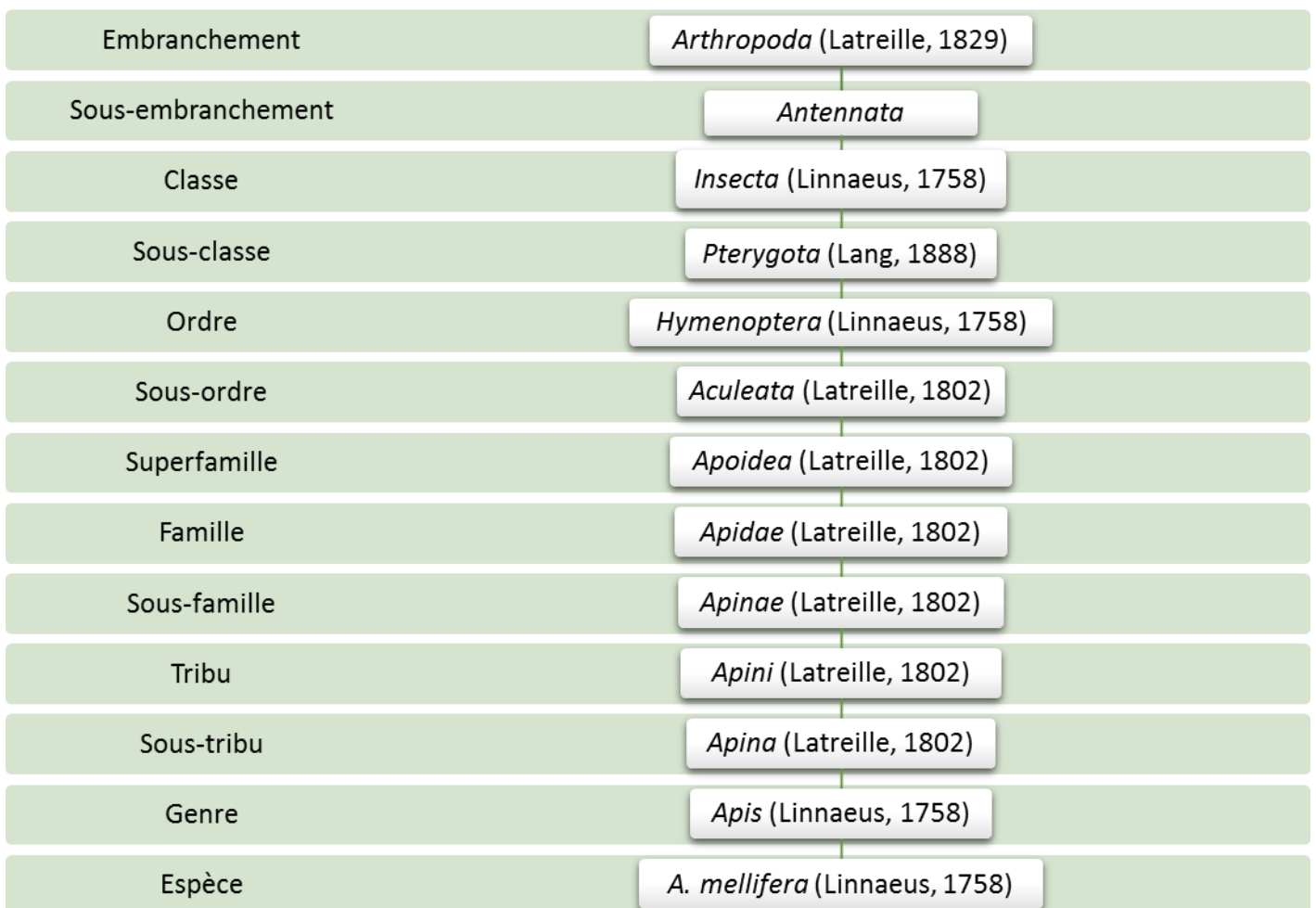


Figure 2 : Classification d'*Apis mellifera* (d'après Melo, 2005 et Michener, 2007)

Les clades supérieurs à l'ordre des Hyménoptères, dans la classification d'*Apis mellifera* sont les suivants :

- Règne animal
- Embranchement des Arthropodes
- Sous-embranchement des Antennates
- Classe des Insectes
- Sous-classe des Ptérygotes

Nous ne les détaillerons pas. Par contre, il convient de s'arrêter sur l'ordre des Hyménoptères. Celui-ci compte à ce jour près de 200 000 espèces. La caractéristique la plus visible de cet ordre est d'avoir deux paires d'ailes membraneuses. Outre les abeilles, les espèces les plus représentatives de cet ordre sont celles désignées communément par les termes guêpes, bourdons ou encore fourmis. En plus de leur différence de pilosité, les abeilles se distinguent nettement des guêpes par leur régime alimentaire. En effet, elles ne se nourrissent que de nectar et de pollen tandis que les guêpes chassent des proies (petits insectes) pour nourrir leurs larves carnivores et utilisent volontiers leurs puissantes mandibules pour déchirer des morceaux de viande ou des fruits.

L'ordre des Hyménoptères contient 2 sous-ordres qui sont les Symphytes et les Apocrites. Ces derniers sont caractérisés par un étranglement marqué entre l'abdomen et le thorax. Cet étranglement n'existe pas chez les Symphytes. On trouve chez les Apocrites 2 infra-ordres qui sont les Térébrants et les Aculéates (Brothers, 1999). Ces derniers sont des insectes dont les femelles possèdent à leur extrémité postérieure un oviscapte, encore appelé ovipositeur, structure qui comme son nom l'indique permet de déposer les œufs. Cet oviscapte peut, au besoin, se transformer en un appareil venimeux : le dard. On retrouve là 2 caractéristiques majeures des abeilles : la capacité de pondre au sein d'une alvéole et celle de se défendre par le biais de piqûres venimeuses. C'est au sein de l'infra-ordre des Aculéates que l'on trouve la super-famille des *Apoidea*.

### **c. La famille des *Apidae***

La super-famille des *Apoidea* (Melo, 1999) est formée de 2 groupes qui sont les Sphéciformes d'une part, caractérisés par une pilosité rare et un métatarse étroit, et les Apiformes, encore appelé *Anthophila*, d'autre part. Ces derniers ont une pilosité plus abondante et un métatarse élargi. Les 2 groupes ont pour caractéristique commune de se nourrir de nectar et de pollen. Ceci confère aux Apoïdes un rôle prépondérant dans la pollinisation. Les Apiformes contiennent, en plus des 6 autres familles déjà mentionnées plus haut, celle des *Apidae*.

Comme nous l'avons vu précédemment, cette famille contient, selon la classification choisie comme référence, soit toutes les abeilles (classification de Melo), soit une partie seulement des abeilles à langue longue (classification de Michener), l'autre partie étant la famille des *Megachilidae*. Au sens de Michener, les *Apidae* forment un groupe d'abeilles très diverses



parmi lesquelles se trouvent des abeilles sociales vivant en colonies mais aussi de nombreuses abeilles solitaires qui ne produisent pas de miel. On trouve même des espèces cleptoparasites, qui pondent leurs œufs dans le nid d'un hôte, et, une fois les œufs devenus larves, les nourrissent avec leurs propres réserves. Ce mode de parasitisme est très répandu chez les abeilles avec environ 5000 espèces qui le pratiquent (Duffield et al., 1990). Certaines Apidés vivent dans la terre, d'autres dans du bois mort ou encore dans des cavités naturelles. Il s'agit de la famille d'abeilles contenant le plus grand nombre de tribus. L'un des caractères spécifiques à cette famille est le nombre d'ovarioles par ovaires chez les femelles et le nombre de tubules par testicule chez le mâle. Ils sont au nombre de 3 dans les autres familles tandis qu'on en compte 4 chez les Apidés.

La famille des *Apidae* est constituée de 3 sous-familles qui sont les *Xylocopinae*, les *Nomadinae* et les *Apinae*. Cette dernière contient de nombreuses tribus dont *Meliponini*, *Bombini* et enfin *Apini*. Cette tribu contient les abeilles sociales (Michener, 2007) parfois appelées abeilles à miel « vraies ». Ces dernières vivent en colonie et se partagent les tâches, ce qui se traduit par une différence morphologique marquée entre la reine et les ouvrières et par le fait que la reine ne peut pas vivre seule. La reproduction des colonies se fait par l'essaimage. A l'inverse de la tribu des *Meliponini*, la nourriture des larves leur est fournie de manière progressive, ce qui implique que l'alvéole n'est pas operculée tout de suite (Michener, 2007). Les alvéoles sont de forme hexagonale, qu'elles soient destinées à recevoir du miel, du pollen ou des larves d'ouvrières. Les cellules de mâles sont plus larges tandis que les cellules de reine sont très différentes.

Le genre *Apis* est le seul genre issu de la sous-tribu des *Apina*, dérivée de la tribu des *Apini*.

#### **d. Le genre *Apis***

Quelle que soit la classification prise comme référence, la position d'*Apis mellifera* et du genre *Apis* est, dans tous les cas, inchangée (famille des *Apidae*, sous-famille des *Apinae*). Comme nous l'avons vu, il existe des milliers d'espèces d'abeilles. Mais en pratique, les espèces animales communément désignées par le grand public par le terme « abeilles » constituent seulement le genre *Apis*, soit une infime fraction (moins de 0,1%) des espèces existantes. Les abeilles de ce genre se caractérisent par leur capacité à produire du miel en quantité importante, d'où leur autre appellation d'abeilles « à miel ». Pour autant, il existe d'autres abeilles produisant du miel mais en quantité plus faible. Les membres du genre *Apis* ont également en commun de construire des nids dans des cavités.

On distingue 11 espèces au sein de ce genre (Michener, 2007), dont les suivantes :

- *Apis mellifera* : l'abeille domestique dont il sera question dans la suite de cette étude
- *Apis dorsata*

Il s'agit d'une abeille asiatique géante. Elle est assez agressive, si bien qu'elle n'a jamais été domestiquée. Elle a la particularité de ne former qu'un seul rayon vertical de taille imposante.



**Photographie 1 : Individu de l'espèce *Apis dorsata* (source : UniProt [en ligne]. Disponible sur : <http://www.uniprot.org/taxonomy/7462> (consulté le 28/04/2016)**

- *Apis florea*

A l'instar d'*Apis dorsata*, c'est une abeille asiatique. Mais par contre, elle est naine (3,3 mm de long). D'un caractère assez doux, elle produit du miel qui est récolté sous forme de cueillette. Par contre, elle est assez peu utilisée pour l'apiculture. Elle vit à de basses altitudes (< 500m) et là encore le nid ne comprend qu'un seul rayon construit sur une branche d'arbre. La partie supérieure du nid forme un plateau sur lequel les ouvrières réalisent leurs danses (Michener, 2007). Idem pour *Apis andreniformis*, une autre abeille du genre *Apis*.



**Photographie 2 : Individu de l'espèce *Apis florea* (source : UniProt [en ligne]. Disponible sur : <http://www.uniprot.org/taxonomy/7463> (consulté le 28/04/2016)**

➤ *Apis cerana*

C'est également une abeille asiatique. A l'inverse d'*A. dorsata* et *A. florea*, elle est utilisée pour l'apiculture. C'est d'ailleurs la seule avec *Apis mellifera* à avoir été domestiquée. De taille réduite (10 mm), elle ne présente toutefois pas d'aussi bonnes qualités pour l'élevage qu'*Apis mellifera*. Elle est relativement agressive, moins productive et ne recueille pas de propolis. Elle a tendance à construire ses rayons dans l'obscurité. Pour l'anecdote, elle est souvent prise en exemple pour sa capacité de lutte contre le Frelon asiatique. Soumise à sa présence depuis des milliers d'années, elle a développé une stratégie efficace. Cela consiste à l'entourer d'une masse compacte d'ouvrières qui, en vibrant des ailes, augmentent la température au sein de la boule jusqu'à ce que le frelon meure d'hyperthermie au bout de 5 minutes. Il se trouve en effet que le frelon ne peut pas supporter une température supérieure à 45°C, tandis que les abeilles sont capables de supporter plus de 50°C. Cette méthode est efficace mais il semble que lorsqu'elle répétée trop fréquemment, elle entraîne un affaiblissement de la ruche (Ken et al., 2005).



**Photographie 3 : Individu de l'espèce *Apis cerana* (source : UniProt [en ligne], Disponible sur : <http://www.uniprot.org/taxonomy/7461> (consulté le 28/04/2016))**

La distribution des abeilles du genre *Apis* est mondiale. Des analyses phylogénétiques (Alexander, 1991) ont établi qu'*Apis florea* était à la base du groupe, donc la plus ancestrale. La classification des sous-espèces d'*Apis mellifera* sera abordée dans la partie II.

## B. Occurrences historiques

### a. De l'origine des abeilles

#### i. Des fossiles datant du Crétacé

L'apparition des abeilles sur notre terre a eu lieu bien avant celle des Hommes. En effet, les hommes modernes, sous la forme *Homo sapiens* (seuls représentants actuels du genre Homo), seraient apparus il y a 100 000 à 200 000 ans, tandis qu'on estime la naissance des premières abeilles à la période du Crétacé (Grimaldi, 1999), soit il y a entre 145 et 66 millions d'années. Ces estimations sont basées sur l'étude de fossiles. Longtemps, le plus vieux d'entre eux fut une abeille à langue longue de la tribu des *Meliponini* (famille des *Apidae*). Il a été trouvé dans de l'ambre (résine fossilisée) du New Jersey dans les années 1920 mais l'insecte qu'il contenait n'a été analysé qu'à partir des années 1980 (Engel, 2000). Il a reçu le nom de *Cretotrigona prisca* (Michener et Grimaldi, 1988) et son âge a été estimé à environ 80 millions d'années. En 2006, *Cretotrigona prisca* a été détrôné par *Melittosphex burmensis* (Poinar et Danforth, 2006). Il s'agit d'un fossile trouvé dans une mine d'ambre du Nord de la Birmanie. Son âge a été estimé à environ 100 millions d'années. C'était un individu de sexe mâle mesurant 2,95 mm de long. L'analyse de sa morphologie indique qu'il appartenait à une famille d'insectes Apoïdes collecteurs de pollen ayant disparu de nos jours. En effet, il possède des organes arborant des ramifications de poils. Elle a également révélé la présence indéniable de caractères propres aux abeilles mais également de traits typiques des guêpes. Cette famille a ainsi été dénommée *Melittosphecidae* (fruit de la « fusion » entre *melittidae* et *sphécidae*). Ceci conforte l'hypothèse selon laquelle abeilles et guêpes auraient un ancêtre commun.

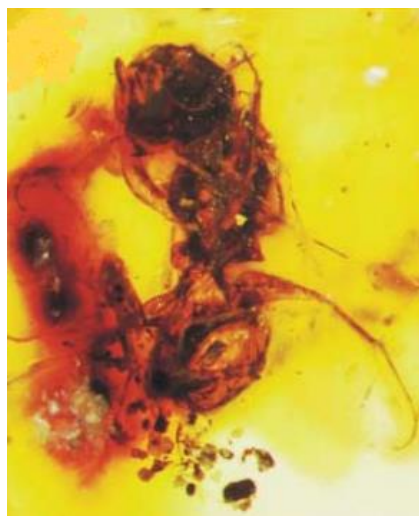


Figure 3 : Fossile de *Melittosphex burmensis* (source : Poinar et Danforth, 2006)

De nombreux fossiles de l'Eocène (de 56,0 à 33,9 millions d'années) ont été découverts dans de l'ambre de la Mer Baltique (Engel, 2001). Ils étaient issus de 36 espèces différentes classées dans 5 des 7 familles d'abeilles (Michener, 2007). Manquaient à l'appel des représentants des *Colletidae* et des *Andrenidae*. Des fossiles plus récents encore (Oligo-miocène, 25 millions d'années) trouvés en République Dominicaine (Michener et Poinar Jr, 1996) montrent cette fois des espèces des 7 familles d'abeilles.

## ii. *L'ancêtre des abeilles*

L'ancêtre des abeilles était probablement un insecte Africain (Michez, 2007). En effet, comme évoqué précédemment, la famille des *Melittidae* a remplacé celle des *Colletidae* à la base de l'arbre phylogénétique des abeilles (Danforth et al., 2006b). Jusqu'alors on croyait donc que l'ancêtre des abeilles était originaire soit d'Australie, soit d'Amérique du Sud, et qu'il était probablement généraliste (pollinisation d'un grand nombre de fleurs). Or, il se trouve que les *Melittidae* sont absentes d'Australie et d'Amérique du Sud, alors que le continent Africain est celui où leur diversité est maximale (Michener, 1979). Cela implique également que l'ancêtre des abeilles était probablement plus un spécialiste (pollinisation d'un petit nombre de fleurs) qu'un généraliste et que le caractère spécialiste est un trait ancestral.

D'après différentes études phylogénétiques, il semble que les abeilles proviennent, à l'instar des fourmis, de la spécialisation de guêpes prédatrices (famille des *Crabronidae*, super-famille des *Apoidea*) (Debevec et al., 2012) au cours du Crétacé (Grimaldi et Engel, 2005). A force de consommer des proies qui visitent les fleurs et se couvrent de pollen, ces guêpes auraient progressivement changé de régime alimentaire pour passer d'un comportement insectivore à végétarien. Ces premières abeilles ont probablement été d'abord solitaires et spécialistes, puis ont évolué vers des formes sociales et sont devenues des pollinisateurs généralistes. Néanmoins, reconstruire la transition entre les guêpes prédatrices et les abeilles consommatrices de pollen est difficile car, excepté *Melittosphex burmensis*, très peu de « formes » de transition ont été identifiées (Danforth et Poinar, 2011).

### *iii. La coévolution avec les Angiospermes*

Contrairement à ce que l'on pourrait penser, la création de diversité biologique, qui dépend de l'émergence de nouvelles espèces ou de la disparition d'espèces déjà présentes, ne suit pas un chemin linéaire. L'étude des fossiles en témoigne. Au contraire, des périodes de forte augmentation du nombre d'espèces (on parle d'explosions radiatives ou encore de radiation) et d'extinction massive, se sont succédées. Ces périodes couvrent plusieurs millions d'années. Les Angiospermes, qui sont les plantes à fleurs, ont subi une explosion radiative pendant le Crétacé supérieur (Bougeois et Gourbet, 2008). Celle-ci est régulièrement expliquée par le développement de la pollinisation par des insectes, en particulier par les abeilles (Pellmyr, 1992).

En effet, les abeilles que nous connaissons aujourd'hui se nourrissent de produits floraux (nectar, pollen). Or, il se trouve que la naissance des abeilles est concomitante de celle des fleurs Angiospermes, il y a approximativement 110 millions d'années (Grimaldi, 1999). Plus précisément, les Dicotylédones, lignée principale des angiospermes, seraient nées il y a 120 millions d'années, soit « seulement » 10 à 15 millions d'années avant les abeilles. Pendant le Crétacé, les angiospermes ont commencé à se développer et à se diversifier, grâce aux premiers pollinisateurs. Avant le Crétacé, les plantes les plus répandues étaient les gymnospermes (conifères), qui dépendaient du vent pour répandre leur pollen et leurs graines.

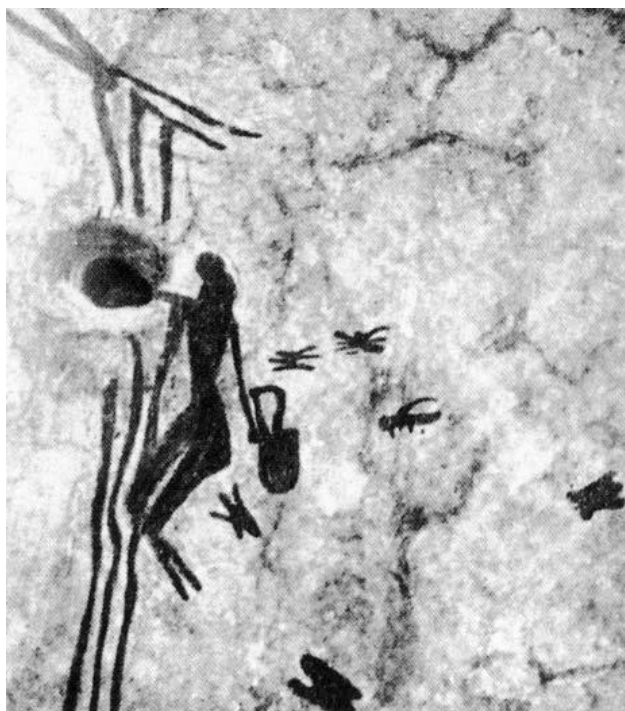
En réalité, il semble que les tous premiers angiospermes aient d'abord été pollinisés par des scarabées (Baker et Hurd, 1968). Par contre, les abeilles sont devenues abondantes dès les premières évolutions des fleurs angiospermes. Et vice-versa. Ainsi, les fleurs ont progressivement arboré de belles corolles colorées, émis du parfum attirant et offert du nectar en échange du transport du pollen nécessaire à leur fécondation. Les abeilles ont trouvé là une source de nourriture abondante, source qui s'est étendue à mesure qu'elles la consommaient. La relation entre les fleurs et les abeilles est dite mutualiste car les deux entités bénéficient de l'action de l'autre. Par ce biais, les Angiospermes ont colonisé toute la Terre et les pollinisateurs, dont les abeilles constituent le groupe le plus important (Schoonhoven et al., 1998), ont vu leur population exploser. Cette symbiose est telle que les abeilles ont développé des adaptations morphologiques et comportementales pour la collection et le transport du pollen (Thorp, 2000). On parle de co-évolution.

Les plus vieux fossiles d'angiospermes datent effectivement du Crétacé (Raven et Axelrod, 1974). Il est intéressant de noter que tous les fossiles de fleurs datant de cette époque sont de petite taille (Danforth et Poinar, 2011). D'après les descriptions de Crepet et al., (2004), une grande majorité des fleurs font entre 0,5 et 3 mm. Or, ces observations sont cohérentes avec la faible taille des insectes fossilisés datant de cette époque, en particulier celle de *Melittosphex burmensis*.

## **b. Représentations, symbolisme et littérature**

### *i. L'abeille de la Préhistoire à l'Antiquité*

Avant l'apparition du sucre raffiné tel qu'on le connaît, les hommes utilisaient le miel comme source de sucre. Une célèbre peinture rupestre espagnole datant de 5000 ans avant J.C (Paléolithique) en atteste (Engel et al., 2009). Elle se trouve dans la « Grotte de l'Araignée », à Bicorp, près de Valence. On peut voir sur celle-ci (voir figure 4) une figure humaine féminine en train de récolter du miel dans le creux d'une falaise. Autour d'elle des insectes volant représentent les abeilles. C'est d'ailleurs l'une des premières représentations d'insectes que l'on connaisse. Aucune représentation de ce type n'existe en France car à la même époque c'était un climat glaciaire qui sévissait.



**Figure 4 : Peinture néolithique rupestre de la Cueva de la Araña (Valence, Espagne ; -5000 av. J.-C.) représentant la “cueillette” du miel par une silhouette féminine (d'après Hernández-Pacheco y Esteban et al., 1929)**

D'autres traces encore plus anciennes de l'utilisation du miel ont été retrouvées dans le gisement néolithique (7000 av J.C.) de Çatal Höyük, situé en Anatolie, au sud de l'actuelle Turquie. Elles existent aussi bien sous forme graphique (représentation d'une ruche) que sous forme archéologique. En effet, des traces de cire d'abeille, mélangées à de la graisse animale ont été trouvées dans une poterie, laissant penser que l'usage du miel dans l'alimentation à cette époque était courant (Roffet-Salque et al., 2015). Rien ne permet néanmoins d'affirmer qu'ils pratiquaient déjà l'apiculture. Il s'agissait plus probablement de récolte dans des ruches sauvages.

Vers environ 2400 av. J.C, on trouve cette fois des traces de l'utilisation des produits de la ruche chez les Egyptiens (Dedekind, 1901). C'est notamment de cette époque que datent les premières représentations d'abeilles domestiquées (Hartmann, 1926 ; Kueny, 1950). Chez les Egyptiens, le miel était déjà utilisé comme médicament pour ses propriétés anti-bactériennes et anti-fongiques. Des explications sur son mode d'utilisation ont été trouvées dans de nombreux papyrus et sur des hiéroglyphes. Il était notamment utilisé comme onguent pour les blessures, les brûlures, les irritations de la peau et les peaux sèches. Il constituait également une offrande pour les dieux. On trouve parfois des représentations de l'abeille sur certaines tombes, par exemple celle de Pasaba (Porter et Moss, 1972), haut dignitaire ayant vécu vers - 650, sur laquelle est représenté le moment de la récolte (figure 5).



**Figure 5 : Représentation d'une scène d'apiculture sur la tombe de Pasaba (TT279) (source : antikforever [en ligne]. Disponible sur : [http://antikforever.com/Egypte/Tombes/el\\_assassif.htm](http://antikforever.com/Egypte/Tombes/el_assassif.htm) (consulté le 04/05/2016)**



Par ailleurs, le miel était souvent associé au mariage. Les Egyptiens avaient découvert comment fabriquer l'hydromel (boisson à base de miel) et il était de coutume pour les jeunes mariés d'en consommer durant le premier mois post-mariage afin d'apporter joie et bonheur à leur union. Cette tradition s'est transmise jusqu'au Moyen-Âge et aurait donné naissance à l'expression « lune de miel ». Enfin, ici encore, il servait d'agent sucrant pour la fabrication de pains et gâteaux. La cire, quant à elle, était utilisée pour la momification (Pettigrew, 1834) ou encore la construction de bateaux. A cette époque la domestication des abeilles était encore très rudimentaire. Les Egyptiens utilisaient simplement des poteries oblongues en argile voire des paniers d'osier tressés.

Ce qui vient d'être dit sur les Egyptiens est globalement vrai pour les Grecs et les Romains. Le miel entrait dans la composition de produits de beauté tandis que la cire permettait de créer des tablettes sur lesquelles il était possible d'écrire.

## *ii. Auteurs célèbres de l'Antiquité au Moyen Âge*

Le monde Grec et Latin, a contribué de manière importante aux connaissances sur l'abeille (Billiard, 1900). On trouve des références à l'abeille dans de nombreux textes de poètes et écrivains (Homère, Hésiode, Virgile...) dans lesquels elles donnent souvent lieu à des comparaisons anthromorphiques. Le philosophe grec Aristote (384-322 av. J.C.) est couramment cité comme l'un des premiers auteurs traitant d'apiculture. Effectivement, il fut le premier à décrire l'organisation d'une ruche dans *Histoire des animaux* (d'Aguilar, 2006) et ses observations furent longtemps une référence (Fraser, 1951). Ceci étant, Aristote fit quelques déductions fausses. Par exemple, il croyait que la reine était hermaphrodite ou encore que le miel prolongeait la vie.

Chez les Romains, c'est un savant nommé Varron (116-27 av. J.C.) qui a laissé la trace la plus importante. Il a écrit l'une des premières encyclopédies qui traite de l'abeille via son œuvre *De l'agriculture, livre III*. On y trouve de nombreux savoirs pertinents sur l'abeille en plus des savoirs repris d'Aristote.

C'est un peu plus tard que naquit Ambroise de Milan (340-397 ap. J.C.), connu sous le nom de Saint Ambroise, qui est encore aujourd'hui le patron des apiculteurs. Cet attribut découle d'une anecdote consignée dans sa biographie. Elle raconte qu'un jour où il dormait dans son berceau, un essaim d'abeille s'est posé sur sa tête et sur sa bouche avant de repartir en s'envolant très haut et en laissant un peu de miel sur son visage. Pour autant, et contrairement à ce que l'on pourrait croire, sa contribution à l'étude de l'abeille est parfaitement nulle. De manière générale, l'abeille fut de tout temps l'objet de nombreuses croyances, notamment religieuses (Ransome, 2004). D'autre part, de nombreuses caractéristiques des abeilles furent interprétées à la lumière des principes de la religion chrétienne. Ainsi on considère la mort d'une abeille ayant piqué un homme comme une punition divine et la reine est parfois une allégorie de Dieu.

Au début du Moyen-Âge, la société des abeilles est utilisée comme symbole de la société des hommes. Ainsi, la reine (qu'on prend alors encore pour un roi) représente les hommes puissants tels que le pape et les rois, tandis que les ouvrières représentent les serfs, au service de ces derniers. L'abeille est donc souvent un symbole royal et il n'est pas surprenant de la retrouver sur certaines armoiries de rois de France (Déonna, 1956). Des abeilles d'or et de verre ont ainsi été retrouvées dans la tombe de Childéric Ier (436-481 ap. J.C.) premier roi de la dynastie des Mérovingiens et père de Clovis. Ce type de métaphore était déjà utilisée dans l'Égypte ancienne (Lefébure, 1908).

L'intérêt pour l'abeille augmenta progressivement au Moyen-Âge, parallèlement au développement de la chrétienté. Notamment en rapport avec le besoin de cire pour la confection de bougies et de cierges.

### *iii. Des avancées majeures permises par le microscope*

Globalement, les savoirs en apiculture ont relativement peu progressé entre Aristote et le XVII<sup>ème</sup> siècle. Par contre, dès le XVII<sup>ème</sup> siècle, une importante découverte a révolutionné l'étude des abeilles et des insectes en général. Il s'agit de l'invention du microscope.

Elle va permettre à deux savants italiens, Federigo Cesi (1585-1630) et Francesco Stelluti (1577-1646) de publier, à l'attention du pape Urbain VIII un mémoire intitulé *Apiarium*, dans lequel sont décrites et dessinées toutes les espèces d'abeilles et de guêpes connues à cette époque (voir figure 6).



Figure 6 : Première figure d'*Apis mellifera* examinée sous microscope (d'après Frederigo Cesi, 1625, *Apiarium*).

Alors que Cesi et Stelluti ne s'étaient intéressés qu'à l'aspect extérieur de l'abeille, Jan Swammerdam (1637-1680), médecin et anatomiste néerlandais, s'est lui attaché à la description microscopique de l'anatomie interne de l'abeille (Swammerdam et al., 1738). Il s'intéressa particulièrement aux organes génitaux, et découvrit que seule la reine pondait.

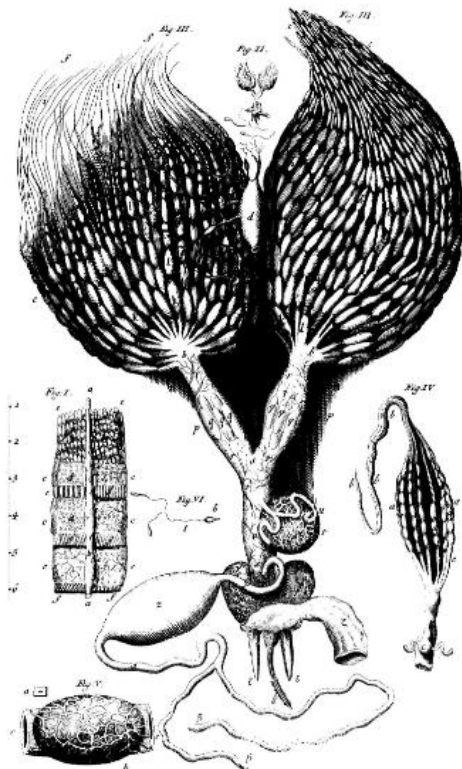


Figure 7 : Appareil génital de l'abeille femelle (d'après Swammerdam et al., 1738).

Le XVIIIème siècle fut pour la physiologie et le comportement de l'abeille ce que le XVIIème fut pour l'anatomie. Celui qui apporta la contribution la plus importante fut sans contexte René-Antoine Ferchault de Réaumur (1683-1757), physicien et naturaliste français (Torlais, 1958). Simultanément à ses travaux dans les domaines de la physique, de la métallurgie et de la technologie, il s'intéressa à l'histoire naturelle. C'est ainsi qu'il publie *Mémoires pour servir à l'Histoire des Insectes* (de Réaumur, 1740) dans lequel près de 500 pages sont dédiées aux abeilles. Ses observations ont été largement favorisées par une astucieuse idée : la construction d'une ruche vitrée, ce qui permet de voir ce qui se passe dans la ruche sans la déranger. C'est à lui que l'on doit, entre-autres, le terme faux-bourdon et la première description minutieuse des pièces buccales, caractéristiques de l'appareil broyeur-lécheur. Il étudia également le système de défense de l'abeille et notamment la glande à venin. Enfin, il revint à ses premiers amours de physique et démontra que le prisme hexagonal était la forme idéale permettant à l'abeille d'avoir un maximum de place pour le stockage avec le minimum de dépense en cire (cloisons). À peu près à la même époque, c'est un apiculteur autrichien, Anton Janscha (1734-1773), qui découvre le vol de fécondation de la reine à l'extérieur de la ruche.

À partir du XIXème siècle et jusqu'à aujourd'hui, les auteurs s'intéressant à l'apiculture sont très nombreux. On compte notamment des ecclésiastiques. Citons par exemple le prêtre Jan Dzierżon (1811-1906) qui découvrit la parthénogenèse, dont il sera largement question dans cette thèse. Ou encore les pasteurs Frédéric Bastian (1834-1893) et Ferdinand Gerstung (1860-1925), et le Frère Adam (Karl Kehrle, 1898-1996) créateur de l'abeille de race Buckfast, fréquemment utilisée de nos jours (Adam et al., 1987). Plus proche de nous, au 20<sup>ème</sup> siècle, on ne peut omettre de citer pour finir les travaux de Karl von Frisch, ethnologue allemand né en Autriche (1886-1982), qui a pratiquement consacré sa vie à l'étude du langage et des modes de communication des abeilles ainsi qu'à leur perception sensorielle. Ces recherches l'ont amené à découvrir la danse des abeilles ce qui lui valut, outre un prix Nobel de Médecine en 1973, une notoriété mondiale.

## **C. Rôles de l'abeille dans nos écosystèmes**

A l'heure d'internet et des satellites, à l'époque des réseaux sociaux et des autoroutes de la communication, nul n'est censé ignorer les rôles majeurs que jouent l'abeille pour la société des hommes, le déclin démographique qu'elle subit et les conséquences possibles de ce dernier. Dans un premier temps, nous rappellerons les services qu'elle nous rend, ce qui revient également à faire le point sur ce que nous pourrions perdre, notamment le service de pollinisation. Puis, nous nous intéresserons au déclin des abeilles et plus généralement aux déclin des pollinisateurs car les destins des différentes espèces pollinisatrices sont inextricablement liés. Ce déclin est multifactoriel et nous aborderons les causes principales dans un troisième temps. Il ne s'agit pas ici d'être exhaustif, car le sujet constituerait un sujet de thèse en soi, mais plutôt d'être concis et synthétique.

### **a. Le service de pollinisation**

#### *i. Mécanisme de la pollinisation*

Outre la fourniture en produits de la ruche qui régaler nos papilles ou entretiennent notre santé, l'abeille est surtout fondamentale pour l'Homme à travers le service de pollinisation qu'elle lui rend (Barth et al. 1985). Ce service concerne surtout les fleurs d'angiospermes qui constituent, avec un nombre d'espèces estimé à 250 000, le groupe le plus important et le plus varié (Soltis et al., 2005) en termes de morphologie ou de mode de reproduction.

En effet, lorsqu'une abeille visite une fleur pour récolter du nectar (base du miel), elle va se charger, à sa surface, en pollen, qui constitue le gamète mâle de la fleur angiosperme, issu des étamines. Lors du butinage d'une autre fleur de la même espèce, l'abeille va involontairement se frotter contre le stigmate, extrémité supérieure de la partie femelle de la fleur, ce qui va avoir pour effet le dépôt de multiples grains de pollen. Ainsi, elle permet la rencontre entre les gamètes de fleurs distantes de plusieurs mètres ou kilomètres, ce qui permet une reproduction sexuée, à l'origine de la formation des graines et des fruits qui sont à la base de nos régimes alimentaires et de ceux d'une partie des animaux que nous élevons. Cette forme de pollinisation est extrêmement efficace car une fois que les abeilles ont trouvé une espèce florale à butiner, elles ne visitent que ce type de fleur jusqu'à épuisement total de la ressource. Ceci permet de minimiser le temps qu'elles consacrent à la recherche alimentaire.

Cette forme de pollinisation est appelée pollinisation croisée ou encore « allopollinisation » car elle s'opère entre 2 fleurs issues de plantes différentes. Il existe des modalités alternatives de pollinisation pour certaines espèces : pollinisation par le vent (anémogamie) ou encore autopolinisation, mais ces dernières ne permettent qu'une pollinisation à courte distance susceptible d'entraîner de la consanguinité alors que la pollinisation par les insectes permet de conserver un brassage génétique source de diversité florale (Michener, 2007). Cette diversité permet d'éviter les dépressions de consanguinité et constitue une force de résistance aux perturbations environnementales et maladies d'où un risque d'extinction beaucoup plus faible.

Ce service de pollinisation ne s'arrête pas à nos cultures, il est à l'œuvre partout sur la planète, par exemple dans les forêts tropicales (Frankie et al., 1990) ou les aires désertiques (Michener, 2007).

Il faut tout de même noter que les abeilles, dont les abeilles sauvages, ne sont évidemment pas les seuls pollinisateurs. On trouve également les mouches, les scarabées, les phalènes, les papillons, les guêpes, les fourmis ou encore les oiseaux et les chauves-souris (Rader et al., 2016).

## *ii. Economie de la pollinisation*

Les chiffres varient selon les sources mais il est raisonnable d'affirmer que 70% des végétaux sont des plantes à fleurs et que 75% des cultures (essentiellement fruitières, légumières, oléagineuses et protéagineuses) destinées à l'alimentation humaine sont dépendantes des insectes pollinisateurs (Klein et al., 2007), dont l'abeille domestique est le principal représentant. Pour ces 75 %, le rendement de culture est directement proportionnel, via une relation linéaire, à la densité en pollinisateurs (Dedej et Delaplane, 2003 ; Clement et al., 2007). De plus, la surface destinée à des cultures pollinisées par des insectes a augmenté entre 1961 et 2006 (Aizen et al., 2009). Plus globalement, les hommes dépendent des insectes pollinisateurs pour un tiers de leur régime alimentaire (Ghazoul, 2005). On aurait pu s'attendre à un chiffre supérieur mais il existe une explication. En réalité ce chiffre est tiré vers le bas par le fait que les céréales comme le blé, le maïs et le riz, qui sont importantes en termes de volumes de production et de consommation, ne dépendent pas de la pollinisation par les insectes.

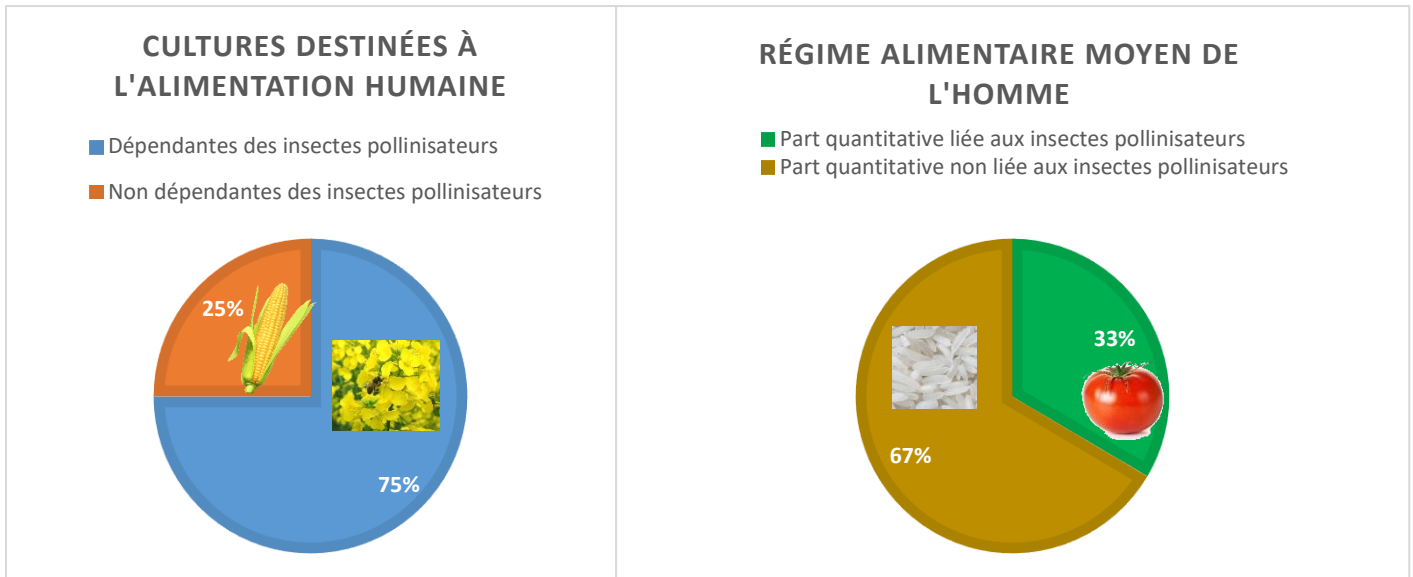


Figure 8 : Impact des pollinisateurs sur l'alimentation humaine

Des études réalisées sur des champs absolument vierges de pollinisateurs (Bartomeus et al., 2014) ont montré qu'en présence de ceux-ci les rendements étaient améliorés de 18 à 71 % selon l'espèce cultivée. La liste des plantes à fleur pollinisées par les abeilles comprend environ 170 000 espèces, et on estime que 40 000 se porteraient mal sans leur précieux travail (Gerster, 2012).

L'activité d'une abeille butineuse est colossale. Quelques chiffres valent parfois mieux que de longs discours. Il a par exemple été estimé que pour remplir son jabot de nectar en vue d'en faire du miel, une abeille doit visiter plus de 1000 fleurs. Si on tient compte du temps qu'elle met pour le remplir alors cela signifie qu'une abeille visite entre 600 et 900 fleurs en une heure (Toullec, 2008). Or, sur une heure et pour une colonie, entre 15 000 et 20 000 abeilles quittent la ruche pour aller butiner (Marceau et al, 1989). En somme, la totalité des vols des butineuses d'une colonie sur une journée représente plus d'un million de fleurs visitées. D'autre part, une abeille peut stocker jusqu'à 500 000 grains de pollen sur une seule de ses pattes postérieures, ce qui donne une idée de la quantité de fleurs qu'elle est susceptible de polliniser.

Le déclin actuel des pollinisateurs, des abeilles en particulier (voir ci-après) engendre régulièrement des évaluations économiques de leur apport et/ou de leur hypothétique disparition (Pimentel et al., 1997 ; Costanza et al., 2014 ; Fluri et Frick, 2005 ; Losey et Vaughan, 2006), et plus généralement du niveau de dépendance de nos ressources alimentaires aux pollinisateurs. Les résultats obtenus sont très variables (Winfree et al., 2011) notamment car il existe des méthodes différentes pour estimer le service de pollinisation. La première consiste à évaluer le coût de remplacement de la pollinisation gratuite si elle venait à disparaître,

par exemple en imaginant ce que coûterait une pollinisation manuelle ou la location d'abeilles domestiques dirigées par un apiculteur. La seconde s'applique à calculer la valeur économique des produits qui bénéficient de ce service de pollinisation, méthode dite de « la valeur produite ». Elle part du principe que si les pollinisateurs n'existaient plus, la production de denrées auxquelles ils contribuent n'existeraient plus non plus, à un certain degré.

Selon une étude franco-allemande réalisée en partie à l'INRA d'Avignon (Laboratoire de pollinisation et écologie des abeilles, INRA, Avignon) et suivant la seconde méthode, l'apport des insectes pollinisateurs aux principales cultures mondiales est évalué à 153 milliards d'euros (Gallai et al., 2009), soit environ 9,5 % de la valeur de la production alimentaire mondiale destinée aux humains. Ce chiffre est assimilable à la perte de valeur économique des cultures, via la baisse de rendement, dans l'hypothèse d'une disparition des pollinisateurs. Il est de 14,2 milliards d'euros à l'échelle de l'Union Européenne et supérieur à 50 milliards de dollars rien que pour les Etats-Unis (Chisel, 2015).

En détail, on compte notamment 50 milliards d'euros pour les fruits et les légumes, et 39 milliards pour les oléagineux. Globalement, ces 2 types d'aliments sont donc ceux qui auraient le plus à pâtir, en valeur absolue, de la perte des pollinisateurs. Il, faut toutefois noter que cette étude, comme les autres d'ailleurs, ne prend pas en compte la variation du prix des denrées à mesure qu'elles se raréfieraient.

Ces chiffres ne donnent donc qu'une vague idée de ce qu'il en coûterait au consommateur pour maintenir son mode alimentaire puisqu'ils ne prennent pas en compte l'inflation très importante qui résulterait de ce chamboulement (Hein, 2009). Par exemple, l'augmentation des prix des fruits et légumes due au manque de pollinisateurs pourrait, en dépit de leur intérêt majeur pour la santé, engendrer une tendance à la sous-consommation, particulièrement pour les groupes sociaux les plus pauvres.

Dans cette même étude, des coefficients de vulnérabilité ont été calculés pour une culture donnée à plusieurs échelles géographiques. Ces coefficients représentent le niveau de fragilité de la culture vis-à-vis de la disparition des insectes pollinisateurs. Ils sont issus d'une autre étude (Klein et al., 2007) et font l'hypothèse d'une disparition totale des insectes pollinisateurs. En raison de la variabilité des espèces cultivées et des différentes formes d'agriculture, la vulnérabilité à la perte des pollinisateurs pour une culture donnée varie selon les régions et les continents. En moyenne, ces coefficients sont particulièrement élevés en Asie, en Europe et en Amérique du Nord. Enfin, qualitativement, les denrées les plus à risques sont en moyenne le café et le cacao (Gallai et al., 2009).



### *iii. De l'intérêt de la biodiversité*

La tentation est forte de se rassurer en se disant qu'en cas de chute démographique des populations de nos abeilles domestiques, les autres pollinisateurs, dont les abeilles sauvages, sauront prendre le relai pour compenser cette perte. Il est établi que de nombreuses abeilles sauvages ont une importance en agriculture (O'Toole, 1993), en particulier pour les plantes que les abeilles domestiques n'ont pas la capacité de polliniser. Cette aptitude est en grande partie dépendante de la taille du proboscis (structure buccale) de l'espèce. En pratique, chaque type d'abeille a ses préférences (Kleijn et Raemakers, 2008), ce qui induit que les abeilles domestiques ne peuvent pas se substituer aux abeilles sauvages et vice-versa mais qu'au contraire elles sont complémentaires dans l'activité de pollinisation. Bien souvent, les abeilles domestiques dirigées par l'apiculteur viennent simplement s'ajouter aux pollinisateurs sauvages déjà présents (Garibaldi et al., 2013). Comme déjà évoqué, la spécialisation d'un type d'abeille à un type de fleur est tel que certaines abeilles présentent des adaptations morphologiques qui facilitent la récolte du nectar (Laroca et al., 1989).

En outre, les pollinisateurs autres que les abeilles, réalisent environ 40% des visites de fleurs. Bien qu'ils soient moins efficaces par fleur visitée, ils réalisent davantage de visites. Ainsi, leur rôle dans la pollinisation est estimé au moins équivalent à celui des abeilles (Rader et al., 2009, 2016) voire supérieur (Garibaldi et al., 2013). D'autre part, ils sont capables de polliniser des fleurs à des moments de la journée et par des temps où les abeilles en sont incapables (McCall et Primack, 1992). Enfin, il semble que les pollinisateurs autres que les abeilles répondent moins mal aux perturbations environnementales. Lorsqu'ils pollinisent les mêmes fleurs, ils constituent donc une solution provisoire pour stabiliser le rendement de la culture (Cariveau et al., 2013). Ils représentent ce que certains auteurs appellent une « assurance contre le déclin des abeilles » (Rader et al., 2016).

Malheureusement, la biodiversité, et les bénéfices qui en résultent pour les humains, décline de manière sans précédent (Butchart et al., 2010 ; Richards, 2001). Ce qui conduit au déclin des populations d'abeilles domestiques contribue donc aussi au déclin des espèces sauvages, les mêmes causes produisant les mêmes effets. Enfin, ajoutons que les espèces les plus menacées bénéficient finalement assez peu des mesures de conservation (Kleijn et al., 2006).

## **b. Autres services de l'abeille et des pollinisateurs**

### *i. L'abeille, sentinelle de l'environnement*

Une espèce sentinelle, ou sentinelle écologique, est une espèce dont la sensibilité sert d'indicateur précoce des changements de l'environnement d'un écosystème donné. Par son mode de vie et son rôle de pollinisateur, examinant chaque cm<sup>2</sup> de notre environnement, l'abeille est cette sentinelle, soumise en premier aux polluants de notre écosystème. À l'avant-garde des hommes, elle est en quelque sorte le thermomètre qui nous indique si notre planète se porte bien. Il ne semble pas déraisonnable d'affirmer qu'une planète où les abeilles disparaissent n'est probablement pas très accueillante envers un grand nombre d'autres espèces. Et ceci est valable pour l'homme.

Cela signifie aussi qu'en répertoriant les troubles affectant les colonies d'abeilles et en cherchant à en comprendre les raisons pour les contrer, on protège aussi l'humain et la santé publique.

### *ii. L'abeille dans la lutte contre le réchauffement climatique*

Si le déclin des pollinisateurs se poursuit, cela pourrait déclencher une cascade accentuant le réchauffement climatique. En effet, il n'y a pas que les fleurs herbacées qui bénéficient de la pollinisation, c'est également le cas des espèces ligneuses. Ainsi, la plupart des arbres ont besoin d'être pollinisés pour se reproduire. S'ils venaient à disparaître, la concentration en dioxyde de carbone dans l'atmosphère pourrait augmenter avec toutes les conséquences qu'on imagine. L'instabilité du sol et le recyclage des nutriments pourraient aussi être impactés (Abrol, 2012)

Par ailleurs, la présence d'une « biodiversité » d'abeilles est primordiale pour maintenir un niveau de pollinisation élevé malgré le réchauffement climatique (Bartomeus et al., 2013). En effet, celui-ci risque d'entraîner à court terme une modification importante des interactions fleurs-abeilles, par la disparition soit d'espèces de fleurs, soit d'espèces d'abeilles. D'où la nécessité d'avoir un milieu riche en espèces de « remplacement », potentiellement capables d'interagir avec les fleurs susmentionnées. Cette biodiversité se traduit par des abeilles de taille, de forme et de période d'activité différentes.

### *iii. Abeilles, plantes et animaux sauvages*

L'impact de la disparition des abeilles est presque toujours envisagé en rapport aux humains. C'est oublier les innombrables espèces qui en dépendent également, se nourrissant des tiges, des feuilles ou des fruits qu'elles libèrent. En effet, le déclin des pollinisateurs est susceptible d'engendrer un déclin des plantes sauvages car 80% d'entre elles (Potts et al., 2010a) sont directement dépendantes de leur travail. C'est particulièrement vrai pour les espèces qui nécessitent obligatoirement une pollinisation croisée (Aguilar et al., 2006). Bien qu'il y ait de nombreuses façons pour une plante de pallier à une faible pollinisation (par exemple l'auto-fécondation), elles ne peuvent compenser à long terme une diminution chronique de ce service (Bond, 1994). Dans une méta-analyse de 54 études portant sur 89 espèces de plantes sauvages, il s'avère que le paramètre le plus limitant pour la reproduction de ces plantes en milieu fragmenté est la pollinisation (Aguilar et al., 2006). Un milieu fragmenté est un habitat dont le morcellement d'origine anthropique est susceptible d'empêcher une espèce de se déplacer.

Même si cet hypothétique impact sur les autres espèces animales n'a jamais été quantifié, il y a fort à parier que de nombreuses espèces seraient aussi menacées de disparition si l'abeille venait à disparaître, d'où des écosystèmes très déséquilibrés.

## **D. Le déclin des abeilles**

### **a. Les abeilles domestiques**

#### *i. Un phénomène mondial*

Depuis une cinquantaine d'années, les populations d'abeilles domestiques décroissent un peu partout dans le monde (Decourtye, 2006), en particulier dans les pays industrialisés. Et cette chute démographique va en s'accéléralant depuis 20 ans. Aux Etats-Unis, dans certaines régions, jusqu'à 59% des colonies ont disparu entre 1947 et 2005 ( Natural Research Council, 2007 ; vanEngelsdorp et al., 2008). En Europe, dans certaines zones, c'est jusqu'à 25% des ruches qui ont succombé entre 1985 et 2005 (Potts et al., 2010a). On distingue plusieurs formes de mortalité. Il existe d'abord un taux de mortalité considéré comme normal qui correspond au trépas généralement hivernal des colonies les plus faibles. Ce taux de mortalité peut augmenter et devenir anormal. Les colonies peuvent être faibles pour un grand nombre de raisons, qu'elles soient naturelles ou non. Un été anormalement pluvieux ou un épisode de maladie peuvent par exemple suffire. Mais dans ce cas le dépeuplement est progressif, la mort prévisible et l'apiculteur retrouve généralement les cadavres des abeilles dans la ruche. Depuis peu, on observe une nouvelle forme de mortalité, plus grave et plus inquiétante. On parle de « syndrome d'effondrement des colonies d'abeilles » ou CCD (en anglais : Colony Collapse Disorder). Ce phénomène a d'abord été observé aux Etats-Unis dans les années 2000 puis il s'est avéré mondial (Benjamin et McCallum, 2009). Il se caractérise par une disparition soudaine et massive des abeilles d'un rucher (Oldroyd, 2007) sans observer de cadavres sur le fond de la ruche, ni de traces de maladies ou de parasites. Il ne reste alors que la reine, quelques ouvrières, un peu de couvain et de miel. Comme si les ouvrières avaient subitement disparu. Rien à voir donc avec les pertes « communes ». Parfois, les mortalités atteignent des seuils extravagants de 90 à 100% (Faucon et al., 2002 ; Faucon, 2006). Cette « épidémie » de mortalité a engendré de nombreuses polémiques, qu'elles soient scientifiques ou médiatiques. De nombreux travaux ont été réalisés et il existe aujourd'hui un consensus pour affirmer que le CCD est d'origine multifactorielle (Le Conte et Ellis, 2008). Pour de plus amples informations sur ce phénomène, la lecture du livre *L'étrange silence des Abeilles*, écrit par Vincent Tardieu (journaliste scientifique spécialisé en écologie), est conseillée (Tardieu, 2009).

Par ailleurs, la survenue de ce phénomène a conduit la communauté scientifique de l'abeille à se réunir au sein d'un réseau mondial appelée COLOSS ( pour « *prevention of honey bee COLony LOSSes* ») (Nguyen et al., 2010). Celui-ci regroupe 214 chercheurs et responsables du développement apicole de 54 pays et a pour but de coordonner au niveau international la lutte contre les pertes de colonies. L'existence de ce réseau de scientifiques experts dans leur domaine a conduit à des collaborations internationales résultant en 2013 en un manuel pratique de référence appelé BEEBOOK (Dietemann et al., 2013a, 2013b). Celui-ci est une compilation de méthodes standardisées faisant consensus pour chaque champ de recherche et d'expérimentation inhérent à l'abeille. Au-delà de l'harmonisation des procédures, ces publications constituent la plupart du temps des revues de qualité sur les thèmes abordés.

Il n'y a donc pas une mais plusieurs causes au déclin des abeilles (De la Rúa et al., 2009), et ces causes agissent souvent en interaction (Bauer et Wing, 2010). Citons par exemple l'utilisation de certains pesticides (Rortais et al., 2005 ; Kevan et al., 1997 ; Mullin et al., 2010 ; Johnson et al., 2010 ; Goulson et al., 2015 ; Doublet et al., 2015), la dégradation et la fragmentation des habitats (Goulson et al., 2008 ; Winfree et al., 2009 ; Steffan-Dewenter et al., 2002 ; Hendrickx et al., 2007), les agents infectieux et parasites (Cox-Foster et al., 2007 ; Neumann et Carreck, 2010 ; Stout et Morales, 2009 ; Thomson, 2006), l'absence de traitements ou l'utilisation de traitements inadaptés contre ces mêmes agents, le changement climatique (Dormann et al., 2008), la diminution de la biodiversité florale causant un stress alimentaire (Naug, 2009), la consanguinité (Zayed, 2009) et même le rayonnement électromagnétique (Ferrari et Tautz, 2015). Une partie de ces facteurs sera abordée plus loin (chapitre E). Notons qu'il est particulièrement difficile d'établir une hiérarchie entre ces mécanismes, mais que de manière générale, nombreux sont ceux qui résultent de près ou de loin de notre modèle agricole contemporain « productiviste ». Par ailleurs, malgré la prise de conscience croissante des interactions entre ces différents facteurs (Tylianakis et al., 2008), la plupart des études qui se sont portées sur le sujet ont analysé les effets de chaque cause isolément.

## ii. Mortalité des ruchers en Europe

Jusqu'à très récemment, les études s'intéressant à la chute démographique des abeilles étaient peu nombreuses ou mal documentées (Potts et al., 2010b). Les preuves du déclin des abeilles étaient plutôt apportées par des études sur la variation des communautés de pollinisateurs en fonction de l'intensification de l'agriculture et de la fragmentation de l'habitat dans une région donnée (Kremen et al., 2002 ; Larsen et al., 2005 ; Winfree et al., 2009). Des synthèses de ces études locales mettent en évidence une baisse de diversité et une diminution en valeur absolue des populations de pollinisateurs dès que l'agriculture s'intensifie et que l'habitat s'artificialise (Ricketts et al., 2008). Dans la mesure où la plupart des paysages naturels sont modifiés par l'homme dans ce sens, il est très probable que l'abondance en pollinisateurs et leur diversité, déclinent partout dans le monde (Potts et al., 2010b).

En ce qui concerne les populations d'abeilles domestiques, une vaste étude européenne donne des indications. Le projet « EPILOBEE » (Chauzat et al., 2014) a consisté en la surveillance épidémiologique de la mortalité des colonies d'abeilles domestiques en Europe sur la période 2012-2013 puis 2013-2014. En 2012, 31 832 colonies d'abeilles provenant de 3 284 ruchers ont été suivies. Il apparaît que les taux de mortalité sont très variables selon les pays et selon les saisons (Chauzat et al., 2014). Sur toute la période cumulée, c'est en Belgique que les mortalités furent les plus fortes (42,5%), suivi du Royaume-Uni (38,5 %) et de la Suède (31,1 %). Pendant la saison apicole (qui va du printemps à l'automne), les taux de mortalité sont plus faibles (de 0.3% à 13.6%) que pendant l'hiver (de 3.5% à 33.6%).

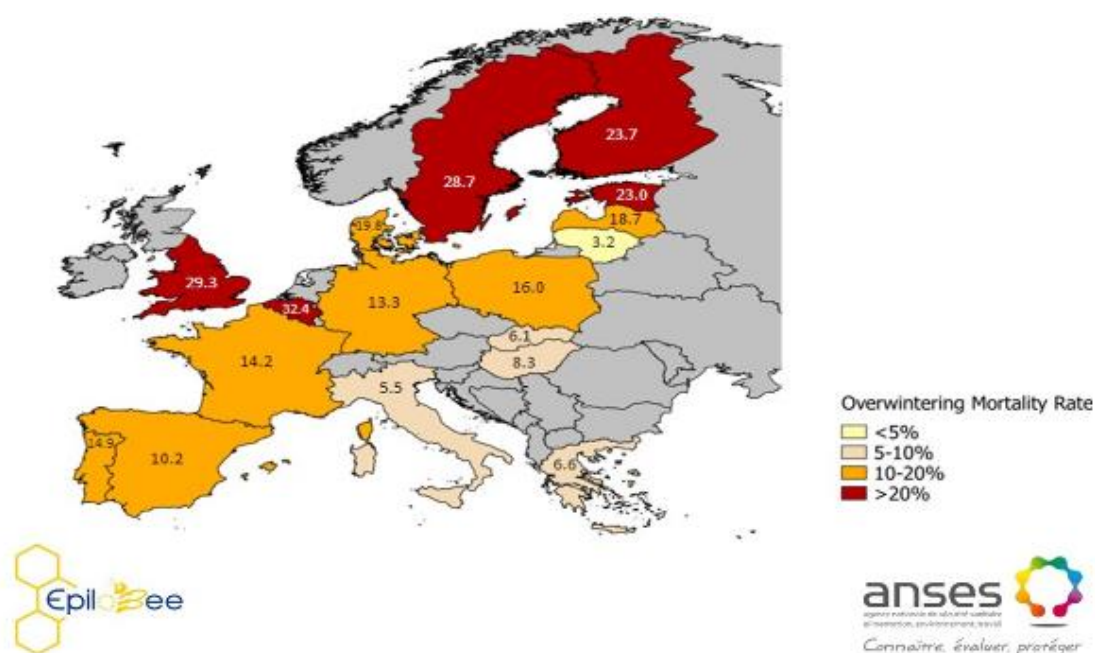
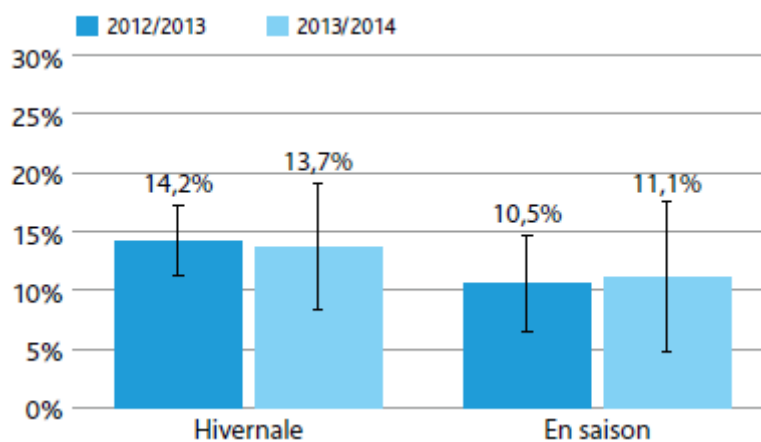


Figure 9 : Mortalités hivernales des colonies d'abeilles collectées par le programme EPILOBEE 2012-2013

Une déclinaison de ce programme européen a été réalisée en France sur la période 2012-2014, elle a été dénommée « Résabeilles ». Ainsi, 300 ruchers ont été suivis au cours de trois visites annuelles (automne, printemps, été) réalisées sur 2 campagnes successives, soit 6 visites en tout. En moyenne, la mortalité hivernale était de 14 % alors qu'on estime le taux de pertes hivernales normal à environ 10% (Chauzat et al., 2014). La mortalité en saison apicole était de 11 % (Hendrikx et al., 2015) et la mortalité annuelle moyenne de 23%. Au niveau européen, la France se situe dans la tranche moyenne, c'est-à-dire qu'elle ne présente ni les mortalités les plus fortes, ni les plus faibles.



**Figure 10:** Taux de mortalité hivernale et en saison apicole (avec intervalles de confiance à 95 %) des colonies d'abeilles au cours de deux campagnes du programme Résabeilles (d'après Hendrikx et al., 2015).

Aux Etats-Unis, la découverte du syndrome d'effondrement des colonies en 2006-2007 a engendré la mise en place d'une étude annuelle sur les mortalités des colonies d'abeilles domestiques. Pour la période 2014-2015, le taux de mortalité moyen pour les apiculteurs participant à l'étude était de 40,6 % ! (Seitz et al., 2016).

### *iii. Des motifs d'espoir ?*

Dans cette morosité, existe-t-il des motifs d'espoirs pour l'abeille et pour les hommes ?

S'il se poursuit, ce déclin sera probablement hétérogène au sein des différentes régions de la planète (Gallai et al., 2009). Et ceci à cause de facteurs divers : variabilité dans la gestion des paysages et cultures, abondance en abeilles sauvages et « biodiversité » en abeilles domestiques.

Alors que la plupart des espèces d'abeilles déclinent en valeur absolue avec l'extension de l'agriculture intensive, il semble paradoxalement que les espèces les plus impliquées dans la pollinisation se maintiennent (Kleijn et al., 2015). En outre, certains scénarios inattendus peuvent se produire. Par exemple, l'importation d'abeilles Africaines en Amérique du Sud a conduit paradoxalement à une densité en abeilles plus importante (Roubik et Wolda, 2001), se traduisant par de meilleurs rendements pour la production de café (Roubik, 2002). Enfin, contrairement à ce qu'il se passe en Europe et aux Etats-Unis, il semble que la population d'abeilles domestiques a considérablement augmenté en Chine sur la période 1961-2008 (Goulson et al., 2015).

D'autre part, la prise de conscience du rôle joué par les activités humaines dans le déclin des abeilles et de l'impact qu'il pourrait avoir sur notre santé et notre alimentation est chaque jour plus importante (Carvalho et al., 2013). Elle se traduit, depuis la fin des années 90, par des politiques publiques de plus en plus concernées et offensives en vue de la préservation de la biodiversité (Kleijn et Sutherland, 2003). Et ces politiques engendrent des résultats, certes minimes mais encourageants, qui incitent à les poursuivre et les amplifier. Il apparaît par exemple que la diminution de la diversité en pollinisateurs ralentit ou stagne selon les endroits voire s'inverse partiellement, pour certaines espèces dans certaines régions de Grande-Bretagne et des Pays-Bas (Carvalho et al., 2013).



## **b. Quid des abeilles sauvages ?**

Les abeilles sauvages sont un composant essentiel des écosystèmes. Elles fournissent un service de pollinisation essentiel, tant pour les plantes sauvages (Kearns et al., 1998) que pour les cultures (Klein et al., 2007). Dans certains cas, les abeilles sauvages sont suffisantes pour polliniser une culture (Kremen et al., 2002).

Globalement, elles font l'objet de très peu d'études par rapport aux abeilles domestiques (Potts et al., 2010b) car évaluer leur déclin est un vrai défi technique pour les raisons que l'on imagine. En effet, personne ne tient de registre des populations d'abeilles sauvages et d'ailleurs, si l'on voulait s'y atteler, encore faudrait-il les reconnaître. Car les abeilles sauvages sont la plupart du temps solitaires, très petites, très nombreuses et très différentes phénotypiquement, si bien que les différencier nécessite un vrai savoir d'entomologiste chevronné. Il n'existerait ainsi que 50 experts de la sorte dans le monde (Arbuckle et al., 2001). Par contre, les études de biodiversité qui s'intéressent aux pollinisateurs en général vont toutes dans le même sens : l'abondance et la diversité en pollinisateurs diminuent (Biesmeijer et al., 2006 ; Kraus et Page, 1995 ; Moritz et al., 2007 ; Jaffe et al., 2010 ; Potts et al., 2010).

Des travaux récents (Rader et al., 2013) ont estimé qu'en cas de poursuite du réchauffement climatique au rythme actuel, le service de pollinisation fourni par les abeilles domestiques dirigées par l'apiculteur allait diminuer de 14,5 % tandis que celui dont sont responsables les abeilles sauvages augmenterait paradoxalement de 4,5%. Cette étude nous donne 2 informations pertinentes : d'une part elle montre qu'au sein de l'ensemble multifactoriel de facteurs concourant au déclin des abeilles domestiques se trouve le réchauffement climatique, et que par conséquent lutter contre le réchauffement climatique contribue à lutter contre le déclin des abeilles et d'autre part, cela renforce le rôle que pourrait avoir à jouer les abeilles sauvages et l'attention dont elles doivent faire l'objet aussi bien dans les programmes de recherche que dans les décisions politiques. Plus généralement, cela encourage à maintenir une biodiversité importante, car le fait de conserver un assemblage d'espèces capables de réaliser la pollinisation permet d'espérer qu'une espèce puisse pallier à la disparition d'une autre si cela devait arriver.

## **E. Revue des menaces actuelles pour l'abeille**

Dans ce paragraphe, nous allons décrire de façon détaillée certaines des causes responsables du déclin des abeilles évoquées plus haut.

### **a. Maladies et parasites**

Les agents biologiques les plus couramment impliqués dans les mortalités de colonies d'abeilles sont des parasites (*Varroa destructor*, *Acarapis woodi*, *Tropilaelaps clerae*, *Nosema apis* et *Nosema ceranae*), des bactéries (loques américaine et européenne) et des virus (virus de la paralysie aiguë, virus des ailes déformées, virus de la paralysie chronique, etc.) (Cox-Foster et al., 2007). Tous ces agents agissent parfois en synergie (Doublet et al., 2015). De manière générale, une colonie affaiblie par un agent à plus de risques de développer une autre maladie.

Les apiculteurs se retrouvent bien souvent sans solution pour diagnostiquer ou traiter ces maladies. À ce jour, le secteur vétérinaire est trop peu impliqué dans l'encadrement sanitaire des ruchers. Les praticiens sont la plupart du temps, ni disponibles, ni compétents, ni intéressés pour soigner cet animal atypique. D'ailleurs, ce type d'enseignements reste très limité au sein des ENV.

Intéressons-nous brièvement aux plus fréquents et/ou plus graves d'entre eux.

#### ***i. La loque américaine (Paenibacillus larvae)***

Il s'agit d'une bactérie, *Paenibacillus larvae* (Heyndrickx et al., 1996), plus précisément de sa spore, à l'origine de la contamination des colonies d'abeilles (Genersch et al., 2006). Lorsque la maladie est présente, on parle de loque américaine (Genersch, 2006). Elle se traduit par une atteinte des larves operculées uniquement. Visuellement, le couvain (ensemble des larves) a un aspect de bouillie gluante brunâtre et malodorante. Cette texture rend plus difficile le nettoyage de l'alvéole par les ouvrières.



**Photographie 4 : « Bouillie » larvaire symptomatique de la loque américaine (source : Fédération d'apiculture du Canton du Jura [en ligne]. Disponible sur : <http://www.facj.ch/presentation/sante-de-l-abeille> (consulté le 06/06/2016))**

Les spores contaminent la nourriture des larves puis germent dans leur intestin ce qui engendre la mort de la larve (Woodrow, 1942). Les larves mortes, en se desséchant, forment des écailles adhérentes aux parois des alvéoles. La loque américaine entraîne toujours la mort de la colonie (Hansen et Brødsgaard, 1995) car elle se propage très vite à toutes les larves, via le travail et le va-et-vient des ouvrières. Bien que *Paenibacillus larvae* soit sensible à certains antibiotiques, ces derniers n'ont aucun effet sur les spores (Genersch et Otten, 2003). Il est donc illusoire et de toute façon non souhaitable de sauver la colonie.

En effet, la loque américaine peut se transmettre à d'autres colonies du rucher, ce qui est très destructeur pour l'apiculteur (Lindström, 2008). En effet, en cas de carence alimentaire, les butineuses des colonies alentours sont susceptibles de venir piller leur voisine, et elles réussiront d'autant plus facilement que celle-ci sera affaiblie par la maladie. Malheureusement, elles ressortiront de la ruche avec des spores sur elles et engendreront la contamination de leur propre colonie.

En outre, les spores peuvent vivre jusqu'à 35 ans dans le milieu naturel (Haseman, 1961) et elles résistent à de nombreux désinfectants usuels. Par conséquent, la perte des colonies s'accompagne généralement de la destruction par le feu du matériel contaminé (Poppinga et Genersch, 2015). Ainsi, la somme des colonies perdues et du matériel détruit fait de la loque américaine une maladie extrêmement coûteuse pour l'apiculteur (Morrissey et al., 2015).

Il existe au moins 4 génotypes différents de la bactérie qui se distinguent nettement par leur virulence. Récemment, un protocole d'identification du génotype via la technique MALDI-TOF a été développé (Schäfer et al., 2014).

En dépit de son nom, la loque américaine est présente sur tous les continents (Hansen et Brødsgaard, 1999), y compris en France où elle est classée comme danger sanitaire de première catégorie et à déclaration obligatoire. Sa prévalence dans le rucher français est passée de 12 % au cours de l'automne 2012 à moins de 1 % au cours de l'été 2014 (Hendrikx et al., 2015). Cette forte baisse s'explique surtout par les efforts d'assainissement de la maladie réalisés par les apiculteurs impliqués dans le programme « Résabeilles » à partir duquel ces chiffres ont été calculés. A l'inverse, ces résultats mettent clairement en évidence une très forte sous-déclaration dans le cadre de la surveillance événementielle à l'échelon national (Bendali et al., 2014).

### ii. *La loque européenne (Melissococcus plutonius)*

La loque européenne (Bailey, 1983) est également une maladie du couvain, causée par une bactérie : *Melissococcus plutonius*. Elle présente d'autres similitudes avec la loque américaine : même mode d'infection des larves, même mode de propagation, la couleur brunâtre des larves mortes (Bailey, 1961) et une forte odeur de pourriture. Sa distribution est également mondiale (Forsgren, 2010) à l'exception notable de la Nouvelle-Zélande (Ellis et Munn, 2005).



**Photographie 5 : Couvain atteint de loque européenne, photographie de Preben Kristiansen (d'après Forsgren, 2010)**

Par contre, à l'inverse de la loque américaine, la loque européenne s'attaque non pas au couvain operculé mais exclusivement au couvain non operculé, donc ayant moins de 5 jours (Forsgren, 2010). Les individus infectés peuvent parfois survivre, ils seront simplement sous-développés à la naissance à cause de leur mauvaise alimentation. Par ailleurs, il a été montré (McKee et al., 2004) qu'il existait une forte corrélation entre la mortalité des larves et la dose de *M. plutonius*. Lorsqu'elles meurent, les larves ne deviennent pas visqueuses et forment des écailles non adhérentes aux parois de l'alvéole.

Dans la nature, la bactérie ne se multiplie que dans le tube digestif des larves. Par conséquent, la transmission et la persistance du pathogène dans la colonie dépendent essentiellement de la survie des individus infectés (Forsgren, 2010). Ces derniers excrètent de la bactérie via leurs fèces qui perdurent au sein de l'alvéole où se passe leur métamorphose. La bactérie est capable de survivre à de longues périodes de dessiccation (Bailey, 1959). Ici aussi, la maladie peut se transmettre entre ruches (Belloy et al., 2007), en particulier si la densité du rucher est importante. La bactérie a été retrouvée dans le miel (McKee et al., 2003) ce qui suppose que le pillage est une source de contamination pour les colonies voisines.

Pour le diagnostic, une PCR en temps réel a été récemment développée (Roetschi et al., 2008). Elle peut par exemple être réalisée sur un mélange de larves issues de plusieurs ruches. En ce qui concerne le traitement, il peut être réalisé avec des antibiotiques, et notamment l'oxytétracycline, auquel *M. plutonius* est sensible (Thompson et Brown, 2001). On préférera cependant la destruction par le feu pour les colonies les plus atteintes (Wilkins et al., 2007).

La loque européenne est une maladie moins grave que la loque américaine. Sa prévalence dans le rucher français est passée de 7,5 % au cours de l'automne 2012 à moins de 2 % au cours de l'été 2014 (Hendrikx et al., 2015).

### **iii. *Le varroa (Varroa destructor)***

*Varroa destructor* est un acarien, originaire du sud-est de l'Asie, et initialement parasite d'*Apis cerana* (Sammataro et al., 2000). Il existe chez cet acarien un dimorphisme sexuel marqué entre la forme mâle et la forme femelle (Ifantidis, 1983), et seules les formes femelles sont retrouvées hors des alvéoles, car elles seules présentent des adaptations morphologiques pour se fixer aux abeilles (De Ruijter et Kaas, 1983). Il est arrivé en Europe assez récemment, au gré des importations d'*Apis cerana*. Alors qu'il est peu nocif pour elle, il est très délétère pour *Apis mellifera* (Potts et al., 2010b) et constitue l'une des causes les plus importantes de mortalités

des abeilles (Rosenkranz et al., 2010). A plus forte raison car une relation hôte-parasite stable ne s'est pas encore établie et car les apiculteurs restent encore peu familiers de ce parasite, d'où une gestion globalement mauvaise. Désormais, *V. destructor* s'est établi dans le monde entier, sauf en Australie (Rosenkranz et al., 2010). L'Île d'Ouessant est également indemne.

La varroase est une maladie grave. Toutes les formes d'abeilles sont touchées : larves, nymphes et adultes. Sur les adultes, le parasite s'insinue entre les tergites, perce la paroi et se nourrit de l'hémolymphe, milieu intérieur de l'abeille. Cette dernière peut mourir de troubles nerveux. On peut parfois observer des parasites à l'œil nu sur le thorax et l'abdomen.



**Photographie 6 : Femelle de *Varroa destructor* sur le thorax d'un faux-bourdon et sur une larve (source : FAO [en ligne]. Disponible sur : <http://teca.fao.org/fr/read/8712> (consulté le 06/06/2016))**

Les larves sont aussi soumises au varroa car la femelle varroa pond dans le couvain juste avant operculation. Elles arrivent parfois à survivre mais présentent des malformations (des ailes notamment) ou des dysfonctionnements (poids faible). Dans tous les cas, l'affaiblissement de la colonie est marqué, au point que sauver la ruche est souvent illusoire.

La varroase se répand très rapidement au sein d'une colonie. Elle peut également s'étendre aux autres colonies du rucher, par le pillage, par le biais des faux-bourdons ou encore par les manipulations de l'apiculteur.

Il existe néanmoins des traitements, notamment à base d'amitraz (Apivar®). Ces traitements sont également efficaces la plupart du temps contre *Acarapis woodi*, un autre parasite de l'abeille. Ainsi, ce parasite est de moins en moins fréquent depuis la recrudescence du varroa. Le traitement doit être fait en fin d'automne, en absence de couvain, pour être sûr de n'avoir que des varroas adultes. Si l'apiculteur n'en réalise aucun, il prend le risque de perdre jusqu'à

50% de son rucher (Benjamin et McCallum, 2009). Certains de ces traitements sont de moins en moins efficaces à cause de résistances. En outre, les produits à base de coumaphos sont déconseillés car ils réduisent fortement (Bevk et al., 2012) le transfert de nourriture des ouvrières vers les larves (trophallaxie). En complément des mesures chimiques, il existe de nombreux moyens complémentaires de lutte biologique (Houle 2004), citons par exemple le piégeage des varroas par du couvain mâle ou des phéromones de synthèse, l'utilisation du thymol (huile essentielle), la thermothérapie ou encore l'utilisation de virus et champignons pathogènes pour le varroa.

*Varroa destructor* est également considéré comme un vecteur important du virus de la paralysie aiguë (Acute Bee Paralysis Virus). On considère qu'il transmet le virus dans 50 à 80% des cas (Chen et Siede, 2007). De manière générale, il semble qu'il agisse sur le système immunitaire engendrant un affaiblissement, ce qui laisse alors la voie libre pour les autres agents pathogènes (McMullan et Brown, 2009 ; Le Conte et al., 2010)

Le programme « Résabeilles » conduit en France sur la période 2012-2014 a donné lieu à des observations cliniques et des prélèvements qui ont montré la présence d'une infestation par le varroa et la présence de signes cliniques de varroase dans un quart à un tiers des ruchers français à l'automne (Hendrikx et al., 2015). Ces chiffres donnent une idée du problème que représente le varroa pour les apiculteurs français.

Cependant, il semble que certaines lignées d'abeilles survivent malgré l'absence de traitement (Le Conte et Navajas, 2008 ; Spivak et Le Conte, 2010) et ceci grâce à une résistance naturelle. Des travaux sont réalisés pour réussir à sélectionner cette résistance et éventuellement la répandre dans le cheptel français via un programme de sélection, il en sera question dans la partie II.

Par ailleurs, les abeilles sauvages semblent avoir été particulièrement impactées par l'arrivée en Europe du parasite *Varroa destructor* (Kraus et Page, 1995 ; Moritz et al., 2007 ; Jaffe et al., 2010). Ce dernier est ainsi considéré comme l'une des causes majeures de la baisse de biodiversité en abeilles sauvages.

Récemment, une étude a montré que *Varroa destructor* a la capacité d'imiter au sein de sa cuticule la composition chimique de la cuticule de son hôte et qu'il est aussi capable de changer cette composition en fonction de l'espèce qu'il parasite (Le Conte et al., 2015). Cette faculté d'adaptation remarquable est susceptible d'expliquer comment ce parasite de l'abeille asiatique a pu coloniser l'abeille domestique.

## b. Le frelon asiatique

Le frelon asiatique, *Vespa velutina nigrithorax*, est un hyménoptère apparu en Europe et plus particulièrement en France en 2004 (Rortais et al., 2010), près d'Agen. Il semblerait qu'il ait profité du transport de poteries chinoises (Arca, 2012) vers le vieux Continent pour s'introduire clandestinement. Comme son nom l'indique, il est originaire d'Asie (Roy et al., 2011). Néanmoins, le climat tempéré régnant dans nos pays et sa capacité d'adaptation lui ont permis de s'établir durablement et de prospérer. Chaque année, la ligne de frontière qui marque la zone où on le trouve de celle où il est absent s'étend vers le Nord et le Sud. Ainsi, il se trouve désormais en Espagne (López et al., 2011), au Portugal (Grosso-Silva et Maia, 2012), en Italie (Demichelis et al., 2013) et même en Belgique (Bruneau, 2011). Son invasion engendre de sérieux problèmes pour l'abeille domestique *Apis mellifera* (Monceau et al., 2014).



Photographie 7 : Le Frelon asiatique (source : UNAF – Union Nationale de l'Apiculture Française [en ligne]. Disponible sur : [http://www.unaf-apiculture.info/IMG/pdf/dossier\\_presse\\_unaf\\_frelon\\_asiatique.pdf](http://www.unaf-apiculture.info/IMG/pdf/dossier_presse_unaf_frelon_asiatique.pdf) (consulté le 11/09/2016))

Le frelon asiatique est une espèce sociale, vivant en colonie dans un nid dont la taille varie en fonction du nombre d'individus, qui peut aller jusqu'à 13 000 (Rome et al., 2015). Les mécanismes de communication, notamment olfactifs, qui rendent l'eusocialité possible, ont d'ailleurs été récemment étudiés chez le frelon (Couto et al., 2016). La colonie n'a qu'une durée de vie d'un an, il s'agit d'une société dite « annuelle ». L'hiver arrivant, la colonie produit des mâles et des futures reines en grande quantité. Ces jeunes reines quittent le nid pour hiverner dans un endroit propice, comme par exemple dans le sol (Vetter et Visscher, 1997), tandis que le reste du nid périclité (Monceau et al., 2014). Au printemps suivant, chaque reine fondera un nouveau nid (Arca, 2012). Particulièrement en été et en automne, le frelon s'attaque aux abeilles, qui constituent l'une de ses sources de protéines (Monceau et al., 2013) et le tiers de son régime alimentaire. Il se positionne ainsi en vol stationnaire devant une ruche et essaie d'attraper les butineuses revenant à la ruche, alourdies par leurs charges en nectar et en pollen.



Une fois qu'il en tient une, le frelon dissèque l'abeille et ne garde que la tête et le thorax pour donner à ses larves. Il exerce 2 effets néfastes principaux sur la colonie. D'une part, la préemption répétée de butineuses par des frelons sur la même ruche diminue le stock de butineuses, ce qui peut engendrer un déséquilibre dans l'apport de ressources à la ruche et notamment aux larves. D'autre part, sa présence devant la planche d'envol dissuade de nombreuses butineuses de s'aventurer à l'extérieur. Par conséquent, les fréquences de sortie et de rentrée dans la ruche diminuent et l'activité globale de la colonie baisse. Il n'existe malheureusement pas encore d'études pluri-annuelles pour évaluer son impact. Mais, de manière empirique, certains apiculteurs professionnels en Aquitaine estiment avoir perdu 30 à 50 % de leur cheptel (Monceau et al., 2014).

Globalement, les produits sucrés de la ruche les intéressent moins et ils ne s'aventureront dans une ruche que si la colonie qui l'occupe est morte ou très affaiblie (Chauzat, 2009 ; Abrol, 2006).

Aujourd'hui, il apparaît illusoire de vouloir l'éradiquer étant donné sa zone d'expansion. Il faut davantage envisager de cohabiter avec lui (Rortais et al., 2010 ; Villemant et al., 2006) et de limiter ses effets. Par exemple, via le piégeage (Blot, 2007). Celui-ci consiste à fournir aux reines fondatrices des sources sucrées lorsque ces dernières sortent d'hivernage. La capture d'une fondatrice revient à éviter la formation d'un nid et donc la naissance de centaines de frelons. Il faut toutefois veiller à positionner correctement les pièges et à utiliser des appâts sélectifs. En effet, le piégeage a aussi un impact très négatif sur la biodiversité non ciblée, comme par exemple les frelons européens mais aussi les abeilles en premier lieu (Rome et al., 2011) Des pièges existent dans le commerce, comme par exemple celui de l'entreprise Véto-Pharma®.



**Photographie 8 : Piège pour frelons asiatiques de l'entreprise Véto-Pharma® (source : Véto-Pharma® [en ligne]. Disponible sur [http://www.veto-pharma.fr/wp-content/uploads/2015/02/flyer-piegeage\\_avril-2014-basse-def.pdf](http://www.veto-pharma.fr/wp-content/uploads/2015/02/flyer-piegeage_avril-2014-basse-def.pdf) (consulté le 11/09/2016))**

Étant arrivé brutalement sur le sol français et n'ayant pu établir une relation hôte-parasite stable, il est possible qu'il souffre plus que les autres de parasites endémiques (Prenter et al., 2004), par exemple le virus IAPV (Blanchard et al., 2008). Le frelon asiatique est classé danger sanitaire de catégorie 2 en France depuis 2013 et « Espèce exotique invasive » par l'Union Européenne depuis juin 2016.

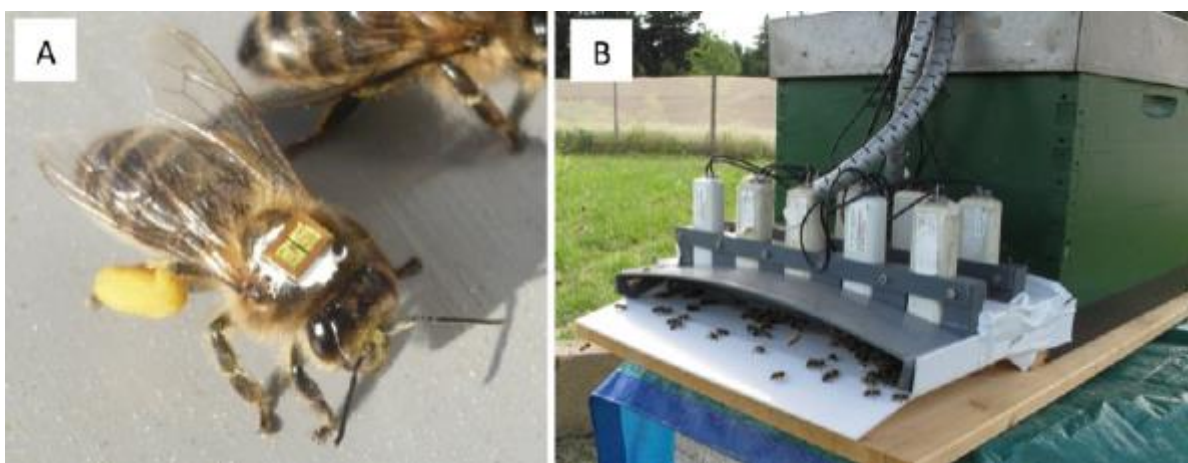
### **c. Effets des pesticides**

Les grandes cultures céréalières fournissent une source de nourriture non négligeable pour les abeilles qui y sont adaptées. Or, pour lutter contre les ravageurs qui dégradent leurs cultures et les rendements, les cultivateurs céréaliers utilisent des pesticides (insecticides, fongicides, herbicides, etc.) (Henry et al., 2012). Ces derniers sont utilisés soit de manière curative pour éliminer des ravageurs déjà présents, soit de manière préventive pour s'assurer de ne pas être envahi. Parfois, ces insecticides sont présents à la surface des graines semées sous forme d'enrobage, voire parfois produits par la plante elle-même dans le nectar et le pollen, lorsque la plante est génétiquement modifiée. Plus de 161 pesticides différents ont ainsi été trouvés dans des colonies d'abeilles (Sanchez-Bayo et Goka, 2014). De manière générale, la lutte chimique est souvent privilégiée, au détriment de formes biologiques plus respectueuses de l'environnement et des Hommes.

Ces pesticides agissent sur le système nerveux des insectes cibles par contact, inhalation ou ingestion et entraînent une paralysie puis la mort (Colin et al., 2004). Malheureusement, sans être ciblées, les abeilles qui fournissent pourtant un travail de pollinisation intéressant pour le cultivateur, s'intoxiquent de la même manière. L'une des familles les plus couramment citée comme nocive pour les abeilles est celle des néonicotinoïdes (Pisa et al., 2015). On évoque souvent le Gaucho® (imidaclopride) (Decourtye et al., 2004) ou encore le Cruiser® (thiaméthoxame) (Maienfisch et al., 2001). Cette famille a la particularité d'avoir un mode d'action systémique, ce qui signifie que le principe actif est distribué à l'intégralité de la plante de par sa solubilité, notamment dans le pollen et le nectar (Rortais et al., 2005). Toutefois, les autres familles de pesticides provoquent également des effets sur les abeilles (Tomizawa et Casida, 2005 ; Desneux et al., 2007) et agissent parfois en synergie (Goulson et al., 2015).

L'intoxication peut prendre plusieurs formes. Il y a la forme aiguë, qui entraîne une mortalité brutale des butineuses dans les heures qui suivent le survol du champ. L'intoxication est particulièrement marquée lorsque le survol du champ a lieu moins de 30 minutes après l'épandage (Koch et Weisser, 1997). Elle est maximale si les abeilles sont sur les fleurs au moment de l'épandage. Cette forme est assez évocatrice et ne laisse que peu de doutes quant à la cause de la mortalité.

Il y ensuite la forme chronique, qui entraîne une mort plus lente et insidieuse, parfois plusieurs jours après que l'abeille a été soumise aux pesticides. On observe chez les abeilles un changement de comportement, elles ont l'air désorientées, tremblent et peinent à voler à cause d'un manque de coordination (Desneux et al., 2007). Souvent, l'abeille ne revient même pas à la ruche, de sorte que la mortalité n'est pas diagnostiquée par l'apiculteur (Decourtye et al., 2004). Une étude française de l'INRA (Henry et al., 2012) a utilisé des micropuces (Decourtye et al., 2011) qu'ils ont disposé sur les abeilles d'une ruche pour réaliser un comptage des entrées et des sorties. En soumettant ces abeilles à des pesticides en conditions naturelles, ils ont découvert que l'orientation des abeilles était perturbée, de telle sorte que 10 % à 31 % des abeilles ayant ingéré cette molécule, même à de très faibles doses, étaient incapables de rejoindre leur ruche.



**Figure 11 : A. Abeille équipée d'une puce RFID sur son thorax ; B. Entrée d'une ruche équipée d'un dispositif de lecture des puces RFID (d'après Henry et al., 2012).**

En outre, les abeilles sont susceptibles d'intoxiquer toute la colonie si les produits qu'elles ramènent sont contaminés (Krupke et al., 2012), dans la mesure où les larves sont dix fois plus sensibles que les abeilles adultes (Villa et al., 2000). En cas d'intoxication chronique, l'apiculteur se trouve démuné pour expliquer les mortalités de ses ruches, et même s'il suspecte des traitements sur les champs alentour, il lui est bien difficile de le démontrer.

Les pesticides n'engendrent pas que de la mortalité mais ont également des effets toxiques sublétaux qui se traduisent par des troubles de croissance ou de reproduction selon les individus concernés, un moindre développement des glandes hypopharyngiennes (Aupinel et al., 2011) ainsi qu'une récolte de réserves altérée (Yang et al., 2008 ; Colin et al., 2004 ; Schneider et al., 2012). Notons que tous les effets observés sur l'abeille domestique le sont également chez les bourdons (Whitehorn et al., 2012).

Les intoxications des abeilles aux pesticides engendrent régulièrement des conflits entre cultivateurs et apiculteurs. C'est particulièrement regrettable dans la mesure où les 2 professions sont complémentaires et trouveraient des intérêts mutuels à travailler main dans la main. L'apiculteur profite de la ressource alimentaire que constituent les champs du céréalier tandis que le céréalier profite des abeilles de l'apiculteur pour augmenter son rendement. Ces conflits sont d'autant moins compréhensibles que l'agriculteur serait la profession la plus durement touchée par la disparition du service de pollinisation. En effet, si ce scénario devenait réalité, leur activité ne serait plus rentable ce qui les obligerait à investir lourdement dans la pollinisation manuelle ou plus certainement à se réorienter vers une plante ne nécessitant pas de pollinisation. Or, une culture pollinisée rapporte en moyenne cinq fois plus qu'une culture ne nécessitant pas ce service (Hein, 2009). Néanmoins, les relations entre ces deux familles professionnelles s'améliorent et un marché se met progressivement en place pour permettre aux cultivateurs de louer les abeilles d'un apiculteur, aussi bien en Europe (Carreck et al., 1997) qu'aux Etats-Unis (Sumner et Boriss, 2006) .

#### **d. Les monocultures**

En France et ailleurs dans le monde, l'intensification de l'agriculture a conduit à une spécialisation de certaines régions (par exemple la Beauce ou le Lauragais) en région céréalière, donnant lieu à de grandes plaines de cultures composées d'une seule ou d'un très petit nombre de variétés de plantes (blé, colza, tournesol...), a *fortiori* car l'utilisation additionnelle de pesticides se charge d'éliminer les plantes sauvages résiduelles (Johnson et al., 2010). Et au sein même d'une espèce donnée, la diversité variétale s'est considérablement amenuisée. Pour le blé par exemple, 10 variétés seulement représentaient en 2015 plus de 50% des surfaces cultivées pour cette céréale. En conséquence, les nombreuses espèces d'abeilles inadaptées à ladite variété se retrouvent toutes dépendantes d'une ressource très faible, composée des quelques haies résiduelles et vergers environnants. A long terme, de nombreuses espèces disparaissent et ne restent alors que les quelques espèces adaptées à ces monocultures (Michener, 2007).

Par ailleurs, les abeilles ont besoin d'un apport en pollen varié pour leur régime alimentaire, en particulier pour le développement de leur système immunitaire (Alaux et al., 2010). Or, le pollen ne peut être varié que si la ressource florale l'est, ce qui n'est pas le cas dans les monocultures. L'une des conséquences possibles de ce déséquilibre est la carence en certains acides aminés essentiels (Brodschneider et Crailsheim, 2010) et la baisse de résistance envers certaines maladies, comme la nosérose (Johnson et al., 2010).

Lorsqu'on s'y intéresse de plus près, les espèces d'abeilles préférant les plantes qui ne sont pas des cultures montrent des populations en décroissance (Bartomeus et Winfree, 2013 ; Scheper et al., 2014). Ceci confirme que de nombreuses espèces sont incapables d'utiliser des ressources qui paraissent pourtant abondantes.

En guise de synthèse, il a été montré que l'abondance d'abeilles et leur diversité était maximale dans des champs d'espèces diversifiées, cultivés dans le cadre d'une agriculture biologique et au sein de paysages avec des habitats variés (Kennedy et al., 2013 ; Nettleton, 2016). Finalement ce résultat sonne comme une évidence.

# **CHAPITRE 2 : MORPHO-ANATOMIE DE L'ABEILLE**

Au sens strict, la morphologie est l'étude de la forme extérieure de l'être vivant tandis que l'anatomie concerne la structure interne. Dans les paragraphes suivants nous exposerons anatomie et morphologie sans distinction. Toutefois, il n'est bien sûr pas question d'être exhaustif sur l'anatomie de l'abeille mais plutôt de mettre en lumière les éléments remarquables, c'est-à-dire ceux qui jouent un rôle majeur dans son comportement et son mode de vie. Nous verrons dans un premier temps les caractères communs aux différentes castes d'abeilles puis nous étudierons quelques caractères variables. La plupart des éléments présentés s'appuient sur les éminents travaux de Robert Evans Snodgrass (1875-1962) qui constituent toujours, à l'heure actuelle, une référence (Snodgrass, 1984).

## **A. Anatomie générale d'une abeille ouvrière**

### **a. Caractères généraux**

Comme tous les insectes, l'abeille présente des caractéristiques particulières que nous allons résumer ci-après. Son développement complet passe par 3 étapes successives que sont la larve, la pupa et enfin l'adulte (Page et Peng, 2001). Dans cette étude, nous nous attarderons uniquement sur la description de l'abeille au stade adulte.

L'abeille possède tout d'abord un exosquelette (Dade et al., 2009) qui recouvre la totalité de son corps et qui est surmonté de poils. Il est composé d'une cuticule (Hadley, 1982) au sein de laquelle on trouve des éléments rigides tels que la chitine (polymère glucidique) (Nemtsev et al., 2004) ou la sclérotine (protéine) (Wigglesworth, 1985). Cet exosquelette se décompose en plusieurs plaques rigides, les sclérites, qui sont reliées entre elles par des membranes fines et souples qui autorisent une grande liberté de mouvements. Les sclérites sur la face dorsale de l'insecte prennent le nom de tergites tandis que celles sur la face ventrale sont appelées sternites. Cette carapace est renouvelée plusieurs fois au cours de la vie de l'insecte lors des phases de mues, la vieille cuticule prenant alors le nom d'exuvie.

Le corps d'un insecte est composé de 3 segments principaux (Goodman et al., 2003) qui sont, de l'avant vers l'arrière : la tête, le thorax et l'abdomen. La classe des Insectes faisant partie du sous-embranchement des Antennates, les abeilles possèdent une paire d'antennes ainsi qu'une paire de mandibules, et, conformément au nom d'hexapode qui est parfois donné aux insectes, les abeilles possèdent 6 pattes articulées réparties en 3 paires, toutes fixées sur le thorax. Enfin, les abeilles possèdent 2 paires d'ailes insérées sur les deuxième et troisième segments thoraciques. La première paire, les ailes antérieures, sont encore appelées « élytres » tandis que la seconde, les ailes postérieures, sont appelées « ailes de vol ». Les systèmes circulatoire et respiratoire de l'abeille sont identiques à celui des autres insectes. Ainsi, le corps de l'abeille est rempli d'hémolymphe, sorte de milieu intérieur ouvert jouant à la fois le rôle du sang et de la lymphe, et contenant de l'eau, des sucres (Francis et al., 1989), des protéines, des minéraux et des enzymes. Cette dernière est animée par le mouvement de ventricules et de muscles. Par ailleurs, l'hémolymphe s'insinue dans les veines alaires ce qui leur donne une certaine rigidité (Arnold, 1964). Quant au système respiratoire, il réalise les échanges gazeux grâce à un réseau anastomosé de sacs aériens et de trachées qui se ramifient jusqu'aux cellules. Les trachées oxygènent le système nerveux et les muscles alaires : elles ont donc un rôle essentiel. Elles sont soutenues par un renfort spiralé de chitine appelé ténidie. L'entrée est constituée par un stigmate régulant l'ouverture ou la fermeture. A l'arrière des stigmates se trouve la chambre stigmatique qui peut être fermée par un sphincter. Cet atrium contient des poils chitineux qui sont souples les premiers jours de vie puis se durcissent progressivement pour former un filtre protecteur.

## **b. La tête**

La tête, de forme ovoïde, est essentiellement composée des organes sensitifs (yeux, ocelles, antennes), des pièces buccales, des glandes associés et du cerveau.

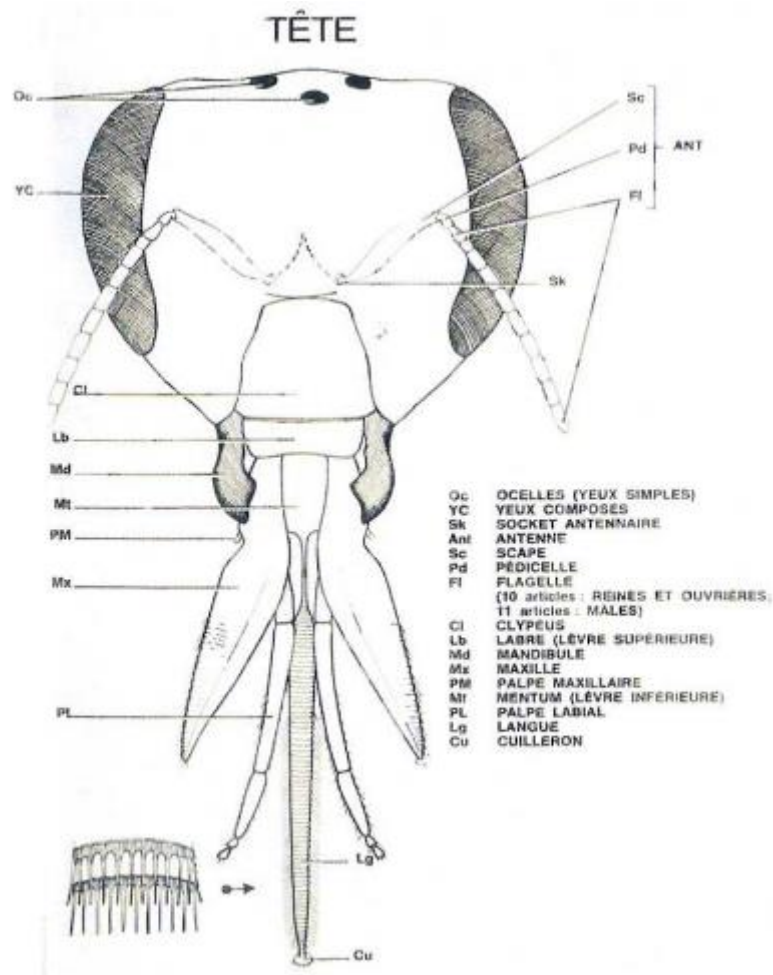


Figure 12 : La tête de l'abeille (d'après Gilles Adam, Ecole d'Apiculture du Sud Luxembourg).

### *i. Organes sensitifs : les yeux*

Les abeilles possèdent 2 yeux composés à facette sur les côtés de la tête et 3 yeux simples ou ocelles formant un triangle sur le haut de la tête.

Les yeux composés sont latéraux, bombés et de couleur noire. Ils sont constitués de nombreuses facettes de formes hexagonales que l'on appelle des ommatidies. On en compte entre 4000 et 8000 par œil (Perrelet, 1970). Chacune de ces ommatidies agit comme un récepteur visuel indépendant et la somme des informations de chaque facette permet, après réunion au sein du nerf optique, la reconstitution d'une image. Ces yeux procurent à l'abeille une très bonne vision à longue distance, à 360° et dans un spectre qui va du vert à l'ultraviolet (Backhaus, 1993) en passant par le bleu et le violet (entre 300 et 500 nm). Par contre, les abeilles ne voient pas le rouge. Une fleur rouge apparaîtra ainsi noire pour l'abeille (Clément et Chesnais, 2009 ; Tautz, 2008). D'autre part, ces yeux permettent à l'abeille d'orienter son vol par rapport au soleil car ils sont sensibles à la lumière polarisée (Gribakin, 1969).



Les yeux simples ou ocelles sont des petites lentilles situées sur le « front » de l'abeille. Ils ne permettent en aucun cas de former une image mais agissent comme des récepteurs de la lumière et de l'obscurité (Schrick, 1965). Ces différences de clarté que perçoit l'abeille lui permettent d'orienter son vol et de changer de direction au besoin. C'est notamment grâce aux ocelles que les butineuses se rendent compte qu'il se fait tard et qu'il est temps de rentrer à la ruche avant la nuit (Schrick, 1965).

## ii. *Organes sensitifs : les antennes*

Les antennes sont au nombre de 2 (Snodgrass, 1984). Elles constituent des organes primordiaux dans la perception de l'environnement extérieur. Elles sont constituées de 3 articles principaux qui sont, de la base vers la périphérie : le scape, le pédicelle puis le flagelle.

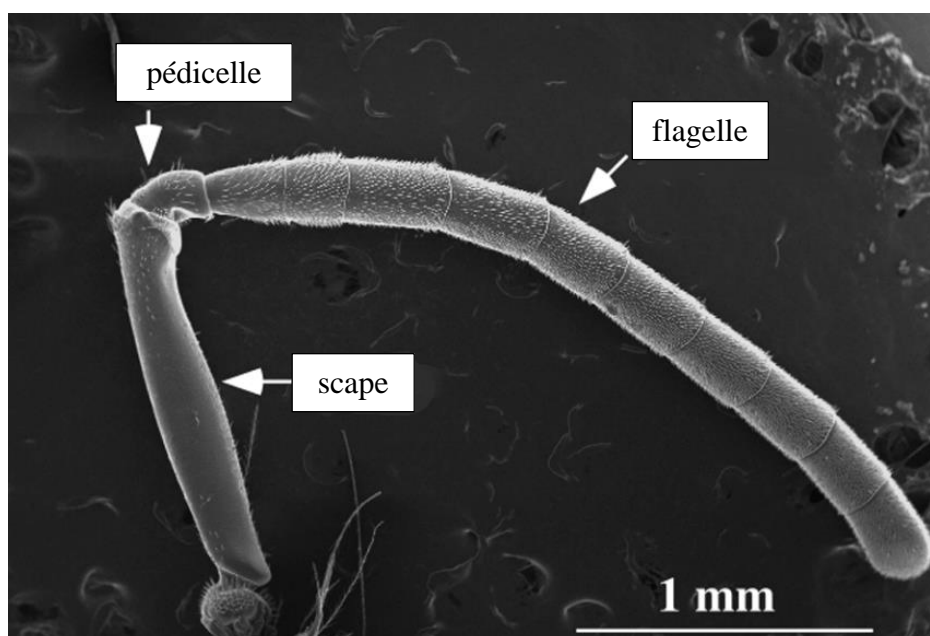


Figure 13 : Structure de l'antenne d'une abeille ouvrière en microscopie électronique (d'après Tsujiuchi et al., 2007)

Le flagelle est lui-même constitué de 10 articles chez la reine et l'ouvrière et de 11 articles chez le faux-bourdon (Snodgrass, 1984). Ces antennes portent des milliers de récepteurs différents appelés sensilles qui leur confèrent un rôle prépondérant (Slifer et Sekhon, 1961). Outre la capacité à percevoir la température, le CO<sub>2</sub> (Lacher, 1964), l'hygrométrie (Yokohari et al., 1982), les sons (Kirchner et al., 1991) ou encore les vibrations de l'air, c'est également par les antennes que les abeilles communiquent. En effet, les antennes sont les agents du goût et de l'odorat (Galizia et Menzel, 2001).

Elles permettent à l'abeille de détecter odeurs et phéromones. Lorsque 2 abeilles se touchent mutuellement les antennes, elles partagent en réalité des substances chimiques et se transmettent le parfum d'une fleur ou d'un miel. C'est aussi par l'odeur de ses antennes qu'une butineuse sera reconnue comme faisant partie ou non d'une ruche par les gardiennes de la colonie (Signorotti et al., 2015).

En outre, l'antenne est, avec les poils, l'organe principal du toucher. C'est en quelque sorte la main de l'abeille. C'est grâce aux antennes que l'abeille perçoit son environnement physique, qu'elles palpent et touchent les structures qui l'entourent, par exemple les alvéoles. Par exemple il a été récemment montré que le comportement hygiénique de défense contre le varroa (VSH) dépendait en grande partie du transcriptome au niveau des antennes (Mondet et al., 2015). Ce support génétique pourrait permettre de sélectionner cette résistance.

Enfin, les antennes sont également le principal organe de l'ouïe grâce à des sensilles dites « campaniformes » qui permettent à l'abeille de détecter les vibrations de l'air. Ainsi les fréquences perçues s'échelonnent de 20 à 2000 Hz/s. La structure responsable est l'organe de Johnston (JO) situé sur le pédicelle (Dreller et Kirchner, 1993 ; Kirchner et al., 1991).

### *iii. Appareil buccal*

Comme on peut s'en douter, l'appareil buccal de l'abeille (Snodgrass, 1984) est très spécialisé à sa fonction de butineuse. Il est de type broyeur-lécheur. Il est le premier maillon d'un tube digestif adapté à son alimentation, basée sur le miel, le nectar et le pollen.

On trouve tout d'abord un labre ou lèvre supérieure. Puis 2 mandibules en forme de pinces permettent à l'abeille de façonner la cire, de couper la propolis, pincer, broyer, d'ouvrir les étamines ou encore se défendre contre des ennemis. Enfin, on trouve la trompe ou proboscis, elle-même constituée des maxilles (mâchoires) et du labium (langue). La réunion de plusieurs éléments des maxilles et du labium forme un canal qui permet à l'abeille d'aspirer le nectar des fleurs dans un sens mais aussi de régurgiter de la salive ou du nectar pré-digéré dans l'autre sens. Il existe des poils érectiles sur le proboscis qui auraient un rôle dans cette fonction (Wu et al., 2015 ; Zhao et al., 2015). La régurgitation de salive sert par exemple à dissoudre un miel trop dur. En outre, les abeilles pratiquent la trophallaxie qui consiste en une régurgitation de la nourriture pré-digérée contenue dans le jabot afin de nourrir d'autres insectes de la colonie. La langue est rétractable (Cook, 1880). Sa longueur détermine quel type de fleurs l'abeille sera capable de butiner. En effet, elle diffère d'un type d'abeille à un autre, mais aussi et surtout

d'une race d'abeille à une autre (Alpatov, 1929). Par conséquent, la longueur de la langue est l'un des éléments utilisés pour discriminer les races d'abeilles entre elles par des méthodes morphométriques (Waddington et Herbst, 1987 ; Cariveau et al., 2016), ce que nous verrons par la suite dans la deuxième partie.

#### *iv. Glandes annexes du tube digestif*

Il existe plusieurs types de glandes associées au tube digestif. Ces glandes sont indispensables au mode de vie de l'abeille fait de récolte, de transformation et de trophallaxie.

On trouve tout d'abord les glandes salivaires situées dans la tête et le thorax. Comme leur nom l'indique, elles servent à la sécrétion de salive en vue de la digestion des sucres, notamment ceux du miel. Mais elles sont également une source de phéromones (Le Conte et al., 2006). Il y a ensuite la glande hypopharyngienne dans laquelle est élaborée en grande partie la nourriture finale donnée aux larves (Corby-Harris et al., 2016), la ration de base comme la gelée royale. Cette glande présente une plasticité importante (Ohashi et al., 2000 ; Peng et al., 2012) et atteint une taille maximale au stade nourrice (Corby-Harris et al., 2016). Les sucres digestifs produits par la glande sont importants pour cette opération. Cette glande produit également des enzymes nécessaires au métabolisme des sucres (Sasagawa et al., 1989), et donc à la fabrication de miel. Enfin, les glandes mandibulaires (Maschwitz, 1964), situées en arrière des mandibules, sécrètent notamment des constituants de la cire, de la gelée royale ainsi que des phéromones, par exemple du 2-heptanone, phéromone d'alarme (Shearer et Boch, 1965 ; Kerr et al., 1974) ou encore la QMP (*queen mandibular pheromon*) chez la reine (Pankiw et al., 1998) qui incite les ouvrières au butinage.

#### *v. Cerveau*

Le cerveau de l'abeille est assez complexe. Il comprend 3 parties : le protocérébron en avant, ainsi que le deutocérébron et le tritocérébron, pour un total de 950 000 neurones (Witthöft, 1967). C'est au sein du cerveau que sont produites deux hormones fondamentales pour l'abeille : l'ecdysone (Feldlaufer et al., 1985), qui joue un rôle dans la mue de la larve, et l'hormone juvénile (Hartfelder et al., 2015), impliquée dans le comportement des ouvrières.

### c. Le thorax

A l'instar de tous les insectes, le thorax est composé de 3 segments (Snodgrass, 1984). Il contient de nombreux muscles, permettant d'animer les organes locomoteurs de l'abeille que sont les ailes (2 paires) et les pattes (3 paires). C'est également sur le thorax qu'apparaissent en superficie 3 paires de stigmates, qui sont les orifices du système respiratoire.

#### i. Les pattes

Les pattes de l'abeille sont assez similaires à celle des autres insectes. Elles sont formées de pièces articulées que sont la hanche, le trochanter, le fémur, le tibia et le tarse (Snodgrass, 1984). Ce dernier est lui-même composé de 5 éléments. Le dernier est spécifique chez l'abeille. Outre la présence de 2 griffes, il existe une pelote adhésive lui permettant de se déplacer sur des parois verticales. Par ailleurs, il existe plusieurs particularités de l'abeille au niveau de l'articulation tibia-tarse. Sur la première paire de pattes, il existe un peigne antennaire (Schönitzer et Renner, 1980) permettant de récupérer les grains de pollen sur les antennes (voir figure 14).

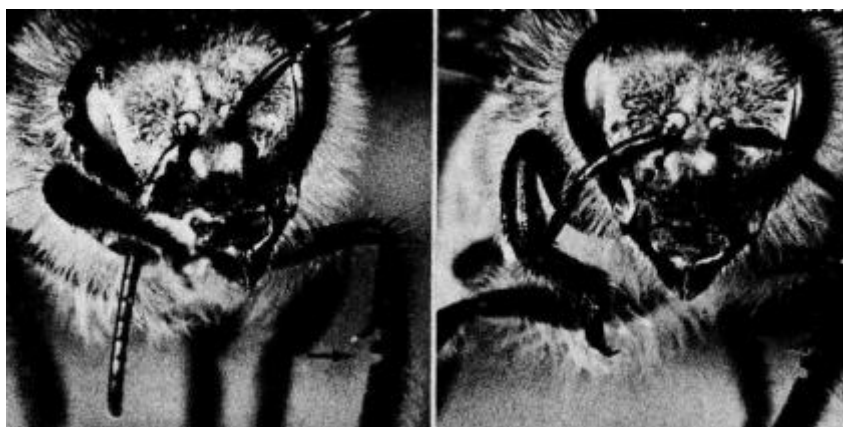


Figure 14 : Abeille se nettoyant les antennes grâce au peigne antennaire (d'après Schönitzer et Renner, 1984)

La seconde paire présente une brosse visant à récupérer le pollen du peigne antennaire. Enfin, la 3ème paire possède, en face interne, une brosse à pollen pour récupérer celui de la 2ème paire de pattes, une pince tibio-tarsienne permettant de travailler la cire, et surtout un cuilleron ou corbeille en face externe (Winston, 1991). Il s'agit d'un creux au sein duquel est fixé un poil rigide. C'est autour de ce poil que l'abeille butineuse rassemble les grains de pollen en une pelote colorée visible à l'œil nu et pesant en moyenne 7,57 mg (Maurizio, 1953 ; Hodges, 1954). Au sein de cette corbeille sont présents des mécano-récepteurs qui permettent à l'abeille d'évaluer si elle doit continuer à récolter du pollen ou rentrer déposer la pelote à la ruche (Ford et al., 1981). Les abeilles travaillent toujours en zigzag : le pollen passe de la 1ère patte gauche à la 2ème patte droite puis à la corbeille de la 3ème patte gauche (et vice-versa) (Casteel, 1912).



**Photographie 9 : Pelotes de pollen sur les pattes d'une abeille butineuse (source : INRA [en ligne]. Disponible sur <http://www.inra.fr/Grand-public/Ressources-et-milieus-naturels/Tous-les-dossiers/Abeilles-pollinisation-biodiversite-pesticides/Abeilles-pollinisation-et-biodiversite> (consulté le 27/07/2016))**

## *ii. Les ailes*

Les 2 paires d'ailes sont attachées sur le segment postérieur du thorax. Les ailes antérieures sont davantage développées que les ailes postérieures. Elles sont désolidarisées et repliées vers l'arrière au repos et fonctionnent ensemble pendant le vol. En effet, il existe un système de crochets qui permet que les 2 ailes soient reliées et n'en forment plus qu'une (Snodgrass, 1984). Les crochets, encore appelés hamuli, sont situés sur le côté antérieur de l'aile postérieure et viennent s'accrocher dans une gouttière située sur le côté postérieur de l'aile antérieure. Ce système permettrait de diminuer les turbulences au cours du vol. En outre, elles arborent des nervures qui renforcent leur rigidité et permet un battement d'aile à la fréquence de 200 battements par seconde (Sutton, 2014). On estime qu'une abeille vole entre 0,8 et 3,3 m/s (Esch, 1976) et qu'elle fait 10 à 15 trajets par jour, qui font en moyenne, entre 1 et 2 km.

A ce rythme, on comprend aisément que le vol est un processus très énergivore. D'ailleurs, l'espérance de vie d'une abeille est directement liée au temps qu'elle passe à butiner. Voilà pourquoi une abeille d'hiver peut survivre 10 mois (Merz et al., 1979 ; Mattila et al., 2001) grâce à une activité réduite tandis qu'une abeille de printemps ou d'été vivra au maximum 30 jours (Dainat et al., 2012) avec seulement 5 jours d'épuisant butinage au bout duquel le compteur de vol affichera des centaines de kilomètres.

## d. L'abdomen

L'abdomen est la partie terminale, qui est aussi la plus longue, du corps de l'abeille. Il est formé de 7 segments reliés entre eux et capables, dans une certaine mesure, de s'imbriquer. Sur chacun d'entre eux est présente une paire de stigmates. Outre la présence d'une part importante de l'appareil digestif et respiratoire, c'est au sein de l'abdomen que se situe l'appareil reproducteur et l'appareil vulnérant, encore appelé dard. Enfin, d'autres organes spécifiques sont portés par l'abdomen, il s'agit des glandes cirières et de la glande de Nasanov.

### i. Le jabot

Le système digestif de l'abeille commence par la bouche puis se prolonge tout au long du thorax par un long œsophage qui débouche finalement dans le jabot ou « poche à miel ». Cet organe est indispensable pour l'activité de l'abeille. Il constitue une poche extensible dans laquelle elle stocke les liquides et notamment le nectar (Olofsson et Vásquez, 2008). Celui-ci y est mis en contact avec de nombreuses enzymes et bactéries (dont certaines des genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* ; Olofsson et Vásquez, 2008) et donnera le miel. Lorsqu'il est plein, il occupe une grande partie du volume de l'abdomen.



Figure 15 : Jabot de l'abeille rempli de nectar. a. Le jabot b. Le proventricule (d'après Olofsson et Vásquez, 2008)

Une fois arrivée à la ruche, l'abeille régurgite tous les produits de butinage et les transmet à une ouvrière par trophallaxie. Par ailleurs, le jabot est également un lieu de transit des aliments vers l'aval du tube digestif. On trouve ainsi un estomac (proventricule et ventricule), un intestin grêle, des tubes de Malpighi (Snodgrass, 1984) qui sont l'équivalent de nos reins et une ampoule rectale où s'accumulent les excréments. Lorsque celle-ci est pleine, l'abeille sort de la ruche pour faire un vol dit « de propreté ». Dans une ruche, il n'y a donc en temps normal aucune trace de défécation. Cela veut dire qu'une ruche sale est une ruche qui ne va pas bien.

### *ii. Les glandes cirières*

Les glandes de l'appareil cirier sont situées sous les sternites 4 à 7 (Snodgrass, 1984). Elles présentent 3 types de cellules : des cellules épithéliales, des oenocytes et des adipocytes (Cassier et Lensky, 1995). Elles sécrètent des petites lamelles de cire qui vont se retrouver sur la pince tibio-tarsienne. L'abeille les récupère ensuite via ses pinces buccales et les incorpore à ses constructions.

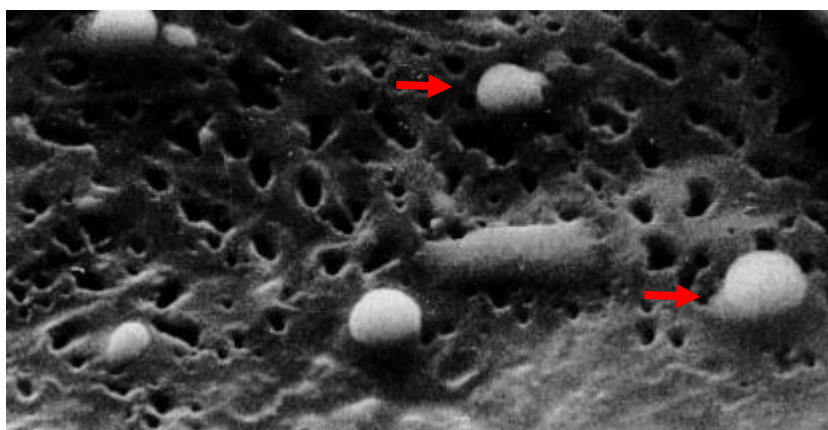


Figure 16 : Ultrastructure des glandes cirières et gouttes de cire sortant des puits (d'après Cassier et Lensky, 1995)

### *iii. Organe de Nasanov*

La glande de Nasanov est le siège de la production de nombreuses phéromones et sécrétions odorantes (Sladen, 1902), en particulier celles qui permettent aux abeilles de se reconnaître entre elles. Elle est située entre les tergites 6 à 7 sur l'abdomen dorsal (McIndoo, 1914). Il existe depuis longtemps dans le commerce des formulations synthétiques qui reproduisent les phéromones de cette glande (Pollinus®, BeeScent® ; (Mayer et al., 1989)).

## B. Particularités par type d'abeille

Dans le chapitre 3, nous verrons qu'il existe 3 types d'abeilles dans une ruche : la reine, la femelle ouvrière et le mâle ou faux-bourdon. Ces 3 castes présentent des particularités anatomiques liées à leur physiologie. Nous venons de voir l'anatomie d'une abeille à travers l'exemple de l'abeille ouvrière car elle est largement majoritaire en nombre au sein de la ruche. Voyons maintenant quelques particularités des 2 autres castes.

### a. La reine

Lié à son rôle de pondreuse, la reine présente de nombreuses adaptations morphologiques conçues en ce sens. Elle est l'individu le plus grand de la colonie et se reconnaît facilement. Elle mesure environ 2 cm de long avec un abdomen bien développé qui dépasse largement des ailes et pèse environ 210 mg (Tarpy et al., 2011) . À l'inverse de celui de ses ouvrières, son appareil génital est fonctionnel. C'est ce qui explique que son abdomen soit si long et volumineux (Collins et Pettis, 2013). Sa taille est d'ailleurs proportionnelle à la quantité de sperme qu'elle stocke (Collins et Pettis, 2013). L'appareil génital est constitué de deux ovaires très volumineux composés d'ovarioles (structure contenant une succession d'ovocytes à différents stades de développement) en très grand nombre. Ces ovaires sont rattachés au vagin par deux oviductes. Une spermathèque ou vésicule séminale (réserve de sperme) est annexée au vagin. Les ovules descendent dans le vagin en passant éventuellement par la spermathèque pour être fécondés puis sont déposés par l'orifice génital. Comme son nom l'indique, la spermathèque est la réserve de spermatozoïdes datant de l'accouplement (Poole, 1970). Ces derniers, qui sont près de 5 millions (Tarpy et al., 2011), sont conservés tout au long de la vie de la reine.



Photographie 10 : Une reine marquée au milieu de ses ouvrières (source : collection personnelle)



Par ailleurs, ne sortant de la ruche que pour le(s) vol(s) de fécondation, la reine présente des yeux plus petits que les ouvrières ou les mâles et une langue plus courte (Leimar et al., 2012). Les glandes cirières et de Nasanov sont absentes, les glandes hypopharyngiennes réduites et les glandes mandibulaires sont par contre hypertrophiées car c'est dans ces glandes que sont produites les phéromones royales (Naumann et al., 1991). Enfin, les adaptations morphologiques des pattes en vue de la récolte du pollen sont absentes chez la reine. Cette absence serait due à une expression différentielle de 6 gènes entre ouvrière et reine (Santos et Hartfelder, 2015).

## **b. Le mâle**

A l'image de la reine, le mâle n'a qu'un rôle reproductif. En effet, il ne fournit aucun travail dans la ruche et se « contente » de féconder une reine vierge lors d'un vol de fécondation. Son appareil génital fonctionnel est symétrique. Ainsi, sont présents deux testicules, deux canaux déférents, deux vésicules séminales soudées en fer à cheval, un canal éjaculateur et un bulbe pénien (Snodgrass, 1984). L'organe de copulation est interne. Il sort grâce à 2 structures appelées pneumophyses qui se gonflent d'air. L'accouplement est douloureux pour le mâle car il se fixe dans l'appareil génital de la reine et s'arrache une fois l'accouplement terminé ce qui entraîne leur mort (Woyke et Ruttner, 1958). La fécondation d'une reine est donc le chant du cygne du faux-bourdon.



**Photographie 11 : Deux faux-bourdons au milieu des ouvrières (source : collection personnelle)**

Les mâles mesurent environ la même taille que la reine (2 cm de long) mais ils ont un abdomen plus court et trapu. A l'inverse de la reine, cet abdomen ne dépasse que très peu les ailes. Leurs yeux sont très volumineux et se rejoignent quasiment sur le sommet de la tête, ce qui permet de les reconnaître assez facilement. De forme globuleuse, ils comptent environ 8000 facettes (Perrelet, 1970). Pour une espèce donnée, les faux-bourdons présentent toujours davantage de couleurs jaunes ou pâles sur la tête (Michener, 2007). Ceci est une particularité commune aux Hyménoptères. Les mâles n'ont pas non plus de plaques cirières et de système de récolte du pollen sur les pattes (Hrassnigg et Crailsheim, 2005). Enfin, ils n'ont pas non plus de dard ce qui les rend inoffensifs pour l'Homme.

# CHAPITRE 3 : PHYSIOLOGIE DE L'ABEILLE, LA VIE EN COLONIE DANS LA RUCHE

## A. Les différentes castes d'abeilles

Les colonies d'abeilles comptent environ 20 000 à 50 000 individus selon les ruches et la saison (Jean-Prost, 1987). La ruche est ce que l'on appelle un superorganisme (Hölldobler et Wilson, 2009). C'est une société très bien organisée avec d'un côté des individus immatures et de l'autre les adultes. Les immatures comprennent les larves et les nymphes. Ces derniers sont rassemblés dans les cellules d'une zone particulière de la ruche que l'on appelle le couvain et qui est en quelque sorte le nid de la colonie. Celui-ci est toujours construit au centre des cadres situés au centre de la ruche. Cette localisation permet à la colonie de maintenir un micro-climat avec notamment une température extrêmement régulée (entre 33 et 36°C) (Seeley, 2014) puisque la température optimale pour le couvain est de 34,5°C (Groh et al., 2004). A la belle saison, il s'étend sur une zone ovale représentant près des  $\frac{3}{4}$  des cadres tandis qu'il est extrêmement réduit voire inexistant l'hiver. Par extension, le terme couvain est souvent utilisé pour désigner l'ensemble des individus immatures et non pas seulement la zone où ils se localisent.

Les individus adultes sont composés de la reine, qui est la seule femelle à posséder une activité de ponte (dans une situation normale), des ouvrières, et des faux-bourçons (les mâles). Il ne faut pas confondre les faux-bourçons avec les bourçons, insectes de plus grande taille et plus velus appartenant au genre *Bombus*. Ces derniers visitent les fleurs, ce qui n'est pas le cas des faux-bourçons. Dans cette étude nous nous concentrerons uniquement sur les formes adultes. Faisons plus ample connaissance avec elles dans les paragraphes suivants.

## **a. La reine**

### *i. La mère de la colonie*

C'est l'individu le plus important de la colonie, la clé de voûte (Moore et al., 2015). C'est aussi le plus facile à reconnaître grâce à son allure singulière caractérisée par un abdomen bien plus long que celui des ouvrières. Sa taille fait d'elle l'individu le plus volumineux de la colonie. Cette différence de taille est mise à profit par les apiculteurs par l'utilisation de grilles à reine que les ouvrières seules sont capables de traverser. Ceci permet de limiter l'accès de la reine à certaines zones de la ruche et permet notamment d'éviter de trouver des œufs ou des larves dans le miel de récolte.

La reine est en général cachée par les ouvrières, notamment l'été lorsque la population de la colonie est abondante. Son espérance de vie varie de 3 à 5 ans (Page et Peng, 2001), mais actuellement les reines ont tendance à vivre moins longtemps (Rangel et Tarpy, 2016).

La reine a essentiellement une fonction de ponte : c'est la mère de la colonie. Par conséquent, tous les individus de la ruche sont issus de sa ponte. On comprend ainsi aisément que la santé et la viabilité de la ruche dépendent majoritairement d'elle (Hatjina et al., 2014). En raison de stades larvaire et nymphal réduits par rapport au mâle ou à l'ouvrière, il ne faut que 16 jours à la reine pour passer de l'œuf à l'individu adulte (Degrandi-Hoffman et al., 1998).

Les reines sont issues d'œufs fécondés parfaitement identiques à celui des ouvrières, c'est la nourriture qu'elles reçoivent tout au long de leur période larvaire qui modifie leur corpulence, l'activité de leurs organes et leurs capacités (Wang et al., 2013), ce qui constitue une démonstration brillante des principes de l'épigénétique (Maleszka, 2008). En effet, alors que les ouvrières et les mâles reçoivent au cours de leur période larvaire une nourriture où la gelée royale est progressivement diminuée au profit du miel et du pollen, les larves de reine sont exclusivement nourries avec de la gelée royale (Rembold et al., 1974 ; Haydak, 1970). Cette alimentation différenciée engendre des niveaux de méthylation de l'ADN variables entre reines et ouvrières (Kucharski et al., 2008), et ces différences de méthylation ont des effets majeurs. Elles auraient notamment un impact sur les formes épissées produites ce qui se traduit par de la variabilité dans les produits de transcription (Lyko et al., 2010), et, en définitive, par des protéines différentes et des trajectoires de développement divergentes. En outre, il existe, selon le devenir de l'abeille, une expression différentielle de gènes en fin de stade larvaire (Cameron et al., 2013), notamment de microARNs (Guo et al., 2013 ; Ashby et al., 2016).

## *ii. Evolution d'une colonie sans reine*

Le remplacement d'une reine peut se faire de différentes manières. La plupart du temps, la vieille reine quitte la ruche au cours de l'essaimage (= forme de reproduction de la colonie, voir chapitre 3c). Dans ce cas, les ouvrières anticipent ce départ en construisant de nombreuses cellules royales (Yadava et Smith, 1971).

L'apiculteur peut aussi décider de remplacer une vieille reine dont la ponte est devenue défaillante en la tuant et en la remplaçant par une jeune reine. On parle alors de remérage (Tarpy et Fletcher, 1998). Il faut toutefois prendre certaines précautions, par exemple la reine introduite ne doit être ni trop jeune, ni trop âgée, l'âge idéal étant compris entre 7 et 24 jours (Rhodes et al., 2004).

Il arrive bien souvent qu'une ruche se retrouve sans reine de manière accidentelle, on dit alors qu'elle est « orpheline ». S'il existe des larves de moins de 3 jours, ces dernières sont encore indifférenciées et les ouvrières peuvent alors changer leurs devenir et les entourer d'une cellule de reine alors appelée « cellule de survie » (Page et Peng, 2001). Une dizaine de ces larves seront promues. Si par contre la reine meurt alors qu'il n'existe aucun couvain de moins de 3 jours, au bout d'un certain temps, des ouvrières vont se mettre à pondre (Visscher, 1989), de manière désordonnée, des œufs non fécondés qui donneront des faux bourdons. Pour cette raison on dit alors que la ruche est devenue « bourdonneuse ». Ainsi la ruche se peuple progressivement de mâles à mesure qu'elle se dépeuple d'ouvrières. À ce stade il devient très difficile d'espérer récupérer cette colonie en lui greffant une nouvelle reine.

La reine possède un dard atrophié de forme courbe qui, à sa naissance, lui sert à tuer ses rivales. En effet, lorsqu'une ruche prépare un essaimage ou lorsqu'elle se retrouve orpheline, le processus de création d'une nouvelle reine met en jeu plusieurs cellules royales donc potentiellement plusieurs reines. Or, dès que la première cellule royale éclot, la reine vierge qui en est issue se débarrasse de toutes les autres cellules (Tarpy et al., 2004). Bien que son dard soit atrophié, l'aiguillon de la reine est fortement accroché si bien qu'à l'inverse des ouvrières elle ne meurt pas d'avoir piqué mais au contraire peut piquer plusieurs fois. En outre, il semble que les ouvrières participent également à la destruction des cellules royales lorsque leurs occupantes ne leur promettent pas un avenir optimal (Tarpy et al., 2015).

## **b. Les mâles ou faux-bourdons**

Ils sont quelques milliers dans la ruche mais ne sont produits qu'à la belle saison, c'est-à-dire à partir du début du printemps jusqu'à la fin de l'automne (Allen, 1958 ; Winston, 1991). Ils vivent environ 6 mois.

Ils possèdent 2 rôles principaux. Tout d'abord, ils sont responsables de la fécondation de la reine vierge lors du vol nuptial (Hrassnigg et Crailsheim, 2005). Ensuite, ils participent à la thermorégulation de la ruche en brassant l'air avec leurs ailes (Harrison, 1987).

Par contre, ils se nourrissent des réserves sans participer aux autres activités de la ruche. Pour cette raison, dès que la colonie prépare la rentrée en hibernation, les mâles sont soit chassés, soit tués pour limiter la consommation de la ruche (Morse et al., 1967). *A contrario*, si on trouve des mâles en hiver, la ruche a vraisemblablement un problème.

Les mâles sont les individus dont la période immature est la plus longue puisqu'il faut en effet 24 jours pour passer de l'œuf à l'adulte (Hrassnigg et Crailsheim, 2005). Alors que des ouvrières sans réserve sont généralement mal accueillies par une colonie voisine, ce n'est pas le cas des mâles qui peuvent facilement s'introduire de ruche en ruche car ils sont tolérés.

## **c. Les femelles ouvrières**

Elles sont les plus nombreuses et ce sont elles qui travaillent dans la ruche. D'une taille inférieure à celles de la reine et des faux bourdons, elles possèdent un appareil génital atrophié mais un dard fonctionnel. Les ailes sont légèrement plus grandes que l'abdomen, les yeux sont non jointifs et leur allure svelte. Leur durée de vie dépend de la saison. L'été, elle est de 30 à 40 jours alors qu'elles peuvent vivre plusieurs mois l'hiver (Maurizio, 1953). Il faut 21 jours pour passer de l'œuf à l'adulte (Hrassnigg et Crailsheim, 2005).

## **B. Organisation au sein de la ruche**

Ainsi la ruche comporte une reine, des ouvrières et des faux-bourçons qui forment une société de plusieurs milliers d'individus où règnent une hiérarchie et une organisation poussée. L'abeille étant un insecte social, cela suppose un haut niveau d'organisation. Chacun de ces individus accomplit ses tâches spécifiques au cours du temps afin de permettre à l'ensemble de la colonie de s'adapter à la saison, de prospérer et de se multiplier. De manière assez schématique, on pourrait résumer la vie de la colonie en disant qu'elle vise à donner naissance à suffisamment de population et à stocker suffisamment de réserves pour pouvoir passer l'hiver suivant (Hrassnigg et Crailsheim, 2005).

### **a. Répartition des tâches**

#### *i. La ponte : monopole de la reine*

La reine est la mère de la colonie. Son activité principale est la ponte. Et c'est une activité très importante. La probabilité d'une bonne récolte augmente de manière exponentielle avec la population de la ruche. C'est pour cette raison que la fécondité est un caractère recherché par les apiculteurs. On estime qu'une reine pond près de 2000 œufs par jour (Winston, 1991). Au cours de sa vie, elle en pond entre 1 et 8 millions (Michener, 2007).

Mais avant de pondre, la reine doit être fécondée. En effet, elle naît vierge, atteint la maturité sexuelle au bout de 5 à 10 jours (Kocher et al., 2008) et ne deviendra apte à pondre qu'après avoir réalisé un vol nuptial encore appelé « vol de fécondation », au cours duquel elle reçoit le sperme de nombreux bourçons. Ces mâles sont entre 6 et 50 (Delaney et al., 2011) et proviennent de nombreuses ruches (Tarpy et al., 2004) situées parfois à des kilomètres. Ce sperme sera alors stocké, pour toute sa vie, dans une spermathèque (Baer et al., 2009). La libération ou non de ce sperme change le devenir de l'œuf et le sexe de l'individu à naître (voir Déterminisme sexuel p 119). Toutefois, la liberté de choix de la reine est tout relatif, ce dernier semblant surtout guidé par la forme de l'alvéole dans laquelle elle s'apprête à glisser l'œuf (Ratnieks et Keller, 1998).

Par ailleurs il s'écoule environ 3 semaines entre la ponte d'un œuf et son éclosion. L'œuf mesure environ 2 mm et éclot en général 3 jours après avoir été pondu. Il donne une larve qui, pendant les 3 premiers jours, est nourrie avec de la gelée royale (Haydak, 1970 ; Shuel et Dixon, 1960) puis avec un mélange miel/pollen les jours suivants (sauf si l'abeille est destinée à devenir reine). La durée de la période larvaire (Rembold et al., 1980) dépend du devenir de l'abeille : 8 jours pour une reine, 9 jours pour une ouvrière et 10 jours pour un mâle. Cette période se termine par l'operculation de l'alvéole, c'est-à-dire la fermeture par une fine couche de cire. A partir de là, la larve devient nymphe et subit une métamorphose destinée à lui faire acquérir les caractères d'une abeille adulte. En particulier les mandibules qui lui permettront de percer l'opercule pour sortir de l'alvéole. Là encore, la durée de cette métamorphose (Rembold et al., 1980) dépend du type d'abeille : elle dure en moyenne 5 jours pour une reine, 9 pour une ouvrière, et 11 pour un faux-bourdon.

## *ii. Travaux divers des ouvrières*

Les travaux des ouvrières au sein de la ruche sont divers et variés. On peut globalement les diviser en 2 groupes : les activités intérieures à la ruche d'une part, avec notamment les fonctions d'élevage, de fabrication de gelée royale, de construction des alvéoles et d'évaporation, et les activités extérieures à la ruche d'autre part, qui consistent essentiellement au butinage et au gardiennage.

On observe chez les abeilles ouvrières une évolution des fonctions avec l'âge (voir figure 17). Ce phénomène est appelé polyéthisme d'âge (Calderone, 1998 ; Ohashi et al., 2000 ; Winston, 1991).

- De 1 à 3 jours après l'éclosion de l'œuf, l'ouvrière est nettoyeuse. Elle retire de sa cellule et de celle de ses congénères les déchets qui résultent de sa métamorphose et de son éclosion. Puis, elle devient responsable de l'operculation du couvain et enfin ventileuse : elle bat des ailes pour maintenir une température régulière au sein de la colonie, notamment l'été.
- De 3 à 5 jours, elle est nourrice. Elle puise dans les réserves de la ruche du miel et du pollen qu'elle utilise pour nourrir les larves avant leur operculation (= fermeture des alvéoles).
- De 5 à 10 jours : elle reste nourrice mais de grade supérieur. Cette fois, elle distribue de la gelée royale, produite grâce à ses glandes hypopharyngiennes, à la reine mais aussi à toutes les larves pendant leurs premiers jours.



- De 10 à 18 jours, elle est magasinnière. Son rôle est de décharger les butineuses qui reviennent à la ruche du pollen qu'elles portent et du miel qu'elles ont produit dans leur jabot. Elle va ensuite le stocker dans les alvéoles. S'il est nécessaire de fabriquer de nouveaux rayons, elles pourront également être cirières et bâtisseuses. Pour ce faire, les ouvrières utilisent la cire, qu'elles secrètent grâce à leurs glandes cirières. Les rayons sont des cloisons verticales et parallèles tapissées sur les 2 faces de petites loges hexagonales que l'on appelle des alvéoles ou cellules. Ces cellules pourront servir de loge pour une future abeille ou de lieu de stockage pour les réserves alimentaires.
- De 18 à 20 jours, elle est gardienne. A cet âge-là, l'organe de Nasanov et le sens de l'olfaction sont bien développés. Elle se poste donc à l'entrée de la ruche pour la défendre contre les intrus.
- A partir du 21<sup>ème</sup> jour et jusqu'à sa mort elle accède à la fonction suprême, celle de butineuse (Fahrbach et Robinson, 1995). Son rôle est de sortir de la ruche pour aller récolter le pollen et de quoi fabriquer le miel : nectar (sécrétion sucrée d'origine florale) et miellat (excréments des pucerons). Toutefois, l'abeille ne sort pas butiner à n'importe quelle condition. Il faut qu'il fasse un temps assez sec, avec peu de vent et une température supérieure à 9°C (Bernd, 1979).

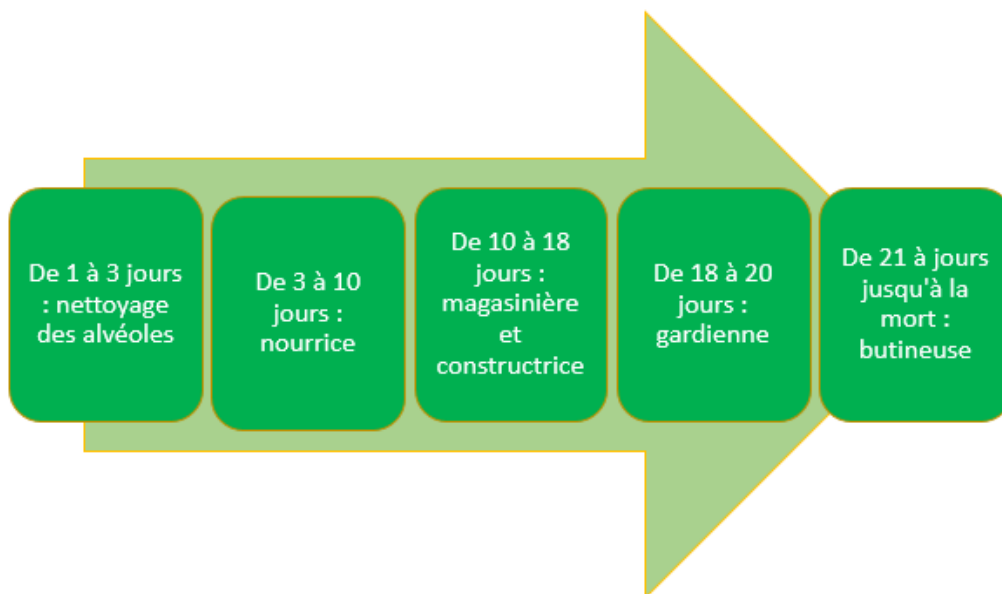


Figure 17 : Chronologie de l'activité des ouvrières

Cette évolution des tâches en fonction de l'âge engendre d'importantes modulations de l'expression génétique. Ainsi, comme nous l'avons vu, le niveau de méthylation de l'ADN change fortement au cours du temps (Elango et al., 2009) et même la ploïdie de certains tissus, par le biais d'endopolyploïdie (Rangel et al., 2015) qui est un processus d'amplification du matériel génétique sans division cellulaire et qui permet de pourvoir à un besoin momentané d'expression supplémentaire.

Ce système est toutefois réversible et d'une grande plasticité. Par exemple, s'il manque des butineuses, les nourrices ou magasinères peuvent devenir butineuses en accéléré. A l'inverse, s'il manque de nourrices pour alimenter un couvain abondant, des butineuses vont être rétrogradées au rang de nourrice. Une infestation parasitaire peut également conduire à une accélération de l'accession des jeunes abeilles à des rôles plus importants (Lecocq et al., 2016). Ceci étant, les abeilles qui butinent précocement sont en général peu efficaces et cette désorganisation accélère la perte de la colonie (Perry et al., 2015).

Le rôle des hormones et phéromones est prépondérant dans cette régulation. Ainsi les phéromones émises par la reine et par le couvain (Maisonnasse et al., 2010) stimulent un comportement de nourrice et activent même la méthylation de l'ADN chez les ouvrières (Holman et al., 2016) tandis que l'hormone juvénile, dont l'analogue synthétique utilisé en tant qu'insecticide est le méthoprène, active le comportement de butinage (Robinson, 1985). Ceci nous amène à aborder plus en détail les systèmes de communication à l'œuvre au sein de la ruche.

## **b. Communication**

Les interactions entre les abeilles et leur communication, qui permettent leur vie harmonieuse en colonie au sein de la ruche, a toujours été d'un grand intérêt pour le monde de la recherche. Par conséquent, cela a fait l'objet de nombreux travaux dont nous nous contenterons de rappeler l'essentiel.

### *i. La danse des abeilles*

Touchée du doigt par Aristote (Gould, 1976), disséquée et popularisée par von Frisch (Frisch, 1967), la danse des abeilles et toute sa sophistication a toujours été perçue comme un exemple de communication animale. Elle consiste en la transmission entre abeilles *Apis mellifera* d'informations sur les ressources alimentaires aux alentours de la ruche (I'Anson Price et Grüter, 2015). Ces informations incluent la nature de la ressource, son abondance et sa

localisation. La butineuse qui a découvert une nouvelle source de nourriture va réaliser des figures géométriques sur les cadres de cire placés verticalement dans la ruche (Grüter et Farina, 2009). On distingue, selon la distance de la source de nourriture, 2 types de danses (Waddington, 1982) : la danse en rond pour une source à courte distance et la danse frétilante pour une source à longue distance. Le seuil de distance pour passer d'une danse en rond à une danse frétilante varie selon les races (Lindauer, 1971). Il est par exemple de 35 mètres chez *A. mellifera ligustica*, l'abeille italienne, et de 85 m chez *A. mellifera carnica* l'abeille carniolienne.

- La danse en rond

La danse en rond ne donne pas d'information sur la distance de la source et la direction à prendre (Frisch, 1967). En effet, elle est réalisée pour une source de nourriture située à quelques mètres seulement de la ruche. Elle est utilisée pour ce que l'on appelle le recrutement (Waddington et Kirchner, 1992). Ainsi, une butineuse ayant découvert un parterre de fleurs prélève un peu de nectar et rentre à la ruche. Elle va ensuite réaliser cette danse très simple (Gould, 1976) qui consiste à réaliser un cercle de manière répétée en changeant parfois de sens (voir figure 18). Plus la source de nectar est importante et plus elle va augmenter le nombre de tours. Dans sa danse, la butineuse est suivie par d'autres ouvrières qui posent leurs antennes sur elle et la suivent par ce biais (Rohrseitz et Tautz, 1999). Avant et pendant la danse, la butineuse transfère un peu de nectar aux ouvrières (Gould, 1976). Ainsi, les autres butineuses vont sortir de la ruche et chercher activement la source en question à l'aide de l'odeur du nectar qu'elles ont eu le plaisir de goûter.

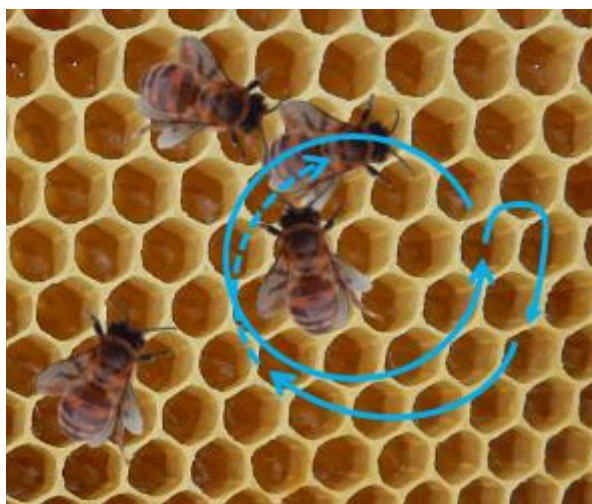


Figure 18 : La danse en rond (d'après Michener, 1974, *The Social Behavior of Bees : a Comparative Study*).

- La danse frétilante

La danse frétilante permet quant à elle la transmission d'information sur la distance de la source et la direction. Elle est utilisée pour les sources plus éloignées. La butineuse va d'abord effectuer un parcours rectiligne de quelques cm au cours duquel elle balance son abdomen de chaque côté en émettant un fort bourdonnement (Gould, 1976). A l'issue de cette ligne droite elle va tourner, alternativement à droite et à gauche, en effectuant un demi-tour circulaire (voir figure 19) qui la ramène au point de départ du parcours rectiligne (Tsujiuchi et al., 2007). Et ainsi de suite. Si l'abeille colorait le tracé de son parcours à mesure qu'elle le fait, vu de haut cela ressemblerait à un huit.

Là encore des butineuses la suivent en la touchant des antennes et reçoivent du nectar de temps à autre (Gould, 1976).

Pour transmettre l'information de la distance de la source, 2 éléments sont prépondérants. Le premier est la vitesse de réalisation des tours qui est inversement proportionnel à la distance (Srinivasan et al., 2000 ; Esch et al., 2001). Plus l'abeille réalise les tours rapidement, plus la source est proche. Le deuxième est le nombre d'oscillations de l'abdomen par tour. Plus il est élevé et plus la distance l'est également (Wenner et al., 1967).



**Figure 19 : La danse frétilante (d'après Michener, 1974, *The Social Behavior of Bees : a Comparative Study*).**

En ce qui concerne la direction, c'est légèrement plus compliqué (Gould et al., 1970 ; Riley et al., 2005). Nous avons vu que la danse est réalisée sur un cadre de cire vertical. Lorsqu'elle la réalise, l'abeille tient compte de l'angle que forme l'axe du parcours rectiligne avec la verticale (cf. figures 20 à 23). Cet angle est exactement le même que celui qui a pour sommet la ruche et pour côtés les lignes ruche-soleil d'une part et ruche-source de nourriture d'autre part. En résumé, la butineuse transmet la direction de la source de nourriture en reproduisant au cours

de sa danse l'angle soleil-ruche-nourriture. Le sens de l'angle a donc également de l'importance. Pour cela rien de plus simple, si la source de nourriture se situe à droite de la ligne ruche-soleil, l'axe du trajet rectiligne est réalisé avec le bon angle à droite de la verticale et vice-versa si la source est à gauche. Comment faire alors si la source est dans l'alignement de l'axe ruche-soleil ?

Là encore les abeilles ont la solution : le trajet rectiligne est calqué sur la verticale et si la source est entre la ruche et le soleil l'abeille parcourt le trajet rectiligne de bas en haut, si la source est derrière la ruche vis-à-vis du soleil, elle parcourt le trajet rectiligne du haut vers le bas.

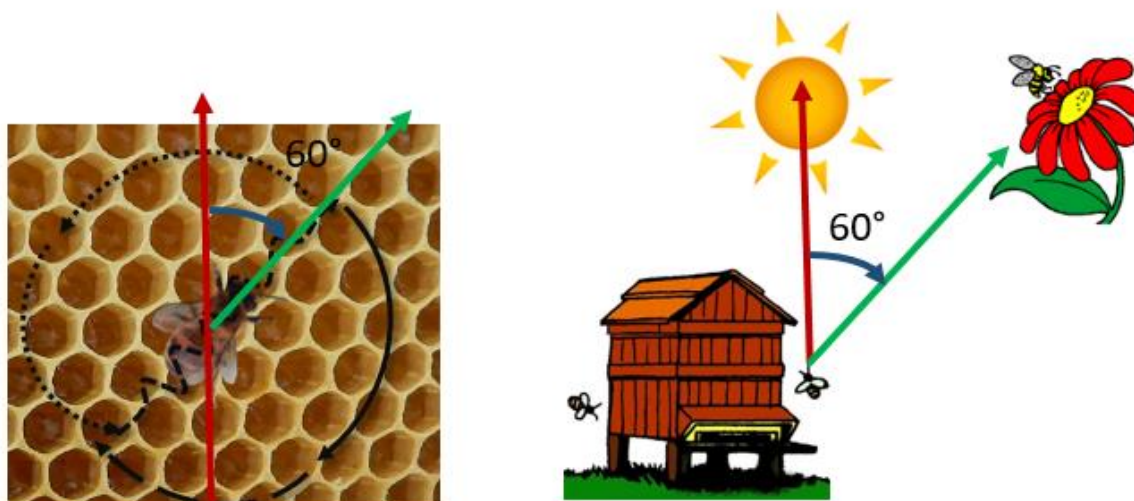


Figure 20 : Indication de la direction, angle d'environ  $60^\circ$  vers la droite (d'après Michener, 1974, *The Social Behavior of Bees : a Comparative Study*). Les flèches rouges représentent dans le premier cas la verticale et dans le deuxième la direction ruche-ligne d'horizon du soleil. Les flèches vertes représentent dans le premier cas la direction du trajet rectiligne de la danse et dans le deuxième la direction ruche-parterre de fleurs.

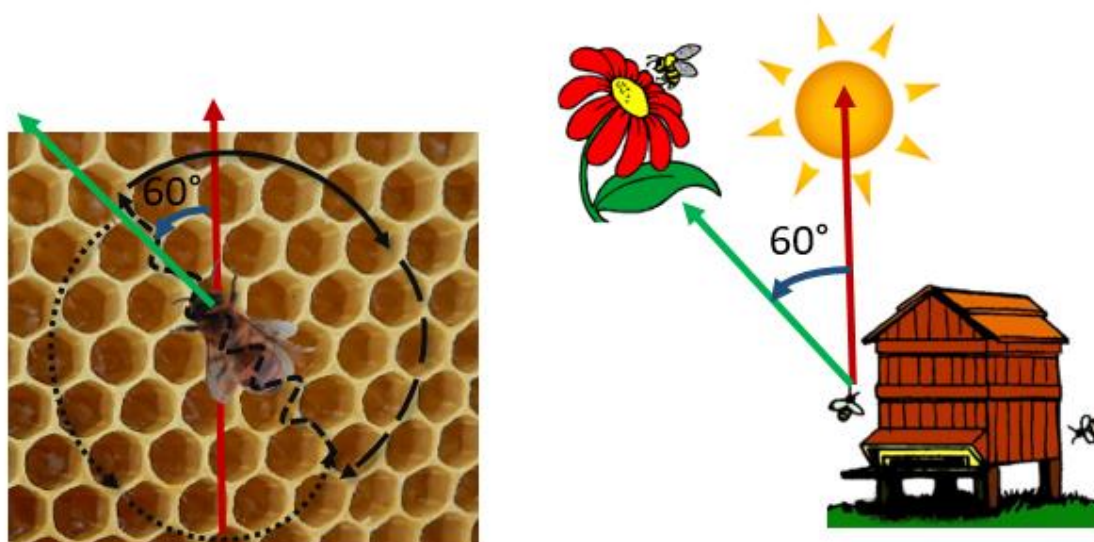


Figure 21 : Indication de la direction, angle d'environ  $60^\circ$  vers la gauche (d'après Michener, 1974, *The Social Behavior of Bees : a Comparative Study*).

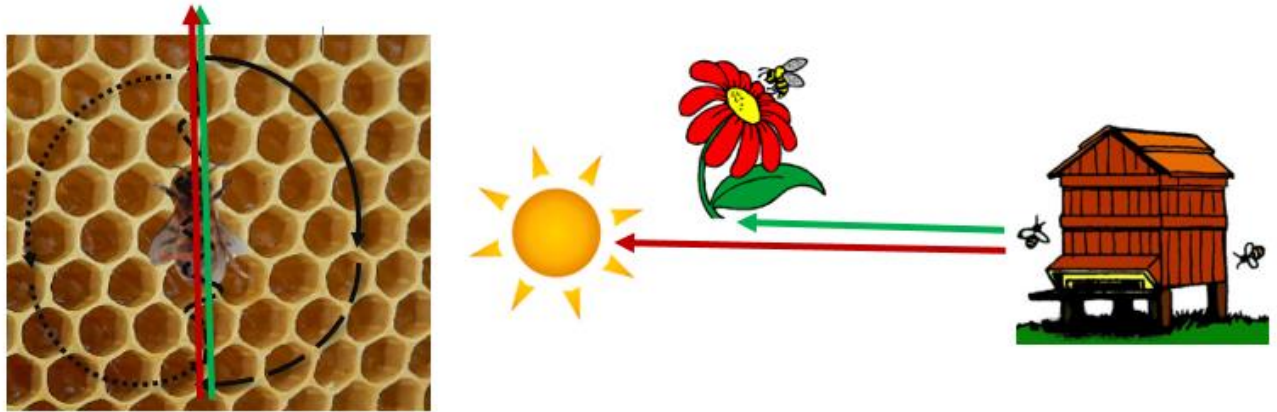


Figure 22 : Indication de la direction, angle nul, source située entre la ruche et le soleil (d'après Michener, 1974, *The Social Behavior of Bees : a Comparative Study*).

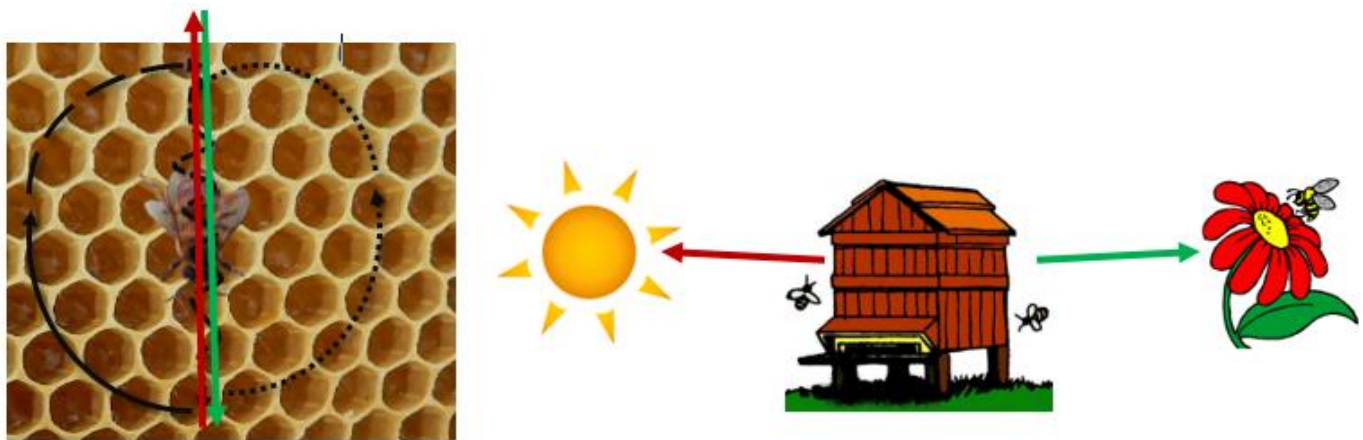


Figure 23 : Indication de la direction, angle nul, source située derrière la ruche par rapport au soleil (d'après Michener, 1974, *The Social Behavior of Bees : a Comparative Study*).

Dans le cas où le soleil est caché par des nuages plus ou moins épais, les abeilles repèrent la position de ce dernier par le biais de la lumière polarisée qu'il émet et notamment la composante ultraviolet (Menzel et Snyder, 1974 ; Rossel et Wehner, 1986). En dernier recours, les abeilles utilisent le champ magnétique terrestre pour se repérer (Martin et Lindauer, 1973), par exemple lors d'un temps pluvieux survenant brutalement. Ce système merveilleux présente parfois des dysfonctionnements (Preece et Beekman, 2014) de telle sorte que les abeilles recrutées se trompent de destination (Schürch et al., 2016).

## *ii. Autres formes de langage*

Outre la danse, la communication entre abeilles et sa régulation fait appel à plusieurs types de signaux, notamment chimiques mais également tactiles.

Nous avons déjà évoqué le rôle prépondérant des phéromones (Pankiw, 2004). Il s'agit de substances chimiques émises par des individus de la colonie, reçues par d'autres et qui engendrent chez le receveur une action particulière. Par exemple le couvain émet des phéromones, telle le (E)  $\beta$ -ocimène (EBO), à destination des ouvrières qui en retour viennent les nourrir (Maisonnasse et al., 2010 ; Ma et al., 2016). Ces phéromones agissent comme un signal comportant des informations spécifiques sur l'émetteur, par exemple sur ses besoins en rapport avec son âge ou sa caste. En outre, ces substances incitent les nourrices à le rester tant qu'il y a du couvain à élever.

La reine exerce également sa domination sur la colonie par le biais de phéromones qui ont plusieurs rôles. Elles sont responsables de la « castration chimique » des ouvrières puisqu'en présence de ces phéromones, le développement des ovaires des ouvrières est inhibé (Hoover et al., 2003). Mais aussi du comportement de cour des ouvrières et de l'unité de la ruche, c'est-à-dire de la capacité des abeilles à se reconnaître comme appartenant à cette ruche (Le Conte et Hefetz, 2008). Ces phéromones activent aussi la construction des rayons et inhibent celle des cellules royales. Pour autant, si la population de la ruche devient très importante, avec une densité supérieure à 2,3 ouvrières/m<sup>3</sup> (Lensky et Slabezki, 1981), des cellules royales peuvent apparaître en périphérie du couvain, là où les phéromones royales sont en plus faible quantité. Enfin, les phéromones sont très importantes lors de la formation de l'essaim car ce sont elles qui permettent aux abeilles de repérer leur reine dans la grappe (Grozinger et al., 2014). Les phéromones royales ont été pour la plupart identifiées chimiquement. On connaît notamment l'acide 9-céto-2-décénoïque (9-ODA) encore appelée acide géranique (Butler et al., 1962) ou encore l'acide 9-hydroxy-2-décénoïque (9-HDA) (Pain et al., 1963).

Chez les ouvrières, c'est aussi par le biais de phéromones que les gardiennes de la ruche recrutent des individus en cas d'attaque, par exemple par un frelon asiatique. Ces mêmes gardiennes utilisent leur glande de Nasanov pour émettre une signature chimique qui guide les butineuses revenant à la ruche (Blum, 1992).

Chaque abeille rentrant dans la ruche fait l'objet d'un contrôle de nature chimique et tactile (Breed, 1998) car c'est grâce à leurs antennes que les gardiennes « sentent » leurs congénères. Par ailleurs, c'est également grâce aux antennes que les abeilles se positionnent les unes par rapport aux autres, pour réaliser des opérations telles que l'échange de nourriture par trophallaxie.

## C. Reproduction

### a. L'essaimage

L'essaimage est le moyen naturel de reproduction d'une colonie d'abeilles. C'est un processus préparé au cours duquel la vieille reine part avec deux tiers à trois quarts des habitants de la ruche (Grozinger et al., 2014), le tiers restant élevant une nouvelle reine (Seeley, 2010). On parle d'essaimage car les abeilles forment un essaim qui est en fait une grappe constituée de milliers d'abeilles. Celle-ci se pose la plupart du temps sur une branche proche de la ruche ou dans un arbre (voir photographie 10) pendant que des éclaireuses recherchent un nouveau gîte à proximité.



**Photographie 12 : Un essaim d'abeilles autour d'un arbre (source : collection personnelle)**

Une fois qu'elles ont trouvé un lieu adéquat, elles battent le rappel (voir photographie 13) en ventilant des phéromones issues de leurs glandes de Nasanov (Pickett et al., 1980 ; Avitabile et al., 1975) et en réalisant une danse frétillante (I'Anson Price et Grüter, 2015). Préalablement à leur sortie de la ruche, les ouvrières remplissent leur jabot de miel pour assurer le besoin énergétique inhérent à la construction du nouveau nid (Combs Jr, 1972).





**Photographie 13 : Ouvrière battant le rappel en exhibant sa glande de Nasonov (source : collection personnelle)**

Ce phénomène a souvent lieu au printemps, pendant l'après-midi et au cours d'une belle journée d'un point de vue météorologique. On considère généralement que les stimuli déclencheurs sont la présence d'une population conséquente qui n'est plus qu'en partie soumise aux phéromones royales (Winston, 1980), son corollaire le manque de place (plus de 90% des cellules destinées au couvain déjà remplies ; Winston et al., 1981), la présence d'un pic de récolte (Simpson, 1959) ou d'un pic de production de couvain (Fefferman et Starks, 2006). Environ deux semaines avant, les ouvrières élèvent entre 10 et 20 (Grozinger et al., 2014) jeunes reines tandis que la vieille reine se prépare à devenir apte au vol (Seeley et Fell, 1981) en réduisant sa ponte (Allen, 1956) et par la même occasion la taille de son abdomen.

À partir d'une seule colonie on en obtient donc deux. Cela peut sembler une aubaine pour l'apiculteur mais en pratique ce n'est pas toujours le cas. En effet, cela implique que l'apiculteur récolte cet essaim parti dans la nature ce qui nécessite une surveillance accrue voire permanente du rucher au printemps, ce qui ne peut pas être le cas pour un apiculteur dont le rucher n'est pas situé sur son lieu d'habitation. D'autre part, la colonie d'origine se retrouve dépeuplée et prend un retard important dans la récolte de provisions, la perte de miel due à l'essaimage étant estimée à 15kg (Lensky et Hochberg, 1973). En effet, la colonie devra passer plusieurs étapes avant de retrouver une activité normale. Il faudra d'abord le temps à une nouvelle reine d'éclore, de se débarrasser des autres reines à naître (Visscher, 1993) puis de se faire féconder sans accident (Schlüns et al., 2005). Ensuite, cette reine va pondre et il faudra encore attendre l'éclosion de cette ponte pour que la colonie reprenne un ordre de marche. L'ensemble de ces processus nécessite environ 2 mois. La colonie ne sera pas entièrement opérationnelle pour autant car ce laps de temps induit un creux générationnel (Tarpy et al., 2000) au sein de la ruche ce qui implique que certaines tâches seront momentanément délaissées ou ralenties. En conséquence, il est généralement admis qu'une ruche qui a essaimé ne pourra pas être récoltée

au cours de la même saison, sous peine de la condamner à mourir l'hiver qui suit. Enfin, un essaimage implique des manipulations multiples qui font courir le risque à l'apiculteur d'écraser malencontreusement la reine.

Pour toutes ces raisons, un essaimage naturel est plutôt une mauvaise affaire pour l'apiculteur. C'est pourquoi celui-ci cherche des moyens de le prévenir ou de l'éviter (Moore et al., 2015). Récemment, il a été montré (Zacepins et al., 2016) que la température au sein de la ruche augmentait de 1,5 à 3,4°C dans les 20 minutes précédant le départ de la ruche, ce qui, dans le cadre d'une apiculture de précision et monitorée, pourrait permettre d'avertir l'apiculteur, afin si ce n'est de l'empêcher, au moins de récupérer l'essaim. Il semble toutefois que des essaimages fréquents permettent, pour des abeilles sauvages, une meilleure lutte contre *Varroa destructor* (Loftus et al., 2016).

Il faut savoir que la tendance à essaimer varie souvent en fonction de l'âge de la reine, les vieilles reines étant plus essaimeuses (Hauser, Lensky 1994), mais également en fonction de la race d'abeille (Winston et al., 1983), si bien que les apiculteurs en tiennent compte dans le choix de leurs abeilles.

## **b. La supersédure**

Il arrive parfois que le remplacement de la vieille reine ait lieu sans essaimage. On parle alors de supersédure (Butler, 1957). Lorsque la reine devient âgée (entre 3 et 4 ans), sa ponte diminue, la production de miel chute (Nelson et Smirl, 1977) et elle ne produit plus suffisamment de phéromones d'inhibition du couvain royal (Butler, 1957). Une ou deux cellules royales sont alors élevées au centre de la colonie, sans que la vieille reine ne montre aucune hostilité. Une jeune reine éclot, réalise son vol de fécondation et se met à pondre si bien qu'elle remplace progressivement la vieille reine qui sera, en définitive, chassée de la colonie voire tuée par ses ouvrières. Parfois, les 2 reines peuvent cohabiter pendant des mois (Butler, 1957). Ce mode de remplacement de la reine, qui a lieu en général à l'automne, reste tout de même minoritaire en comparaison de l'essaimage.

## **c. Influence de l'apiculteur sur la reproduction de ses colonies**

### *i. Essaimage artificiel*

Afin de prévenir la survenue d'un essaimage tout en augmentant la taille de son cheptel ou en remplaçant des colonies mortes, l'apiculteur peut procéder à la création d'un essaim artificiel. Il s'agit d'anticiper le départ des abeilles et d'opérer la même séparation que lors d'un essaimage naturel mais en le faisant de manière contrôlée ce qui permet d'en retirer tous les avantages. En outre, un tel procédé permet à l'apiculteur d'opérer une sélection en reproduisant ses meilleures colonies à moindre coût. Par ce biais, il s'affranchit également de la récolte de colonies sauvages, au statut sanitaire inconnu. Ces opérations se réalisent la plupart du temps en début de saison, au printemps, lorsque les colonies commencent à être à l'étroit en raison de la population et lorsque les ressources sont abondantes à l'extérieur.

Il s'agit d'un procédé assez simple pouvant être réalisé de plusieurs manières (Nicollet, 2014). La plus commune est une simple duplication par division. Ainsi, les abeilles, au même titre que les réserves de miel et de pollen vont être réparties dans deux ruches différentes, en s'assurant que la ruche qui se retrouve sans reine possède des cadres remplis de couvain jeune à partir duquel les ouvrières vont créer une nouvelle reine (Beekman et al., 2002). Dans cette optique, le marquage des reines qui permet un repérage immédiat de ces dernières trouve toute son utilité. Il s'agira ensuite de déplacer la ruche nouvellement créée suffisamment loin de la ruche d'origine (au moins 5 km) afin d'éviter que les butineuses y retournent. Enfin, ces deux colonies pourront faire l'objet d'un nourrissage afin de stimuler la ponte de la reine et de reconstituer au plus vite une colonie populeuse et vigoureuse.

## ii. Greffe de reine

Si l'apiculteur ne veut pas retarder la colonie nouvellement créée et lui octroyer un maximum de chances de réussite, il peut tout à fait combiner un essaimage artificiel avec l'introduction d'une reine vierge achetée dans le commerce. Ainsi, il s'affranchit de la période d'élevage des reines ainsi que du laps de temps entre éclosion et vol nuptial, soit au minimum 3 semaines (Tarpy et al., 2000). Une solution alternative est d'introduire dans la colonie des cellules royales prêtes à éclore.

L'introduction de reine peut parfaitement être réalisée en dehors de la création d'un essaim artificiel, pour remplacer une vieille reine ou une reine ayant engendré une colonie agressive par exemple (Moore et al., 2015). Il faut toutefois prendre certaines précautions. Par exemple, il faut attendre au moins 24h après la mort de l'ancienne reine, le temps que ses phéromones ne fassent plus effet et que les ouvrières se rendent compte de son absence (Moore et al., 2015). Il est de toute façon plus prudent d'introduire la reine dans une cage grillagée dont l'entrée est bouchée par de la nourriture pour permettre aux ouvrières de s'habituer pendant environ 3 jours, qui est le temps nécessaire pour libérer l'entrée (Moore et al., 2015). La fourniture en alimentation ou encore l'introduction en fin de journée sont d'autres facteurs de réussite. Il semble par contre que l'introduction d'une reine de race différente de celle de la colonie d'origine engendre davantage de rejets.



Photographie 14 : Introduction d'une reine dans une cage grillagée (source : collection personnelle)

# CHAPITRE 4 : ELEVAGE DE L'ABEILLE : COMPRENDRE L'APICULTURE

## A. L'apiculture au fil des siècles

L'apiculture est une branche de l'agriculture qui a pour objet d'élever des abeilles dans le but d'obtenir de manière rentable des produits de la ruche. Comme pour toute activité agricole balbutiante, l'apiculteur a d'abord été un chasseur-cueilleur (Kritsky, 2016) comme en témoigne la peinture de la Cueva de la Araña que nous avons déjà évoquée. D'ailleurs, c'est encore le cas pour bon nombre de tribus primitives, au sens sociologique du terme. On estime que la domestication de l'abeille remonte à 6 000 ans. Des vestiges de cette domestication parcourent l'Antiquité (Kritsky, 2016), de l'Égypte à la Grèce en passant par la Chine. Ils prennent la forme de peintures, de sculptures ou encore de récits. Chez le peuple Hittite qui vivait dans l'actuelle Turquie vers 1300 avant JC, il existait déjà une législation sur les abeilles avec notamment des amendes pour les voleurs de ruches (Bodenheimer, 1942). Les premières ruches utilisées étaient des poteries en terre cuite, comme par exemple en Crète (Nicolaidis, 1955). D'ailleurs, jusqu'à très récemment dans notre histoire, l'apiculture était une activité rudimentaire pratiquée avec des ruches de fortune telles que des troncs d'arbre creux ou encore des paniers tressés plus ou moins recouverts de boue séchée et surmontés d'une cloche de paille. Ce type de panier était déjà utilisé comme ruche en Europe du Nord vers 100-200 avant JC (Ruttner, 1977). Il semblerait que le mot « ruche » provienne du latin « rusca » qui signifie écorce, certaines ruches ayant été construites en écorce de chêne-liège dans le pourtour méditerranéen.

C'est l'invention de la ruche à cadre mobile au 18<sup>ème</sup> siècle qui a révolutionné l'apiculture car dès lors les cadres, de dimensions précises et standardisées, ont pu être sortis de la ruche et remis à leur place, voire interchangeés avec une autre ruche ou remplacés par de nouveaux cadres, tout ceci avec un impact faible sur la colonie. L'inventeur de ce système n'est pas clairement établi car 2 hommes différents sur 2 continents ont eu la même idée au même moment (1850), il s'agit d'August von Berlepsch (1815-1877) en Allemagne et Lorenzo Langstroth (1810-1895) aux États-Unis. Au même moment s'est démocratisée l'utilisation de la hausse, sorte de grenier à miel de la ruche, qui est posée sur le corps et qui peut être récoltée à part. Il existe plusieurs types de ruches, qui diffèrent par leurs dimensions et qui portent en général le nom de leur inventeur. On trouve notamment les ruches de type Langstroth ou Dadant. Avant ces inventions, la récolte du miel impliquait en général de détruire la ruche.

Le développement technologique et les progrès techniques n'épargnent pas l'apiculture. Ainsi, en 2015, des apiculteurs australiens ont créé une ruche innovante appelée Flow Hive® qui permet de récolter du miel sans même l'ouvrir ce qui dérange donc moins les abeilles. Fruit de 10 années de travail, l'apiculteur actionne un simple robinet et les alvéoles s'ouvrent en deux laissant échapper le miel. Par ailleurs, l'apiculture de précision se développe et des chercheurs font fleurir de nombreux systèmes informatisés mesurant des paramètres divers et variés en temps réel (Zacepins et al., 2016).

## **B. Les principaux produits de la ruche**

Les produits de la ruche, sous-entendu les produits issus de l'activité des abeilles, sont divers et variés. On pense dans un premier temps au miel, reconnu pour ses qualités gustatives d'une part et médicales d'autre part (Kuš et al., 2014). Il y a également la cire qui est prisée en cosmétologie, pour la fabrication de bougies ou encore de produits d'entretien. La gelée royale est un autre de ces produits, au même titre que le pollen ou la propolis. Une grande majorité d'apiculteurs vit de la vente des produits susmentionnés. D'autres se sont spécialisés dans la vente d'essaims d'abeilles en vue de repeupler les ruchers d'autres apiculteurs, ou encore dans la vente de reines prêtes à pondre. Comme nous le verrons dans la partie 2, cette population minoritaire d'apiculteurs diffuseurs de génétique joue un rôle notoire dans la composition des populations d'abeilles d'élevage.

Un autre type d'activité existe pour les apiculteurs, il s'agit de la location des ruches pour la pollinisation de cultures ou vergers. Cette source de revenu est encore très peu développée en France. Elle concerne plutôt les Etats-Unis (Sagili et al., 2011), pays où les apiculteurs ont souvent des cheptels très importants, avec des milliers de ruches, et pratiquent une transhumance permanente sur des camions semi-remorques. Cela consiste à déplacer les ruches vers des cultures arrivant à floraison, puis vers la culture en floraison suivante, et ainsi de suite, ce qui donne lieu à de grands voyages à travers les différents Etats. On cite souvent l'exemple bien connu des immenses champs d'amandiers de Californie (Brittain et al., 2013) vers lesquels convergent plus d'un million de ruches transhumantes (Ratnieks et Carreck, 2010) au moment de la floraison. Ce mode d'élevage est plausiblement la source de problèmes sanitaires et de nombreuses carences et déséquilibres pour les abeilles car cela revient à manger un unique aliment pendant un mois puis un autre pendant le mois suivant et ainsi de suite (Goulson et al., 2015). Brièvement, voyons maintenant à quoi correspondent ces différents produits et quels sont leurs intérêts principaux.

## **a. Le miel**

### *i. Production par l'abeille*

Le miel est fabriqué par l'abeille. Il est issu de la transformation du nectar, liquide sucré et vitaminé qu'elles récoltent sur les plantes (White Jr., 1978). Le nectar est une solution aqueuse dont la concentration en sucres varie entre 10 (Nicolson et Nepi, 2005) et 67 % (Langenberger et Davis, 2002). L'abeille extrait le nectar des tubes floraux grâce à son proboscis (trompe). Pendant le butinage, tout ce nectar est stocké dans le jabot au sein duquel débute le processus de transformation en miel, sous l'effet des enzymes qui y sont produites. On trouve par exemple la glucose oxydase (Ohashi et al., 1996) ou l'invertase (qui dissout le saccharose en glucose et fructose) (Simpson et al., 1968). Les sucres complexes sont alors transformés en sucres simples tels que fructose ou glucose (Lindauer, 1952). De retour à la ruche, le contenu du jabot est régurgité aux abeilles magasinères qui vont enclencher la deuxième étape : l'évaporation de l'eau. Le miel en formation sera déposé dans les alvéoles jusqu'à ce qu'il atteigne un faible taux d'humidité, proche de 15% (Lazaridou et al., 2004). C'est de la composition en sucres que résulte la vitesse de cristallisation du miel. L'évaporation de l'humidité du miel est due à des abeilles ventileuses qui font circuler de l'air réchauffé dans les rayons (Southwick et Moritz, 1987). Cet air chaud va se charger de l'humidité du miel puis sera rejeté hors de la ruche. Une fois operculé (Winston, 1991), il constituera la réserve alimentaire de la ruche pour l'hiver. Lorsqu'il récolte les ruches, l'apiculteur ne doit donc pas omettre de laisser une quantité suffisante (entre 15 et 20 kg) pour permettre à la ruche de perdurer.

Il existe en réalité une deuxième source de produits sucrés pouvant être à la base de la fabrication du miel. Il s'agit des miellats (Binazzi et Scheurer, 2009). Ce sont des excréments sucrés présentes sur les tiges et issues de l'activité d'insectes suceurs (Way, 1963), comme par exemple les pucerons. En plus des miellats, les abeilles utilisent également les sudations de sève qui donnent aux résineux cet aspect collant. La composition des miellats reste assez proche de celle de la sève du végétal et contient par conséquent davantage d'azote et d'acides organiques, ce qui a un impact fort sur le goût du miel qui en résulte (Binazzi et Scheurer, 2009). L'exemple le plus commun est celui du miel de sapin qui a un goût extrêmement prononcé. On trouve également dans les miellats des sucres complexes formés dans le tube digestif de l'insecte suceur.

Dans tous les cas, chaque miel est un produit unique dont le goût et la couleur résultent d'une multitude d'éléments qui dépendent de la diversité florale locale, des préférences des butineuses ou encore du climat (Crane et al., 1980). Même au sein d'une ruche, le miel présent sur le cadre  $n$  n'aura pas le même goût que celui présent sur le cadre  $n+1$ . Pour identifier la nature des miels, des chercheurs ont développé une méthode dite de « spectroscopie d'impédance » qui permet de détecter l'origine florale d'un miel (Scandurra et al., 2013).

## *ii. Utilisations*

Schématiquement, le miel est un mélange d'eau, de glucose et de fructose, ce qui en fait un agent sucrant très efficace (Azeredo et al., 2003). Ses applications sont innombrables, qu'il s'agisse de sucrer le thé ou le café, de l'étaler sur des tartines ou encore de cuisiner, c'est pourquoi nous ne nous attarderons pas sur cet aspect.

Il est également réputé pour ses propriétés anti-inflammatoires (Alvarez-Suarez et al., 2014), antioxydantes (Gheldof et al., 2003), antiseptiques, antibiotiques (Chang et al., 2011) et cicatrisantes (Al-Waili et al., 2011), qui s'expliquent en partie par le faible pH (entre 3.5 et 6 ; Rossant, 2011) et la faible teneur en eau (Molan, 1992). Il est d'ailleurs incorporé dans plusieurs spécialités à usage vétérinaire. Par exemple, la pommade Picri-Baume® qui est un baume cicatrisant évitant le bourgeonnement des plaies ou encore le gel Kruise Manuka®. Le miel de manuka contient une substance antibactérienne appelée leptosine (Kato et al., 2012). Il s'agit ici de miel de qualité médicale c'est-à-dire produit selon des règles d'hygiène contraignantes. Toutefois, le miel peut tout à fait être utilisé tel quel accompagné ou non d'un pansement. Grâce à son caractère visqueux, il tient sur la plaie et forme une barrière physique (Mathews et Binning, 2002) qui empêche la pénétration de bactéries. Son utilisation engendre une néovascularisation efficace et accélère la formation du tissu de granulation et l'épithélialisation (Couquet et al., 2013) ce qui a pour conséquence une diminution plus rapide de la taille des plaies (Khoo et al., 2010). De nombreuses études ont déjà montré l'efficacité du miel utilisé dans cet objectif et dans le cadre de la médecine vétérinaire (Nisbet et al., 2010 ; Buczinski et Bélanger, 2004 ; Oelschlaegel et al., 2012 ; Bashkaran et al., 2011).

A l'heure de l'émergence des résistances bactériennes aux antibiotiques et du plan Ecoantibio 2017, le miel apparaît comme une alternative possible dans certaines situations (Blair et al., 2009). Il a par exemple été montré qu'il pouvait éliminer des bactéries pourtant multi-résistantes (Kwakman et al., 2008 ; Cooper et al., 2002 ; Ewnetu et al., 2013 ; Brudzynski et al., 2012 ; Adeleke et al., 2010).



## **b. La cire**

La cire est le matériau de construction de base de l'abeille (Hepburn et al., 1991). Celui à partir duquel elle construit les rayons et les alvéoles. Elle est entièrement synthétisée par l'abeille à partir de l'appareil cirier (voir Chapitre 2) formé de 4 glandes sur la face ventrale de l'abdomen (Piek, 1964). Lorsqu'une plaquette de cire est produite, l'abeille la prélève avec ses pattes puis l'amène jusqu'à ses mandibules où elle va la modeler selon son gré. C'est la réunion de multiples plaquettes qui permet la formation de rayons. La présence de réserves de pollen, signifiant que les ressources sont suffisantes pour l'élevage de couvain, serait un stimulus du développement des glandes cirières chez les ouvrières.

De nature essentiellement lipidique (Putra et al., 2016), elle est utilisée depuis l'Antiquité. Ses utilisations furent multiples au cours de l'histoire, qu'il s'agisse de la momification chez les Egyptiens (Heron et al., 1994), de consolider des navires (Lucas et Harris, 2012), de former des tablettes pour l'écriture (Lucas et Harris, 2012) ou encore de créer des bougies et notamment les cierges d'église. De nos jours, elle est toujours utilisée pour la confection de bougies mais aussi comme lasure pour le bois. Et de manière plus surprenante, dans le processus de production de films plastiques divers (Klangmuang et Sothornvit, 2016) et même d'implants de corticoïdes (Beck et al., 2016) pour lesquels elle présente les avantages d'entraîner un pic de concentration moins élevé, une meilleure persistance et une résorbabilité naturelle (Quispe et al., 2015). Récemment, des chimistes ont réussi à produire du biodiesel à partir de la cire (Hariram et Bharathwaaj, 2015). Par ailleurs, les apiculteurs la récoltent et la recyclent en la faisant fondre pour ensuite générer de nouveaux cadres de cire gaufrée. On la trouve bien davantage dans les produits cosmétiques que dans les produits à visée pharmaceutiques car ses applications thérapeutiques sont limitées. En cosmétique, elle est introduite dans de nombreuses pommades. Il existe néanmoins une pommade vétérinaire pour les soins des trayons qui en contient (Mamibel®). Parmi ses composants, certains permettraient tout de même de soigner les ulcères gastriques chez des rats (Pérez et al., 2012).

### **c. La propolis**

La propolis est une résine végétale (Deswal et al., 2016) visqueuse et collante de couleur marron qui est prélevée par les abeilles sur les bourgeons de nombreux arbres, tels les marronniers, les frênes, les saules ou encore les bouleaux mais également sur les écorces de résineux (pins, sapins). Les abeilles l'utilisent en général mélangée avec de la cire en tant que matériau de construction dans le but de colmater une brèche, une fissure ou d'isoler la ruche d'un courant d'air (Dodwad et al., 2011). Elle est également utilisée pour embaumer des individus morts qui ne peuvent être rejetés physiquement hors de la ruche par exemple lorsqu'une espèce étrangère (souris, mulot, etc.) s'y réfugie l'hiver et meurt des piqûres des hôtes.

Pour la récolte de propolis, il suffit à l'apiculteur de glisser une grille à propolis contre le plafond de la ruche. Celle-ci comporte de multiples petits trous que les abeilles vont s'empresser de boucher à l'approche de l'hiver. Son caractère visqueux rend la récolte assez pénible, c'est pourquoi il est conseillé de disposer cette grille au congélateur. Une fois congelée, la propolis devient cassante (Lotfy, 2006) ce qui permet de la décrocher de la grille.

Ces résines et gommes ne peuvent être utilisées telles quelles dans un but pharmacologique ou thérapeutique. Les substances actives qui la composent doivent être extraites dans une solution liquide, en général de l'alcool. Après filtration, on obtient un extrait de propolis dans lequel sont présents près de 300 éléments solubles (Lotfy, 2006). Il s'agit notamment de phénols et flavonoïdes (Sforcin, 2007), qui ont des propriétés antioxydantes (Fernandes et al., 2016) et enzymatiques. La propolis aurait également des propriétés antibiotiques (Orsi et al., 2012), fongicides (Parolia et al., 2010), anti-inflammatoires (Fischer et al., 2008) et cicatrisantes (de Almeida et al., 2013). La plupart du temps, on utilise ces extraits chez l'homme pour tous les troubles oro-rhino-laryngologiques et buccaux (Samet et al., 2007). Par exemple pour les problèmes dentaires (Sabir, 2016 ; Deswal et al., 2016), les angines, les aphtes (Samet et al., 2007), ou encore les sinusites. Chez les animaux, elle a été testée pour de nombreuses maladies (Coelho et al., 2010). Elle permettrait de lutter contre la diarrhée chronique chez les lapins (Kupczynski et al., 2016) et chez les porcelets (Choi et al., 2003) et favoriserait par ailleurs la croissance des veaux (Kupczyński et al., 2012). En outre, elle aurait une action antiparasitaire, par exemple sur la coccidiose des chèvres (Ghanem et al., 2009) ou encore les strongyloses des bovins (Heinzen et al., 2012).

#### **d. Le pollen**

Le pollen constitue la source de protéines, d'acides aminés et de vitamines de l'abeille. Il est même l'unique source de protéines (Linskens et Jorde, 1997). Son apport est particulièrement crucial pour l'élevage du couvain. Dans cet optique, une ruche en consomme près de 40 kg par an (Di Pasquale, 2014). La récolte du pollen par l'apiculteur nécessite une attention particulière et la mise en place d'un mécanisme ingénieux. Il s'agit d'une trappe à pollen (Lavie, 1967) située à l'entrée de la ruche. Celle-ci agit comme un filtre. Lorsque les abeilles passent à travers, les pattes arrières sur lesquelles sont accrochées les pelotes de pollen frottent contre la grille ce qui a pour effet de détacher la pelote (Komosinska-Vassev et al., 2015). En posant un tamis en-dessous et un réceptacle inaccessible aux abeilles, le tour est joué. Il y a néanmoins de multiples précautions à prendre pour ce genre de structure. Elles doivent permettre le passage des mâles sur les côtés et les trous doivent être à la taille adéquate pour ne pas blesser les abeilles. En outre, le compartiment où le pollen est stocké doit être aéré, protégé de l'humidité et la grille qui le surplombe doit laisser passer le pollen sans laisser passer les débris de l'activité de la ruche, ce qui, le cas échéant, rendrait le pollen au mieux insalubre, au pire inapte à la consommation. Dans tous les cas, la récolte du pollen doit être réalisée le plus fréquemment possible et un contrôle visuel post-récolte ne peut être omis.

Tout comme le miel, sa composition dépend essentiellement de la fleur duquel il est issu. En moyenne, 25% de son poids correspond à des protéines ou acides aminés (Attia et al., 2011). On trouve également des glucides, de l'eau et des minéraux, notamment du potassium (Bogdanov, 2009). Mais encore des lipides et surtout des microéléments tels que la plupart des vitamines (Linskens et Jorde, 1997). La présence de substances cellulosiques et notamment de la coque autour du grain de pollen nécessite de réaliser un choc osmotique préalablement à l'ingestion en vue d'optimiser la digestion. Il suffit pour cela de le dissoudre dans de l'eau (Linskens et Jorde, 1997) ou du jus de fruits. Par ailleurs, le pollen peut tout à fait être congelé.

Il est utilisé chez l'homme comme complément alimentaire. Outre son apport en protéines, il est un immunostimulant (Komosinska-Vassev et al., 2015) et un aliment idéal pour corriger de multiples carences en une seule étape. Il contient en particulier du sélénium (De Jong et al., 1977), antioxydant très peu présent dans nos aliments habituels. Pour toutes ces raisons, il est généralement conseillé pour lutter contre les états de fatigue durable et les troubles immunitaires qui se traduisent par des problèmes digestifs (gastro-entérites, constipations) ou encore urinaires.

Son intérêt a même été testé dans le cadre de l'alimentation d'animaux d'élevage. Ainsi, une supplémentation en pollen permettrait une augmentation du développement de l'intestin chez le poulet de chair (Wang et al., 2007) ou encore une augmentation de la fécondité et de la production de lait chez le lapin (Attia et al., 2011).

### **e. La gelée royale**

La gelée royale est cet aliment miraculeux qui permet à une larve d'ouvrière sans destin particulier de se « transformer » en une reine, à partir de la même génétique (Ashby et al., 2016). C'est dire si son contenu a longtemps suscité des interrogations et entretenu des mystères. En réalité, toutes les larves en reçoivent les premiers jours de vie mais seules les larves de reine en sont nourries ensuite (Pavel et al., 2011). La gelée royale est une sécrétion blanc nacré produite dans les glandes hypopharyngiennes des abeilles nourrices (Haydak, 1970). Ces dernières ingurgitent du pollen qu'elles pré-digèrent. La gelée royale est donc composée en grande partie d'acides aminés et d'eau. Toutes les vitamines du pollen y sont également présentes dont certaines en concentration importante (Nagai et Inoue, 2004). En 2011, une publication avait établi que la possibilité pour une larve standard de devenir une reine était due en grande partie à une protéine de 57 kDa appelée royalactine (Kamakura, 2011). Cette découverte a été contredite depuis (Kucharski et al., 2015). Par contre, on trouve des acides gras, dont certains ont la propriété d'inhiber l'activité de l'histone désacétylase (Spannhoff et al., 2011), ce qui joue un rôle majeur dans ce phénomène.



**Photographie 15 : Gelée royale au sein d'une cellule royale (source : collection personnelle)**

Sa production ne peut se faire qu'en petites quantités et demande un savoir-faire particulier. Ceci implique que généralement les apiculteurs qui la produisent se spécialisent dans ce domaine. La plupart du temps ils s'appuient sur des souches d'abeilles sélectionnées génétiquement (Chen et al., 2002) sur la base de leur productivité et de leur fécondité. Brièvement, le principe de la production est de faire élever un couvain royal massif, en permanence, à une colonie persuadée de ne pas avoir de reine. La reine est ainsi bloquée dans une zone exiguë de la ruche où elle va pondre en grande quantité. Une fois que les cadres auxquels elle a accès sont intégralement remplis de couvain jeune, ils sont retirés, introduits ailleurs dans la ruche et remplacés par des cadres vides. La reine est donc une véritable machine à pondre. Son incapacité à se déplacer ainsi que la grande taille de la ruche limite l'expansion des phéromones royales ce qui induit la production de nouvelles reines par les ouvrières qui sont en quelque sorte leurrées. L'apiculteur utilise des structures spéciales appelées barrettes sur lesquelles sont fixées des cupules au milieu desquelles il dépose des larves. Lorsque la quantité de gelée est maximale dans les cellules royales, l'apiculteur les récupère, retire la larve puis prélève la gelée. La production de gelée royale est particulièrement développée en Chine (Chen et al., 2002) à tel point qu'ils approvisionnent 90% du marché mondial (Cao et al., 2016). C'est aussi pour cela qu'on trouve dans le commerce de nombreuses gelées d'importation à des prix faibles mais dont la qualité est souvent douteuse.

Elle est utilisée tantôt comme stimulant, tantôt comme médicament (Viuda-Martos et al., 2008). De nombreuses vertus lui sont classiquement attribuées même s'il est parfois difficile de démêler les effets véritables de ce qui résulte de la croyance. Elle serait revitalisante (Kamakura et al., 2001), euphorisante (Batchelder, 2002) et améliorerait l'immunité. Par conséquent, elle est généralement utilisée pour traiter les états de fatigue physique ou psychique, sous forme de cures. On la trouve telle quelle ou en mélange avec du miel. Elle a également des utilisations en cosmétologie. Dans le secteur vétérinaire, son effet potentiel a très peu été étudié. Elle a été testée pour le traitement d'ulcères gastriques (Belostotskiĭ, 2008) de rats, pour diminuer le prurit dans le cadre de dermatite allergique (Yamaura et al., 2013) ou encore pour améliorer la fertilité de brebis (Husein et Haddad, 2006).

## C. Panorama de la filière française

Pour comprendre l'intérêt que peut avoir un programme de sélection en apiculture, il est primordial de connaître les enjeux de la filière et ses principaux intervenants. Pour cette raison, nous allons nous intéresser dans cette partie à la filière apicole afin d'en faire ressortir les éléments structurants. Les chiffres utilisés s'appuient en totalité sur les audits successifs réalisés par FranceAgriMer en 1994, 2004 et 2011 (FranceAgriMer, 2012). Leur comparaison permet en outre de dégager les dynamiques qui opèrent à l'heure actuelle.

### a. Dénombrement et profil sociologique des apiculteurs

En 2010, la France comptait 41 850 apiculteurs, possédant 1 074 200 ruches pour une production en miel estimée à 18 330 tonnes. On distingue 3 types d'apiculteurs :

- Les apiculteurs amateurs visant une production familiale (1 à 30 ruches)
- Les apiculteurs pluri-actifs qui ne vivent pas que de l'apiculture (31 à 150 ruches)
- Les apiculteurs professionnels (>150 ruches)

Les chiffres concernant le nombre d'apiculteurs de chaque type, le nombre de ruches qu'ils possèdent et la production de miel associée sont regroupés dans le tableau 1.

**Tableau 1 : Poids relatif des différents types d'apiculteurs en France en 2010 (Audit économique de la filière apicole française, FranceAgriMer, septembre 2012).**

Année 2010	Apiculteurs		Ruches		Production de miel	
	Nombre	%	Nombre	%	Nombre	%
Apiculteurs producteurs familiaux (1 à 30 ruches)	37 326	91,0	294 206	27,0	3 495	19,0
Apiculteurs pluri-actifs (31 à 150 ruches)	2 877	5,0	195 487	18,0	3 227	18,0
Apiculteurs professionnels (plus de 150 ruches)	1 633	4,0	584 525	55,0	11 604	63,0
Total France Métropolitaine	41 836	100,0	1 074 218	100,0	18 326	100,0

Le premier chiffre remarquable est que 91% des apiculteurs sont des amateurs pratiquant l'apiculture pour le loisir et la consommation familiale. Inversement, seulement 4% des apiculteurs sont des professionnels. Pour autant, ces derniers possèdent 55% des ruches et produisent 63% du miel français. On a donc à faire à une filière très peu professionnalisée où une petite minorité d'apiculteurs possèdent une grande majorité des ruches et produisent les 2/3 du miel.

## **b. Localisation**

Les 5 anciennes régions du sud de la France (Aquitaine, Midi-Pyrénées, Languedoc-Roussillon, PACA et Rhône-Alpes) comptent 43% des apiculteurs français pour 51% des ruches et 52% de la production de miel, la palme du nombre de ruches et d'apiculteurs revenant à la région Rhône-Alpes. Ces chiffres se comprennent facilement : l'apiculture est une activité plus rentable et plus facile dans les régions ensoleillées où les floraisons sont abondantes et variées. En effet, les abeilles ne sortent pas butiner lorsqu'il pleut ou lorsque la température est trop faible.

## **c. Évolution sur la période 1997-2010**

L'évolution du nombre d'apiculteurs de chaque type, du nombre de ruches qu'ils possèdent et de leur production en miel sont consignés dans le tableau 2.

**Tableau 2 : Evolution des chiffres-clés sur la période 1994/2004/2010 (Audit économique de la filière apicole française, FranceAgriMer, septembre 2012).**

	Apiculteurs	Ruches	Productions (tonnes)
1994	84 215	1 351 991	/
2004	69 237	1 346 575	25 500
2010	41 836	1 074 218	18 326
Évolution 2004-2010	-40%	-20%	-28%
Évolution 1994-2010	-50%	-21%	/

À l'instar des autres filières d'élevage françaises, on observe une importante diminution du nombre d'apiculteurs (-50% sur 16 ans) engendrant une diminution du nombre de ruches et de la production, qui est moins forte relativement (diminution de « seulement » 21% des ruches sur la même période). Ceci s'explique par une densification des élevages restants qui ont augmenté leur taille unitaire.

Dans le détail, on se rend compte que cette diminution du nombre d'apiculteurs s'est nettement accélérée sur la période 2004-2010 en comparaison avec la période 1994-2004. Cette baisse touche surtout les apiculteurs familiaux qui sont plus sensibles que les autres à la perte de cheptels en raison de leur faible nombre de ruches d'où une professionnalisation qui s'accroît.

#### d. Chiffres d'affaire de la filière

Le dernier audit de FranceAgriMer datant de 2011, le chiffre d'affaire de la filière le plus récent date donc de 2010. Cette année-là, il était estimé à 133,5 millions d'euros. Ce montant est basé sur la somme des valeurs, estimées par les apiculteurs, des produits et services qu'ils produisent, en prix de vente hors taxes. La répartition de ces montants est représentée sur le tableau 3 suivant :

**Tableau 3 : Chiffre d'affaires de la filière apicole en 2010 et répartition par produits et services (Audit économique de la filière apicole française, FranceAgriMer, septembre 2012).**

Produits ou services	Montant estimé en €	% de la valeur totale
Miel	115 155 000	86.2%
Pollen	1 709 000	1.3%
Propolis	438 000	0.3%
Gelée royale	3 563 000	2.7%
Cire	311 000	0.2%
<b>Produits de la ruche</b>	<b>121 176 000</b>	<b>90.7%</b>
Pain d'épices	1 478 000	1.1%
Nougat	525 000	0.4%
Divers	2 110 000	1.6%
<b>Produits transformés</b>	<b>4 113 000</b>	<b>3.1%</b>
Essaims	4 144 000	3.1%
Reines	1 065 000	0.8%
<b>Produits d'élevage</b>	<b>5 209 000</b>	<b>3.9%</b>
Pollinisation	3 048 000	2.3%
<b>Chiffre d'affaires total</b>	<b>133 546 000</b>	<b>100.0%</b>



On observe que la vente de produits de la ruche est logiquement la source de revenus très majoritaire. Il apparaît d'autant plus facile pour les apiculteurs de vendre leur miel que la France n'est pas autosuffisante. En effet, on consomme en France plus de miel que ce que l'on produit et cet écart va en s'aggravant. Le taux d'auto-provisionnement était de 64% en 2004, il est passé à 46% en 2010 (voir tableau 4 ci-dessous). La différence est ainsi comblée par du miel d'importation. Mais ce dernier tire les prix vers le bas si bien que les apiculteurs français sont obligés de vendre le leur à un prix peu rémunérateur. Par exemple, le miel importé d'Asie arrive en France à 1,5 €/kg en moyenne. De leur côté, les apiculteurs français doivent vendre leurs miels au moins deux fois plus chers pour assurer la rentabilité de leurs exploitations. C'est pourquoi des circuits alternatifs sont développés, tel la vente directe. Environ la moitié du miel produit en France est commercialisée de la sorte (Gerster, 2012), notamment sur les marchés de producteurs. Le miel issu de l'agriculture biologique représente 5% de la production. Enfin, le poids des signes d'identification de la qualité et de l'origine (SIQO) tels que les appellations et labels, est assez faible (5%).

**Tableau 4 : Variation du taux d'auto-provisionnement en miel entre 2004 et 2010 (Audit économique de la filière apicole française, FranceAgriMer, septembre 2012).**

Tonnes	2004	2010	Variation 2004/2010
Production estimée	25 500	18 326	-28%
Importations	17 051	25 395	49%
Disponible apparent	42 551	43 721	3%
Exportations	2 500	3 944	58%
Consommation apparente	40 051	39 777	- 1%
<b>Taux d'auto-provisionnement</b>	<b>64%</b>	<b>46%</b>	<b>- 18 points</b>

La diminution du nombre de colonies et de la production a conduit ces dernières années à une augmentation du prix du miel (Lacube et Clément, 2015). Ce qui fait dire à certains que le miel français est devenu une denrée de luxe. Ainsi, pour la période 2010-2015, le miel d'acacia a par exemple augmenté de 22 centimes d'euro/kg/an, 40 centimes/kg/an pour le miel de châtaignier ou encore 33 centimes/kg/an pour le miel de lavande (Lacube et Clément, 2015). Enfin, on estime qu'un apiculteur professionnel peut dégager de son activité un salaire équivalent au SMIC à partir de 400 ruches exploitées.

Ainsi s'achève cette première partie assez généraliste visant à rassembler des connaissances diverses et actualisées sur de nombreux thèmes inhérents à l'abeille. Nous avons situé l'abeille dans le règne animal, retracé son histoire, analysé son rôle pour la société des hommes et les causes de son déclin puis l'anatomie et la physiologie de l'abeille ont été explorées avant de faire connaissance avec les produits de la ruche et la filière apicole. Un lecteur naïf trouvera probablement beaucoup d'informations nouvelles lui donnant une vision, si ce n'est exhaustive, au moins globale du monde de l'abeille. Un lecteur érudit sera lui susceptible d'y trouver quelques informations actualisées ou des pistes à explorer. Dans tous les cas, cette première partie constitue, à l'instar de la construction d'une maison, les fondations pour assimiler et appréhender la partie suivante ainsi que la dernière. Dans une seconde partie, nous allons introduire progressivement des éléments de génétique et nous intéresser à la diversité de l'abeille française *Apis mellifera*, car la présence d'une diversité est le préalable et la base à partir de laquelle des travaux de sélection pourront être entrepris (Pinto et al., 2014).



***PARTIE II :***

***DIVERSITE GENETIQUE DE L'ABEILLE  
D'ELEVAGE EN FRANCE***



# CHAPITRE 1 : PARTICULARITES GENETIQUES CHEZ L'ABEILLE

## A. Un génome entièrement séquencé

C'est en 2006 que, pour la première fois, le génome entier de l'abeille a été séquencé et assemblé (Weinstock et al., 2006) devenant alors le cinquième génome d'insecte entièrement connu après, entre autres, la mouche du vinaigre (*Drosophila melanogaster*), le moustique anophèle (*Anopheles gambiae*) ou encore le ver à soie (*Bombyx mori*). Par contre, il s'agissait du premier génome complet d'un hyménoptère. Pour compléter ce génome de référence, 14 millions de lectures ont été nécessaires. En 2014, une version actualisée a été publiée (Elsik et al., 2014). Désormais, il existe plus de 60 espèces d'insectes dont le génome est séquencé, parmi lesquelles une dizaine d'hyménoptères. Outre le développement des nouvelles technologies de séquençage (Koboldt et al., 2013), cette « explosion » du nombre de génomes assemblés disponibles est due au lancement, en 2011, d'une collaboration internationale appelée i5K (pour *Insect and other Arthropod Genome Sequencing Initiative* ; (Evans et al., 2013) visant à séquencer le génome de plus de 5000 insectes.

Le génome d'*Apis mellifera* contient 236 millions de paires de base structurées en 16 chromosomes. Initialement, 10 157 gènes avaient été identifiés. On en recense à ce jour 15 314. Ce génome présente quelques spécificités :

- la majeure partie des familles de transposons sont absentes ;
- des similarités existent avec le génome des vertébrés en ce qui concerne les gènes impliqués dans les rythmes circadiens ;
- de nombreux gènes impliqués dans l'utilisation du nectar et du pollen, ce qui est en lien avec le mode de vie de l'abeille ;
- de nombreux microARN (miRNAs) montrant une expression différenciée en fonction de la caste ;
- un taux de recombinaison très élevé (Beye et al., 2006).

## B. Déterminisme sexuel

Les abeilles possèdent certes 16 chromosomes différents, mais le nombre total de chromosomes par cellule est variable selon le sexe (16 pour les mâles, 32 pour les femelles). En effet, comme il en sera très largement question dans la partie 3, c'est un système de détermination sexuelle appelé haplodiploïdie qui est à l'œuvre chez les hyménoptères (Cook, 1993 ; Heimpel et de Boer, 2008). Ainsi, les œufs fécondés deviennent majoritairement des femelles diploïdes (16 paires de chromosomes) tandis que ceux qui ne le sont pas naissent mâles et haploïdes (un seul jeu de chromosomes). Il existe néanmoins une exception notable qui est l'objet de la partie expérimentale. En effet, parmi les 16 chromosomes de l'abeille, il n'existe pas, comme chez les mammifères, de chromosomes sexuels. Le déterminisme sexuel est gouverné par un locus appelé *csd* (*complementary sex determiner*) (Beye et al., 2003), situé sur le chromosome 3. C'est l'hétérozygotie au locus *csd* qui conditionne la naissance d'une femelle. Les mâles, qui sont haploïdes et n'ont donc qu'une seule version allélique, sont qualifiés « d'hémizygotés ». Or, il se trouve que malgré le nombre important de versions alléliques existantes (Lechner et al., 2014), il est possible d'obtenir des œufs fécondés (donc diploïdes) homozygotes au locus de détermination de sexe. Et ces individus sont de sexe mâle. De tels mâles diploïdes ont été observés chez au moins 4 familles d'abeilles et 27 espèces, appartenant aussi bien au groupe des abeilles solitaires qu'aux abeilles sociales (Zayed, 2009). Au sein du genre *Apis*, ils sont toutefois éliminés par les ouvrières avant la naissance, au stade larvaire (Woyke, 1963a). Ce système de détermination sexuelle est considéré, avec beaucoup d'autres, comme une cause possible du déclin des abeilles (Zayed et Packer, 2005 ; Zayed, 2009). Nous reviendrons bien plus en détails sur ces différents aspects au sein de la partie 3.

## **C. La fécondation multiple de la reine**

### **a. Principe de la polyandrie**

Comme nous l'avons déjà abordé succinctement dans la partie 1, la reine est fécondée par de multiples mâles chez les abeilles, on parle alors de polyandrie (Crozier et Pamilo, 1996). Il s'agit d'un système garant de diversité génétique (Boomsma et al., 2005) car un meilleur brassage des allèles est assuré. Ainsi, des mâles issus de multiples ruches (Tarpay et al., 2004), jusqu'à 200 (Baudry et al., 1998), parcourent entre 8 et 15 kilomètres (Jensen et al., 2005) pour venir féconder une reine au cours du vol nuptial. Ils se regroupent pour former une comète que l'on appelle « congrégation de mâles » (Bertrand, 2013), au sein de laquelle ils sont parfois jusqu'à 25 000 (Page Jr et Metcalf, 1982). Une petite fraction seulement du sperme des mâles est effectivement stockée dans la spermathèque de la reine (Ruttner, 1956) et la contribution de chaque mâle est inégale (Estoup et al., 1994) car elle dépend de l'ordre d'accouplement, du volume de sperme, etc. La spermathèque d'une reine ne peut en effet contenir qu'une quantité de sperme équivalente à celle d'un mâle (Crozier et Page, 1985). Dans tous les cas, il en résulte que les ouvrières ont toutes la même mère mais des pères différents pour la plupart. Elles sont donc soit pleines sœurs, soit demi-sœurs, tandis que les mâles sont tous pleins frères. C'est pourquoi on observe souvent des différences phénotypiques entre des ouvrières d'une même ruche. Nous aborderons plus en détail les parentés entre individus d'une même ruche au cours de la discussion de la partie expérimentale.



## **b. Les lignées paternelles**

Ce système de polyandrie débouche donc sur l'existence de plusieurs lignées paternelles (« *patrilines* » en anglais) au sein d'une ruche. Le nombre de lignées dépend du nombre de mâles ayant fécondé la reine, qui varie de 6 à 50 environ (Delaney et al., 2011). Et les abeilles ont la capacité de distinguer une demi-sœur d'une pleine sœur (Getz et Smith, 1983), y compris au stade larvaire. Pendant longtemps, cela nourrit la théorie consistant à dire que la diminution du coefficient de parenté devait engendrer des conflits et une diminution de l'altruisme entre individus de lignées différentes au sein de la ruche (Crozier et Fjerdingstad, 2001) et à l'inverse une meilleure coopération entre les ouvrières issues d'une même lignée. Mais les études réalisées sur ce sujet (Moritz, 1988 ; Breed et al., 1994 ; Kirchner et Arnold, 2001) ont toutes conduit au rejet de cette hypothèse. De même, le fait de diluer le coefficient de parenté entre les ouvrières ne conduit pas à une baisse de la production de miel ou de couvain (Underwood et al., 2004). C'est même l'inverse. La diversité génétique consécutive à la présence de plusieurs lignées serait avantageuse pour la colonie. D'une part, les colonies hétérogènes auraient une plus grande force de travail et seraient plus aptes à fonder une nouvelle colonie prospère après un essaimage (Mattila et Seeley, 2007) car elles construisent plus vite des rayons (30%), produisent plus de couvain et butinent davantage (entre 27 et 78%) ce qui se traduit par un meilleur stockage de réserves (39%). La faculté de butiner un nombre plus élevé de types floraux serait justement liée à la présence d'une diversité génétique, qui résulte en des comportements de butinage variés (Cox et Myerscough, 2003). D'autre part, cette hétérogénéité leur procurerait une meilleure résistance aux maladies (Seeley et Tarpy, 2007) et notamment aux parasites (Schmid-Hempel, 1994, 1998). En revanche, il semble que lors d'un élevage royal, les ouvrières élèvent préférentiellement des larves issues de la même lignée qu'elles (Page et Erickson, 1984 ; Visscher, 1986 ; Osborne et Oldroyd, 1999 ; Tilley et Oldroyd, 1997).

## D. Structure de l'ADN mitochondrial

Outre l'ADN contenu dans le noyau, il existe chez l'abeille un ADN mitochondrial. La mitochondrie est un organite cellulaire, dont le rôle principal est de fournir la cellule en énergie, sous la forme d'ATP. Les propriétés de son ADN le rendent particulièrement adapté à la systématique et à la biologie des populations. En effet, bien qu'il soit présent aussi bien chez la femelle diploïde que chez le mâle haploïde, il n'y a en pratique que celui de la reine qui se transmet, sans aucune recombinaison, à la descendance (Garnery et al., 1992). En effet, les mitochondries sont exclusivement et entièrement héritées de la mère, si bien que dans une ruche, les mâles comme les ouvrières possèdent tous le même ADN mitochondrial (noté ADNmt) (Meusel et Moritz, 1993). On comprend donc qu'il constitue un support de choix pour caractériser l'appartenance d'une colonie à une lignée et étudier la généalogie maternelle de la ruche.

Cet ADN est une molécule circulaire, comportant entre 16 500 et 17 000 paires de bases (Smith et Brown, 1988). Particulièrement bien conservé entre taxons (Moritz et al., 1987), il présente notamment 2 gènes codant pour des ARN ribosomiaux, 22 pour des ARN de transfert et 13 pour des protéines. Chez l'abeille, il existe une région particulière (Cornuet et al., 1991) située entre les gènes COI (Crozier et al., 1989), qui code pour la sous-unité 1 de l'enzyme cytochrome c oxydase, et COII (sous-unité 2 de l'enzyme cytochrome c oxydase). Cette région intergénique varie en taille et en nature (polymorphisme de longueur) d'une race à l'autre et est composée de 2 types de séquences riches en adénine et thymine : P/Po d'une longueur d'environ 54 pb (100% A/T) et Q d'environ 196 pb (93,4% A/T). P et Po diffèrent seulement par une insertion/délétion de 15 pb (Garnery et al., 1992). Ces séquences s'enchaînent selon différentes combinaisons, par exemple PoQ, PQ, PQQ ou simplement Q. Un test rapide a été développé (PCR-RFLP ; Garnery et al., 1993 ; Rortais et al., 2010), permettant d'assigner une abeille à telle ou telle lignée en fonction de son haplotype.

# CHAPITRE 2 : METHODES D'EVALUATION DE LA DIVERSITE GENETIQUE

## A. Préambule

### a. Les sous-espèces

Afin de caractériser la diversité des populations d'abeilles françaises en vue d'opérer, le cas échéant, une conservation et une sélection, la première étape fondamentale est d'être capable de reconnaître les sous-espèces (Zayed, 2009) ainsi que, dans une certaine mesure, les hybridations entre les différentes sous-espèces. On peut définir une sous-espèce comme un ensemble d'individus partageant certains caractères et ayant une histoire évolutive commune à une échelle plus faible que celle de l'espèce (Lherminier et Solignac, 2000). Cette caractérisation peut paraître triviale à réaliser dans l'espèce bovine ou canine, mais ce n'est pas le cas pour *Apis mellifera*. En effet, les éléments morphologiques discriminants qui permettent de faire une différenciation sont visibles à l'œil nu sur une espèce de grande taille, mais nécessitent parfois une loupe binoculaire voire un microscope pour une espèce de petite taille telle qu'*Apis mellifera*. Notons qu'il est plus adéquat de parler de sous-espèce que de race chez l'abeille car la notion de race inclut généralement la sélection par l'homme, ce qui n'est pas toujours le cas pour *Apis mellifera*. Néanmoins, nous emploierons régulièrement le terme de « race » par commodité de langage.

### b. Les écotypes

Il nous faut également prendre le soin de définir un terme fréquemment rencontré qui est celui d'écotype. Un écotype est un groupe d'individus appartenant à une même espèce qui présente des caractéristiques particulières découlant d'une adaptation progressive à un milieu. Un écotype est donc différent d'une sous-espèce puisque les individus qui forment un écotype sont inclus dans une sous-espèce alors que l'inverse est faux. Les caractéristiques propres à un écotype sont transmises de manière héréditaire et sont donc le fruit d'une longue sélection naturelle.

Nous allons maintenant nous intéresser aux différentes méthodes permettant d'identifier l'appartenance d'une abeille à une sous-espèce. Nous commencerons par les analyses morphométriques, puis nous nous intéresserons aux méthodes moléculaires, plus récentes, qui utilisent les informations contenues dans le génome.

## B. Analyses morphométriques

### a. Morphométrie standard

Les premières tentatives de classification des races abeilles étaient toutes basées sur la coloration de l'exosquelette (Tomassone et Fresnaye, 1971) et notamment sur la détermination de la présence et de l'importance de tâches jaunes sur les premiers tergites de l'abdomen. Dès 1975, Cornuet (Cornuet et al., 1975) a cherché à classer des populations d'abeilles à partir de l'analyse statistique multivariée (Tomassone et Fresnaye, 1971) de mesures biométriques, c'est-à-dire à partir de mesures morphologiques réalisées précisément sur les abeilles. Les premiers caractères mesurés étaient par exemple la coloration (largeur de la bande jaune sur le 2ème tergite), la pilosité, la taille du corps, la longueur de la langue ou de certaines parties du corps de l'abeille, ou encore l'indice cubital qui est un rapport de plusieurs mesures réalisées sur les cellules délimitées par les nervures des ailes.

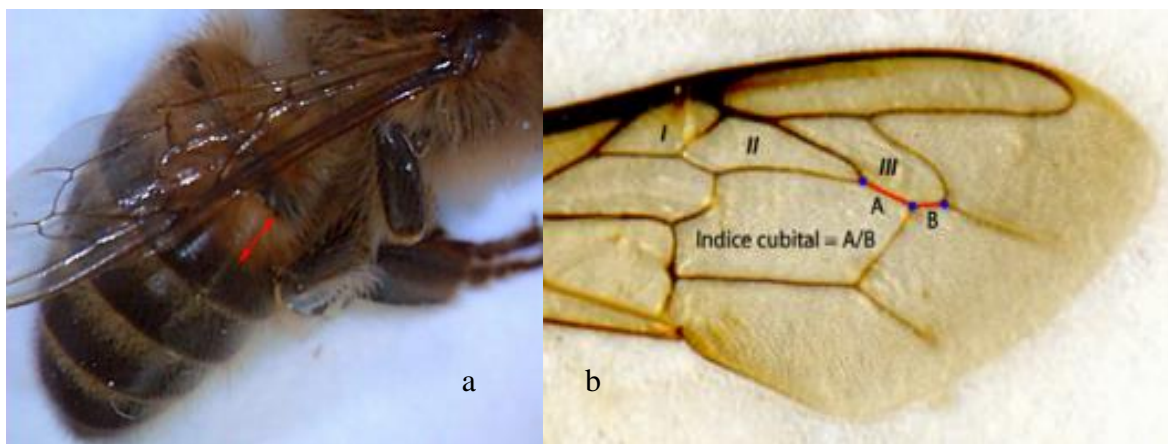


Figure 24 : a. Mesure de la coloration b. L'indice cubital (source : P. Camus [en ligne]. Disponible sur : <http://pcamus.be/api/cours/races.pdf> (consulté le 27/08/2016))

Ruttner et al., (1978) définirent ensuite 42 caractères biométriques pour classifier des sous-espèces venant de zones géographiques très éloignées. À partir de ces caractères, 26 races ou sous-espèces regroupées en 4 lignées évolutives ont pu être initialement distinguées (Ruttner et al., 1978 ; Ruttner, 1988). Ces lignées sont les suivantes :

- la lignée M (races de l'Europe de l'Ouest)
- la lignée A (races africaines)
- la lignée C (races d'Europe centrale et de l'Est)
- la lignée O (races de Turquie et du Caucase).

Elles ont été reprises dans de nombreux travaux et, à un détail près, font encore foi aujourd'hui. Nous les verrons plus en détail dans le chapitre 3. De manière générale, la contribution de l'autrichien Friedrich Ruttner à l'étude des sous-espèces d'*Apis mellifera* fut très importante. Tant et si bien que son nom fut donné à une sous-espèce récemment découverte. En effet, l'abeille de l'île de Malte a été nommée *Apis mellifera ruttneri* en son honneur (Sheppard et al., 1997). Cette méthode, appelée morphométrie « standard » est encore d'actualité de nos jours et continue d'être une méthode de référence (Ruttner et al., 2000 ; Radloff et Hepburn, 2000 ; Diniz-Filho et al., 2000 ; Adl et al., 2007 ; Francoy et al., 2008). Elle suffit amplement pour distinguer une race pure comme par exemple une abeille noire. Il convient toutefois d'utiliser plusieurs critères à la fois car se fier à un seul est une importante source d'erreur.

### b. Morphométrie géométrique

Plusieurs méthodes morphométriques peuvent être distinguées. Nous venons de voir la méthode « standard » qui correspond à une analyse de distances, d'angles et de rapports. Désormais, il existe une nouvelle méthode, plus précise, qui consiste à utiliser des points caractéristiques de l'aile antérieure, repérés par des coordonnées cartésiennes, ce qui permet d'établir un profil mathématique. Il suffit alors de comparer le résultat obtenu à une base de données de référence pour faire l'identification. On parle de morphométrie « géométrique » (Bookstein, 1997). Des logiciels sont disponibles gratuitement en ligne, notamment à l'adresse suivante : <http://life.bio.sunysb.edu/morph/>. Il existe également le logiciel ApiClass (Baylac et al., 2008). Dans le même ordre d'idée, des logiciels payants sont développés, notamment ABIS (Automatic Bee Identification System) qui, à partir d'une simple numérisation de l'aile antérieure, établit le genre, l'espèce et la race (Schröder et al., 1995 ; Arbuckle et al., 2001) avec une efficacité allant de 94% (Drauschke et al., 2007) à 98% (Francoy et al., 2008). L'erreur la plus courante avec ce logiciel est de confondre une abeille *A. m. ligustica* avec une *A. m. carnica*, et vice-versa (Francoy et al., 2008).

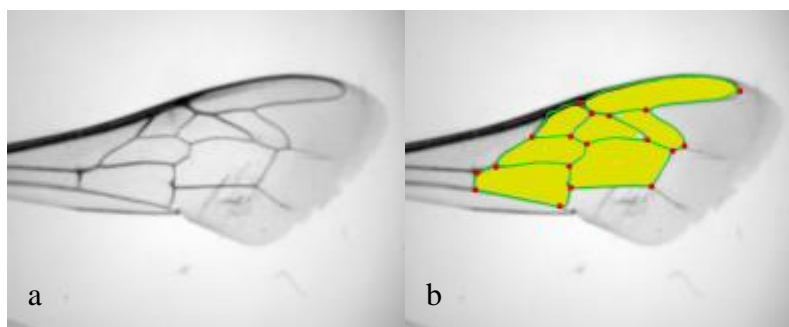


Figure 25 : Le logiciel ABIS. a. Image de l'aile antérieure en entrée du logiciel. b. Reconnaissance des cellules et repérage des points-repères par le logiciel (d'après Drauschke et al., 2007)

De nos jours, malgré le développement des techniques de biologie moléculaire, les méthodes morphométriques ne faiblissent pas et continuent d'être utilisées, parfois seules mais souvent en complément des méthodes moléculaires. Cette résistance des méthodes morphométriques peut s'expliquer notamment par la démocratisation du numérique. A titre d'exemple, Garnery (Garnery, 2004) réalise, dans le cadre d'une grosse étude de biodiversité de l'abeille française dont il sera question dans le chapitre 3, une analyse morphométrique par le biais de la numérisation des ailes, suivie de la localisation de 19 points repères.

## C. Analyses moléculaires

Avec l'avènement de la génétique moléculaire et notamment de la PCR, de nouvelles méthodes sont apparues pour identifier les races d'abeilles. Elles ne s'intéressent plus au phénotype des abeilles mais au génotype. Certaines utilisent les marqueurs microsatellites, d'autres les SNP ou encore l'ADN mitochondrial dont nous avons vu les propriétés dans le chapitre précédent.

### a. Utilisation de l'ADNmt

Parmi les études utilisant des méthodes moléculaires en vue de discriminer des sous-espèces d'*Apis mellifera*, celles portant sur l'analyse de l'ADN mitochondrial (Smith et Brown, 1988 ; Garnery et al., 1992 ; Garnery et al., 1993 ; Arias et Sheppard, 1996) ont d'abord mis en évidence 3 des 4 lignées définies par Ruttner (lignée M, lignée A et lignée C). Dans les premières études, l'utilisation de l'ADNmt ne permettait pas de distinguer les lignées C des lignées O, c'est pourquoi ces 2 lignées étaient parfois regroupées au sein de la lignée C (Arias et Sheppard, 1996), la lignée O devenant alors une sous-lignée. En ce qui concerne la région intergénique COI-COII dont il a été question au chapitre 1 D. (p 122), les abeilles de la lignée C possèdent une simple sous-unité Q tandis que les abeilles de la lignée M présentent l'une des 3 combinaisons suivantes : PQ, PQQ ou PQQQ et celles de la lignée A l'une des 3 suivantes : PoQ, PoQQ, PoQQQ (Garnery et al., 1992). C'est grâce à ce polymorphisme de longueur (Hall et Smith, 1991) que l'on a pu montrer que l'abeille africaine avait largement remplacé les abeilles européennes introduites plus tôt dans les régions tropicales d'Amérique latine (Sheppard et al., 1991). Nous y reviendrons plus en détail dans le chapitre suivant. C'est également l'étude de cette région qui a permis, avec un échantillonnage spécialement choisi pour répondre à la question, de montrer que la lignée O était bien une lignée à part entière (Franck et al., 2000). C'est toujours grâce à l'analyse de cette région du génome mitochondrial, chez 738 colonies issues de 64 localités africaines, que Franck et al., ont découvert en 2001 une cinquième lignée d'abeille, appelée Y et correspondant aux abeilles du Nord-Est de l'Afrique, et notamment de l'Ethiopie (Franck et al., 2001). Cette lignée contient en particulier l'abeille *Apis mellifera simensis* (Meixner et al., 2011). Plus proche de nous, l'étude de cette région a montré que les sous-espèces *A. m. caucasica* et *A. m. syriaca* étaient classés à tort au sein de la lignée O. La première a finalement été classé dans la lignée C (Özdil et al., 2009) tandis que la seconde fait désormais partie de la sous-lignée Z incluse dans la lignée A (Alburaki et al., 2011). En 2014, Magnus et al., ont étudié les lignées d'abeilles sauvages des Etats-Unis sur la base du polymorphisme RFLP de la région COI-COII de l'ADNmt (Magnus et al., 2014). Ceci montre que l'ADNmt est loin d'être désuet à l'heure actuelle.

Arias et Sheppard (1996) se sont eux intéressés à une autre région de l'ADN mitochondrial. Il s'agit de celle qui contient le gène de la sous-unité 2 de la NADH déshydrogénase ainsi que le gène codant pour l'ARNt de l'isoleucine. Meixner, quant à lui, a étudié le polymorphisme de digestion de l'ADNmt par les enzymes de restriction *Accl*, *Bc/I*, *Bg/II*, *EcoRI* et *XbaI* chez des abeilles de races *A. m. carnica* et *A. m. ligustica* (Meixner et al., 1993).

## **b. Utilisation des marqueurs microsatellites**

Les marqueurs microsatellites sont des marqueurs moléculaires caractérisés par la répétition en tandem d'un motif de nucléotides, généralement court (entre 1 et 5 nucléotides ; Estoup et al., 1995), par exemple le motif CT. Le nombre de répétitions, qui peut aller jusqu'à 100 (Estoup et al., 1995) est variable d'un individu à l'autre et surtout d'une lignée ou sous-espèce à une autre. C'est ce qui constitue son intérêt. La différence entre 2 allèles réside donc dans la taille. En outre, ils sont neutres et co-dominants (Bertrand, 2013). Chez *A. mellifera*, les microsatellites sont abondants (plus de 500) et présentent une diversité élevée (Estoup et al., 1994). En moyenne pour *Apis mellifera*, il existe un microsatellite (CT)<sub>n</sub> et (GT)<sub>n</sub> tous les 15 kb et 34 kb, respectivement. De la même manière que pour l'ADNmt, l'analyse de microsatellites permet d'assigner une abeille à une sous-espèce et de retomber sur les lignées définies par Ruttner à partir de la morphométrie (Estoup et al., 1995). Les microsatellites sont également tout à fait adaptés au recensement du nombre de lignées paternelles au sein d'une colonie (Estoup et al., 1994). La même étude a d'ailleurs découvert grâce à ces marqueurs qu'il existait une asymétrie importante entre les lignées paternelles des larves à naître et celles des ouvrières préparant un essaimage, mettant ainsi en exergue une plus grande propension à essaimer chez certaines lignées paternelles (Estoup et al., 1994).

L'étude de 6 microsatellites (Miguel et al., 2010) a, en outre, permis de montrer qu'*Apis mellifera iberiensis*, l'abeille espagnole, était très proche d'*Apis mellifera mellifera* et que les deux étaient assez éloignées des abeilles africaines, ce qui contredit l'hypothèse de Ruttner (Ruttner et al., 1978) consistant à dire que l'abeille espagnole était issue d'une différenciation progressive de l'abeille nord-africaine *Apis mellifera intermissa*.

Lorsque l'on compare la variabilité génétique pour un panel de 6 microsatellites entre des abeilles Africaines de la lignée A (issues du Maroc, de Guinée, du Malawi et d'Afrique du Sud) et des abeilles européennes (lignées M et C), il s'avère que la variabilité est plus élevée chez les abeilles africaines, quel que soit le locus choisi (Franck et al., 2001). Ce résultat suggère que



les populations d'abeilles africaines ont des effectifs génétiques plus importants que les populations européennes (Estoup et al., 1995 ; Franck et al., 2001).

### **c. Utilisation des marqueurs SNP**

Le premier séquençage complet de l'abeille en 2006 (Weinstock et al., 2006) a permis d'identifier de nombreux marqueurs SNP (pour Single Nucleotide Polymorphism). Les SNP sont des séquences polymorphes d'un nucléotide. Jusqu'à une date récente, il était couramment admis que l'espèce *Apis mellifera* provenait d'une séparation avec *Apis cerana*, ce qui signifiait donc qu'elle était originaire d'Asie centrale et de l'ouest puis qu'elle s'était étendue vers l'Europe (Ruttner, 1988 ; Sheppard et Meixner, 2003). Dans une étude de 2006 (Whitfield et al. 2006), 1136 SNP ont été analysés pour typer 328 échantillons d'abeilles issus de 14 sous-espèces différentes. Ce typage a révélé 4 groupes de sous-espèces analogues aux 4 lignées évolutives M, A, C et O définies par Ruttner à partir d'analyses morphométriques. Malgré leur proximité géographique, les abeilles de la lignée M sont éloignées de celles de la lignée C et plus proches de la lignée A. Mais surtout, grâce à des calculs de distance basés sur la comparaison des profils de SNP avec ceux observés chez des espèces proches (*A. dorsata*, *A. cerana* et *A. florea*), ils ont découvert que le génotype le plus ancestral appartenait à une abeille africaine et non asiatique ! Ils en ont conclu qu'il avait dû y avoir plusieurs épisodes d'expansion, ayant conduit successivement au rameau M puis aux rameaux C et O, alors que jusqu'alors il était considéré que les rameaux M et O provenaient d'une même migration.

## **D. Comparaison des différentes méthodes**

### **a. ADNmt et Microsatellites**

L'étude conjointe de l'ADN mitochondrial et des marqueurs microsatellites chez l'abeille chypriote *Apis mellifera cypria* a conduit à la découverte d'un profil particulier (Papachristoforou et al., 2013). En effet, cette dernière appartient à la lignée C si l'on se base sur l'ADNmt, tandis qu'elle appartient plutôt à la lignée O si on s'intéresse uniquement aux marqueurs microsatellites. Cette étude confirme ainsi que les 2 méthodes, loin de s'opposer, sont complémentaires (Franck et al., 2001). En effet, les marqueurs mitochondriaux et nucléaires présentent la plupart du temps des différences (Franck et al., 2001) offrant une meilleure compréhension des dynamiques évolutives. Ces différences se comprennent à la lumière de la transmission de chaque support génétique. L'ADN mitochondrial étant transmis par la mère il perdure longtemps au sein d'une ruche car, quelle que soit la larve qui remplace la reine à chaque essaimage, elle présente toujours le même ADN mitochondrial. Cela permet d'établir la lignée maternelle originelle. Les microsatellites sont quant à eux dans le noyau, et sont, pour moitié, hérités des pères. Ils traduisent par conséquent davantage la constitution raciale des populations actuelles.

### **b. Morphométrie standard versus morphométrie géométrique**

Les méthodes morphométriques standard et géométrique ont été appliquées à des populations d'abeilles turques (Koca et Kandemir, 2013) de races *A. m. anatoliaca*, *A. m. meda*, *A. m. caucasica*, *A. m. syriaca* et *A. m. carnica*. Pour la morphométrie standard, 16 caractères ont été mesurés sur l'aile antérieure tandis que 20 points de repères ont été utilisés pour la morphométrie géométrique. Finalement, il s'avère que la méthode géométrique est plus simple et plus efficace (81,5% contre 70,4%) pour réaliser l'identification raciale. On définit l'efficacité comme le taux d'assignations correctes. Un peu plus tôt, Tofilski (2008) considérait que la fiabilité de ces 2 méthodes (standard et géométrique) était équivalente (respectivement 83.8% et 84.9%) pour l'identification d'abeilles de races *A. m. mellifera*, *A. m. carnica* et *A. m. caucasica* à partir uniquement de la venation de l'aile antérieure.

Les 2 méthodes ont même été comparées pour leurs aptitudes à différencier, dans des conditions *in vitro*, une larve d'ouvrière d'une larve de reine (De Souza et al., 2015). Là encore, la morphométrie géométrique apparaît plus efficace.

Francoy (2008) a, quant à lui, évalué les aptitudes respectives de 2 méthodes morphométriques, la méthode géométrique et le logiciel ABIS, pour l'identification d'abeilles « africanisées » (voir chapitre 3). Il rapporte dans les 2 cas une fiabilité élevée (97,8 % contre 98,05%) ainsi qu'une rapidité tout à fait acceptable. La première méthode prend en moyenne 5 min par abeille tandis que la seconde ne demande que 2 minutes.

De manière générale, la morphométrie géométrique est un peu plus fiable que la morphométrie standard mais surtout beaucoup plus rapide, car la mesure manuelle de caractères sur une abeille est très fastidieuse (Tofilski, 2008).

### **c. Méthodes moléculaires versus morphométriques**

En 2010, Miguel et al. (2010) ont utilisé la morphométrie standard, la morphométrie géométrique et l'analyse de l'ADNmt pour identifier des abeilles mélangées des lignées M et A. Ils en concluent que la morphométrie géométrique est plus efficace dans cet objectif que les 2 autres méthodes. Encore plus récemment, une étude a comparé les résultats obtenus avec 3 méthodes d'identification différentes : l'utilisation de 17 marqueurs microsatellites, celle de l'ADNmt COI-COII et l'étude morphométrique du système veineux de l'aile antérieure (Oleksa et Tofilski, 2015). Ces 3 méthodes ont été appliquées à la classification de colonies issues d'une population mixte d'*A. m. mellifera* et d'*A. m. carnica*. Une corrélation élevée entre les 3 méthodes a été obtenue puisque trois quarts des colonies étaient classés dans la même sous-espèce quelle que soit la méthode utilisée tandis que la correspondance montait à 90% entre l'analyse morphométrique et l'analyse microsatellite. Cette étude montre en outre qu'une analyse morphométrique suffit pour détecter un hybride des sous-espèces *A. m. mellifera* et *A. m. carnica*. D'autres études prouvent d'ailleurs qu'un seul caractère morphométrique tel que la ramification du système veineux de l'aile antérieure (Tofilski, 2008) ou encore la forme d'une unique cellule de l'aile (Francoy et al., 2006) suffisent à réaliser une identification.

En revanche, la morphométrie standard devient limitée dès lors qu'il s'agit d'identifier des abeilles métissées. Elle peut même conduire à des erreurs importantes car une abeille peut tout à fait présenter un phénotype très en faveur d'une race sans être de lignée pure voire même en étant assez métissée. Pour des études de phylogéographie, on préférera donc l'utilisation des marqueurs moléculaires et notamment de l'ADN mitochondrial (Avisé et al., 1987) combiné idéalement avec une analyse de marqueurs nucléaires.

En conséquence, nous voyons que les méthodes moléculaires n'ont pas supplanté les méthodes morphométriques. Outre la démocratisation du numérique, l'une des raisons évidentes est que les méthodes morphométriques sont aujourd'hui pratiques et accessibles à moindre coût pour les apiculteurs désireux de connaître la composition raciale de leur cheptel. Ceci n'est pas encore le cas des méthodes moléculaires.

# CHAPITRE 3 : PRINCIPALES SOUS-ESPECES D'APIS MELLIFERA ET LEURS CARACTERISTIQUES

## A. Géographie des sous-espèces d'*Apis mellifera*

Parmi toutes les espèces du genre *Apis*, *Apis mellifera* est sans conteste l'espèce la plus répandue dans le monde car elle est tout simplement la plus intéressante pour l'apiculture. Nous avons vu dans le chapitre précédent que l'une des façons d'opérer la classification des différentes sous-espèces au sein de l'espèce *Apis mellifera* était fondée sur la morphologie des abeilles (Ruttner, 1988 ; Sheppard et al., 1997). Ainsi ces caractères morphométriques ont d'abord permis de distinguer 26 sous-espèces d'*Apis mellifera* (Ruttner, 1988). Aujourd'hui, on en compte 30, la dernière en date étant *Apis mellifera simensis*, une abeille éthiopienne (Meixner et al., 2011). Ces sous-espèces, parfois dénommées « races géographiques » étant donné qu'elles occupent chacune une aire géographique bien définie, sont réparties sur une vaste région qui s'étend sur les continents Africain, Européen et Asiatique. *Apis mellifera* est également présente sur le continent américain mais sa présence n'a rien de naturel car elle a été importée par les colons en 1691 (Sheppard, 1989a, 1989b). Avant la découverte de l'Amérique, les populations indigènes récoltaient toutefois le miel d'abeilles sans aiguillon, appartenant aux genres *Trigona* et *Melipona* (Puerta et al, 1992). L'aire dont il est question plus haut est limitée par la Scandinavie au Nord, le Cap de Bonne Espérance au Sud, le Sénégal à l'Ouest et la chaîne de l'Oural et le sultanat d'Oman à l'Est (Ruttner et al., 1978). L'importante diversité de climats et d'habitats et la sélection naturelle ont façonné ces sous-espèces si bien qu'elles se sont adaptées à leur milieu. Ces sous-espèces ont ainsi été classées dans 5 lignées sur la base de caractères morphologiques, génétiques et géographiques. Ces lignées, ainsi que leurs sous-espèces principales, sont décrites dans les paragraphes suivants. Il va de soi que des sous-espèces appartenant à la même lignée sont plus proches que des sous-espèces de lignée différente.

## B. La lignée M

La lignée M est constituée des abeilles d'Europe occidentale, en l'occurrence des abeilles de l'Espagne à la Scandinavie. C'est dans cette lignée qu'on trouve l'abeille noire française, *Apis mellifera mellifera* ainsi que l'abeille espagnole *A. mellifera iberiensis*. On explique leur séparation par la présence de la chaîne pyrénéenne. D'ailleurs, les chaînes de montagnes, et de manière générale l'isolement géographique, sont considérés comme des barrières efficaces pour les abeilles (Ruttner et al., 2004). De manière surprenante, la lignée évolutive M est génétiquement plus proche de l'abeille africaine (lignée A) que de l'abeille de l'Europe de l'Est (lignées C et O ; *A. m. carnica*, *A. m. ligustica*, *A. m. macedonica*), pourtant géographiquement plus proche (Miguel et al., 2010). Les abeilles de la lignée M sont des abeilles de climat tempéré.

### a. L'abeille noire : *Apis mellifera mellifera*

*Apis mellifera mellifera* (l'abeille noire française) (Ruttner, 1991) est une abeille de grand format dont les derniers segments abdominaux sont bien sombres, ce qui lui vaut son nom. L'abeille noire a un index cubital faible (voir chapitre 2, B. ; 1,70 à 1,80) et une longueur des poils importante (0,46 - 0,50 mm) (Tomassone et Fresnaye, 1971). Cette pilosité lui permet de sortir récolter du pollen par mauvais temps. Elle présente une trompe assez courte (6,3 mm) (Cornuet et al., 1975). Elle est généralement reconnue pour sa grande puissance de travail, son sens de l'odorat, sa longévité et sa bonne capacité de résistance à l'hivernage (Adam, 1980). Cette dernière caractéristique explique pourquoi on la trouve jusqu'en Scandinavie (Jensen et al., 2005) et en Russie.



Photographie 16 : L'abeille noire *Apis mellifera mellifera* (source : Races de Bretagne [en ligne]. Disponible sur : <http://www.races-de-bretagne.fr/qui-sommes-nous/origine-de-la-federation/> (consulté le 18/08/2016))

L'abeille noire est une race d'abeille considérée comme « rustique ». Par contre, elle est aussi réputée caractérielle, voire agressive. Cette agressivité serait liée notamment à son fort métissage. En effet, le métissage est généralement considéré comme une source d'agressivité (Ruttner et al., 2004). Il est également admis que son rythme de ponte est plus faible que d'autres sous-espèces comme par exemple *A. m. ligustica*, *A. m. carnica* ou l'abeille Buckfast, avec un arrêt de ponte plus précoce en automne. Elle serait également moins productive, moins propre et plus sensible aux maladies que les autres sous-espèces (Adam et al., 1980).

Elle est la sous-espèce d'abeille indigène en France et est présente en Europe depuis plus d'un million d'années. Au sein de la lignée M, le niveau de variabilité naturelle est très inférieur à celui observé dans les autres lignées (Garnery et al., 1992 ; Estoup et al., 1995 ; Garnery et al. 1998, Franck et al., 1998).

En France, on distingue certains écotypes d'*A. m. mellifera* bien différenciés (Louveaux et al., 1966), notamment les écotypes Landais, Cévenol et Provençal. Ces écotypes ont également été observés par Tomassone en 1971 (Tomassone et Fresnaye, 1971). Pour l'écotype Landais, on observe par exemple un pic de couvain en août pour correspondre à la récolte de la bruyère callune (*Calluna vulgaris*), très abondante dans ce département, vers fin août/début septembre (Perrier et al., 2003). Inversement, l'écotype Corse montre deux pics de production de couvain au printemps et en automne, avec un creux en été pour éviter d'utiliser inutilement des ressources lorsqu'il fait chaud et sec en été (Ruttner et al., 2004). Et les différences entre écotypes vont jusqu'à des différences morphologiques (Cornuet, 1975), légères, mais suffisamment significatives pour que l'appartenance d'une abeille à tel ou tel écotype soit identifiée par des méthodes morphométriques.

## C. La lignée A

La lignée A contient les sous-espèces de l'Afrique (Franck et al., 2001). Au Nord, dans le Maghreb, on trouve *A. m. major*, *A. m. sahariensis* et *A. m. intermissa*. Au sud du continent Africain, on trouve d'autres sous-espèces telles *A. m. adansonii*, *A. m. monticola*, *A. m. litorea*, *A. m. capensis* ou encore *A. m. scutellata*. A l'Est enfin, il s'agit d'*A. m. lamarckii*, l'abeille égyptienne, et d'*A. m. jemenitica*. Initialement, *A. m. intermissa* et *A. m. sahariensis* étaient rattachées à la lignée M mais grâce à l'analyse de l'ADNmt (Garnery et al., 1992) elles ont été rattachées à la lignée A. La zone d'expansion des abeilles de la lignée A s'étend au nord jusque dans la péninsule ibérique et en Sicile (Franck et al., 2001). Cependant, le niveau « d'africanisation » des abeilles du sud de l'Europe reste très bas (Franck et al., 2001). Par ailleurs, l'abeille du Cap *A. m. capensis* présente une particularité étonnante. En effet, elle est la seule race d'*Apis mellifera* pour laquelle les ouvrières sont capables de produire des filles diploïdes par une reproduction asexuée (Goudie et al., 2012).

### a. L'abeille africaine : *Apis mellifera scutellata*

Des reines d'espèces africaines, *Apis mellifera scutellata* notamment, abeille tropicale originaire de l'Afrique de l'Est, ont été introduites au Brésil en 1956 (Kent et al., 1989) par le biais de 26 colonies (Francoy et al., 2009) dans le but d'améliorer la production de miel (Gonçalves, 2004). Dès lors, elles ont très vite colonisé l'espace tropical, notamment amazonien, où elles se sont hybridées avec les abeilles européennes des lignées M et C, mal adaptées à ces climats, donnant ce que l'on appelle « l'abeille africanisée » (Kerr, 1967). Cette abeille a progressivement remplacé les abeilles européennes (Schneider et al., 2004) de sorte que les colonies actuelles ne présentent plus désormais un ADNmt d'origine européenne, comme c'était le cas en 1968, mais un ADNmt d'origine africaine (Francoy et al., 2009). Partant du centre du Brésil, elles se sont étendues vers l'Argentine au Sud (Kerr et al., 1982) et jusqu'aux Etats-Unis au nord (vanEngelsdorp et Meixner, 2010) où elles sont arrivées en 1991 (Rinderer et al., 1993).





Photographie 17 : L'abeille africaine *Apis mellifera scutellata* (source : Center for Invasive Species and Ecosystem Health [en ligne]. Disponible sur : <http://www.invasive.org/browse/subthumb.cfm?sub=5000> (consulté le 18/08/2016))

Outre le fait qu'elle est particulièrement adaptée à la vie en conditions tropicales, *Apis mellifera scutellata* présente d'autres caractéristiques potentiellement intéressantes pour l'apiculture (Francoy et al., 2009). Elle produit beaucoup de miel, a un comportement hygiénique très développé et une bonne résistance aux maladies du couvain (Francoy et al., 2009). En revanche, elle présente d'autres traits beaucoup moins désirables. D'une part, elle est très essaimeuse (Francoy et al., 2009) mais surtout elle offre un comportement de défense très développé (Goncalves, 1974) avec une agressivité importante, bien supérieure à celle de l'abeille noire. Et cette agressivité est exacerbée pour l'abeille africanisée (Goncalves, 1974), issue de croisement avec des souches européennes, si bien qu'elle fut responsable de mortalités humaines, ce qui lui vaut l'une de ses appellations glaçante qui est « l'abeille tueuse » (Gonçalves et al., 1991). Etant assez proche morphologiquement des abeilles européennes, c'est d'ailleurs à cause de problèmes de piqûres (França et al., 1994) que le processus d'africanisation a été diagnostiqué (Francoy et al., 2008). Et cette agressivité a conduit de nombreux apiculteurs brésiliens à abandonner leurs activités (Gonçalves, 2004). Depuis, ils se sont adaptés à cette abeille et l'apiculture au Brésil s'est grandement développée.

## D. La lignée C

La lignée C contient les sous-espèces de l'aire géographique d'Europe centrale et du sud, zone limitée au sud par la Méditerranée, à l'ouest par les Alpes, à l'est par les Carpates et au nord par l'Autriche et la Hongrie. C'est au sein de ce rameau qu'on trouve les très répandues *A. m. ligustica* et *A. m. carnica*. D'autres races moins connues telles *A. m. cecropia*, *A. m. sicula* ou *A. m. macedonica* appartiennent également à cette lignée. Dernièrement, *Apis mellifera caucasica* a finalement été déplacée de la lignée O à C (Özdil et al., 2009).

### a. L'abeille jaune italienne : *Apis mellifera ligustica*

*Apis mellifera ligustica* Spinola est l'abeille jaune italienne. Elle a un index cubital de 2,30, des poils plus courts qu'*Apis mellifera mellifera* (0,3 mm ; Tomassone et Fresnaye, 1971), une langue moyenne (6,5 mm) et la bande jaune sur le 2ème tergite mesure 1,75 mm de largeur contre seulement 0,35 pour *A. m. carnica* et 0,25 pour *A. m. mellifera*. C'est de cette coloration jaunâtre de l'abdomen que provient son nom et la confusion possible avec les guêpes.



Photographie 18 : L'abeille italienne *Apis mellifera ligustica* (source : COLOSS association [en ligne]. Disponible sur : <http://www.coloss.org/taskforces/beekeeping/apis-mellifera-ligustica/view> (consulté le 19/08/2016))

C'est une abeille appréciée des apiculteurs car elle a un caractère très doux (Franck et al., 2000). Elle est également forte productrice de miel et de couvain (Adam, 1980). Cette dernière caractéristique en fait une abeille idéale pour produire des essaims d'abeille ou de la gelée royale. Elle pond de manière importante jusque tard dans la saison y compris lorsque les réserves de provisions s'amenuisent. En fin de saison, si les conditions climatiques sont défavorables, il devient alors nécessaire de nourrir les colonies pour leur permettre de passer l'hiver. Cette production déraisonnable de couvain fait que ses détracteurs lui offrent parfois le qualificatif peu envieux « d'abeille à viande ». Son odorat est assez développé et sa production de propolis est élevée (Adam, 1980).

Grâce à tous ses traits positifs et sa capacité d'adaptation, elle serait l'abeille la plus répandue dans le monde (Franck et al., 2000). Des importations ont ainsi eu lieu en Israël (Bar-Cohen et al., 1978) et jusqu'en Australie (Oldroyd et al., 1995) et en Amérique du Nord (Woodward, 1993). Mais également en Chine, où elle a été importée entre les années 60 et 80 (Cao et al., 2016) pour optimiser la production de gelée royale. L'étude du polymorphisme de longueur (RFLP) de la région COI-COII de l'ADN mitochondrial des abeilles italiennes a montré qu'une grande partie de ces abeilles étaient en fait des hybrides entre la lignée M et la lignée C (Franck et al., 2000) tandis qu'au sud de l'Italie, les abeilles siciliennes (*Apis mellifera sicula*) présentent des mitotypes de la lignée A.

### **b. L'abeille carniolienne : *Apis mellifera carnica***

*Apis mellifera carnica* Pollmann (l'abeille carniolienne) est la sous-espèce majoritaire en Europe de l'Est, dans une zone limitée au sud par la Grèce, au Nord par l'Allemagne, à l'ouest par la Mer Adriatique et à l'est par la Mer Noire. La Carniole, dont elle tire son nom, est une région historique de la Slovénie.

Il s'agit d'une abeille avec des caractéristiques assez proches d'*Apis mellifera ligustica*. De couleur grise à noire (largeur de la bande jaune sur le 2ème tergite = 0,35 mm), elle est un peu plus grande que l'italienne. Elle a un index cubital de 2,6 et est assez velue (0,6 mm ; Tomassone et Fresnaye, 1971). Sa langue relativement longue (6,6 mm) lui permet de récolter un nombre important de nectars. Elle est également très peu agressive et prolifique (Adam, 1980), avec un développement rapide au printemps. C'est une race d'abeille qui a une bonne capacité à hiverner (Adam, 1980). En effet, c'est une abeille habituée aux conditions de haute montagne, qui est capable de résister à des hivers rigoureux. En revanche, elle est paradoxalement peu résistante aux maladies. Elle est également considérée comme très essaimieuse.



Photographie 19 : L'abeille carniolienne *Apis mellifera carnica* (source : [apis-mellifera-carnica.eu](http://apis-mellifera-carnica.eu) [en ligne]. Disponible sur : [http://apis-mellifera-carnica.eu/gallery/index.php/Authentic-Apis-mellifera-carnica/apis\\_mellifera\\_carnica\\_worker\\_bee](http://apis-mellifera-carnica.eu/gallery/index.php/Authentic-Apis-mellifera-carnica/apis_mellifera_carnica_worker_bee) (consulté le 19/08/2016))

Cette sous-espèce est très répandue en Allemagne. Initialement, l'abeille endémique outre-Rhin était pourtant l'abeille noire mais elle a été progressivement remplacée au profit de la carniolienne, ce qui aboutit d'abord en grande partie à des abeilles métissées issues des deux races (Moritz, 1991). Puis un programme de remplacement de cette abeille hybride par de l'abeille carniolienne pure a été mis en place. Cette dernière a donc été importée massivement il y a quelques dizaines d'années, et a presque remplacé les populations indigènes d'*A. m. mellifera* (Kauhausen-Keller et Keller, 1994). Le même type de processus a eu lieu au Danemark mais avec l'abeille italienne (Jensen et al., 2005). On trouve aussi l'abeille carniolienne dans le nord de la France et un peu partout dans le monde, y compris dans des lieux aussi insolites que l'île de Rodrigues dans l'Océan Indien (Techer et al., 2015) . Elle est, avec *Apis mellifera ligustica*, l'une des 2 abeilles les plus utilisées dans le monde (Pinto et al., 2014).

### **c. L'abeille caucasienne : *Apis mellifera caucasica***

*Apis mellifera caucasica* Gorbatchev (l'abeille caucasienne) est, comme son nom l'indique, originaire des montagnes du Caucase. Cette sous-espèce est assez proche de l'abeille carniolienne, des croisements entre les 2 sous-espèces sont d'ailleurs parfois utilisés en apiculture (Olszewski, 2009). C'est une abeille de couleur grise avec une pilosité moyenne (0,3 mm) et une très longue trompe (> 7 mm ; Tomassone et Fresnaye, 1971) ce qui lui confère la capacité de butiner aisément les fleurs à corolle profonde. Cette abeille est particulièrement réputée pour ses capacités de récolte de propolis (Silici et Kutluca, 2005).

## E. Autres lignées

La lignée O contient les sous-espèces du Caucase, de la Turquie et du Proche-Orient, avec en particulier *A. m. anatoliaca*, *A. m. pomonella*, *A. m. cypria*, *A. m. adami*, *A. m. syriaca*, *A. m. meda* ou encore *A. m. armeniaca* tandis que la lignée Y est constituée par l'espèce *A. m. simensis*.

## F. Les souches synthétiques

### a. L'abeille Buckfast

La Buckfast® est une abeille de souche dite « synthétique », qui a été créée et développée, tout au long de sa vie, par le frère Adam (Adam et Lengvari, 1950), de son vrai nom Karl Kehrle, un moine de l'abbaye de Buckfast (Angleterre), qui a vécu au XX<sup>ème</sup> siècle (1898-1996). Ce dernier s'est attaché, en 70 ans, à créer l'abeille idéale (Adam, 1980), douce, propre et productive et surtout résistante à l'acarien *Acarapis woodi*, parasite de l'abeille qui sévissait grandement au Royaume-Uni à son époque. Il a pour cela importé des abeilles de nombreuses régions du monde. La Buckfast® résulte donc de croisements entre plusieurs sous-espèces avec une forte prééminence de sous-espèces appartenant à la lignée C et notamment l'abeille italienne.



Photographie 20 : L'abeille Buckfast® (source : Buckfast France [en ligne]. Disponible sur : <http://www.buckfast.fr/> (consulté le 27/08/2016))

Ses défauts les plus couramment invoqués sont le fait qu'elle récolte trop de propolis et qu'elle essaime beaucoup. Sa capacité à résister à *Acarapis woodi* se vérifie sur le terrain (Lin et al., 1996). En outre, ses capacités d'hivernage sont tout à fait correctes (Olszewski, 2007). La marque « Buckfast® » a été déposée à l'INPI par le frère Adam en personne le 8 avril 1981. Elle est aujourd'hui la propriété de la SAS BUCKFAST France.

Elle a depuis été introduite en Suisse et au Luxembourg, où elle est désormais majoritaire (Garnery, 2004). Mais aussi en France, en Allemagne, au Danemark, en Israël ou encore aux Etats-Unis (Österlund, 1983). Elle est actuellement très en vogue en Pologne (Olszewski, 2009), pays apicole historique.

En guise de récapitulatif, la répartition géographique des sous-espèces d'*Apis mellifera* en Europe, au Moyen Orient et en Afrique est présenté sur la figure 26.



Figure 26 : Répartition géographique des lignées évolutives et des sous-espèces d'*Apis mellifera* en Europe, au Moyen Orient et en Afrique.

## **G. Structure génétique des populations d'abeilles françaises**

### **a. Une information disparate**

A l'instar de la plupart des espèces, la diversité génétique de la population française d'abeilles domestiques *Apis mellifera* résulte de nombreux facteurs parmi lesquels les migrations naturelles et d'origine anthropique (Franck et al. 2001), l'isolement géographique momentané d'une population, la sélection naturelle adaptative, etc. Caractériser la diversité génétique des populations d'abeilles en France n'est pas une mince affaire. La définition d'une espèce est basée sur un principe fondamental qui est que les individus d'une même espèce sont interféconds donc, *a fortiori*, les individus de différentes sous-espèces le sont également. Il y a donc d'innombrables possibilités de métissage entre les sous-espèces que nous avons vu précédemment, à plus forte raison du fait de la polyandrie et de la capacité des mâles à migrer pour féconder une reine. Il va sans dire que ce métissage peut être d'origine naturelle mais peut également être créé volontairement par l'homme. De manière générale, il n'existe pas en France d'organisme s'intéressant aux proportions de chaque sous-espèce dans chaque cheptel apicole. Comme nous l'avons vu dans le chapitre 4 de la première partie, la moitié des ruches françaises sont détenues par des apiculteurs amateurs qui, la plupart du temps, ne connaissent qu'empiriquement les sous-espèces qu'ils utilisent et qui d'ailleurs n'ont pas de volonté particulière d'exploiter une race pure. La démarche qui consiste à faire des analyses pour connaître la constitution raciale des cheptels n'est donc pas du tout ancrée chez une bonne partie des apiculteurs.

Ainsi donc, seules les études de diversité permettent d'approcher la constitution raciale du cheptel apicole français.



## **b. L'abeille noire prédominante malgré tout**

En raison de ses frontières, la France est entourée de manière naturelle par plusieurs sous-espèces d'abeilles qui sont susceptibles d'échanger des gènes avec l'abeille noire dans les régions limitrophes. On pense notamment à *Apis mellifera ligustica* en Italie et *Apis mellifera carnica* en Allemagne. En réalité, des reines de ces sous-espèces ont très souvent été volontairement importées (Soland-Reckeweg et al., 2009). Des abeilles caucasiennes sont aussi apparues dans les années 80. Et ces importations ne se sont pas taries, au contraire, elles ont été indirectement favorisées par les pertes de colonies qu'ont subi de nombreux apiculteurs. Ces souches ont été importées pour augmenter la productivité mais elles ne sont pas bien adaptées au climat local et aux spécificités florales régionales. Leur développement est par exemple trop précoce au printemps, ce qui oblige les apiculteurs à opérer un nourrissage.

La variabilité génétique et la différenciation entre populations ont été étudiées pour 11 locus microsattellites dans 15 populations d'abeilles d'Europe de l'Ouest (Garnery et al., 1998b). Les populations françaises présentaient une introgression nucléaire variant de quelques % à 57 %. Effectivement, il s'agissait la plupart du temps de gènes provenant de la lignée C, et notamment des races *A. m. ligustica* et *A. m. carnica*. Une étude similaire a été réalisée par la même équipe, la même année mais cette fois avec l'ADNmt (Garnery et al., 1998a). L'analyse des profils de restriction des produits de PCR de la région intergénique COI-COII de l'ADN mitochondrial a été réalisée chez 973 colonies issues de 23 populations d'abeilles d'Europe de l'Ouest. Les haplotypes de la lignée M étaient très largement majoritaires. Divers degrés d'introgression par des haplotypes de lignée C ont néanmoins pu être observés, ces derniers variaient de 0% pour l'abeille de l'île d'Ouessant à 88% pour des abeilles situées à Angers. Sans surprise, les hauts niveaux d'introgression étaient observés pour des colonies appartenant à des apiculteurs professionnels qui avaient auparavant importé massivement des reines de lignée C.

Dans le cadre du Programme Communautaire pour l'Apiculture (Règlement CE n°1221/97), une importante étude de diversité intitulée « Analyse de la biodiversité du cheptel français de l'abeille domestique » a été conduite en 2004 par l'équipe de Lionel Garnery, du Laboratoire CNRS Populations Génétique Evolution de Gif-sur-Yvette (Garnery, 2004). Au cours de celle-ci, des analyses morphométriques et moléculaires ont été réalisées sur des abeilles de la France entière. Ainsi, l'analyse moléculaire, portant sur l'ADN mitochondrial, a concerné 1792 colonies provenant de 13 régions françaises. Finalement, les abeilles dont l'origine maternelle est la race indigène *Apis mellifera mellifera* (abeille noire) restent toujours très majoritaires en France puisque cela concerne 85 % des individus échantillonnés.

Les abeilles des lignées évolutives C et O en représentent ensemble 14,7 %, et celles de la lignée A seulement 0,3 %. Les niveaux d'introgression sont très variables selon les régions. Ainsi, la Franche-Comté (68%), l'Aquitaine (46%), l'Île de France (38%) et la Bourgogne (26%) sont les plus introgressées, tandis que l'Auvergne (0%), le Nord (3%) et la Corse (4%) le sont très peu. Au sein de la lignée M en France, 91 haplotypes mitochondriaux ont été mis en évidence (Rortais et al., 2010). La fréquence de ces haplotypes est très variable mais l'un d'entre eux (M4 et M4') est très majoritaire et représente environ les 3/4 des haplotypes. Il est par contre peu abondant dans la région Nord où l'haplotype M17 est très majoritaire (81%).

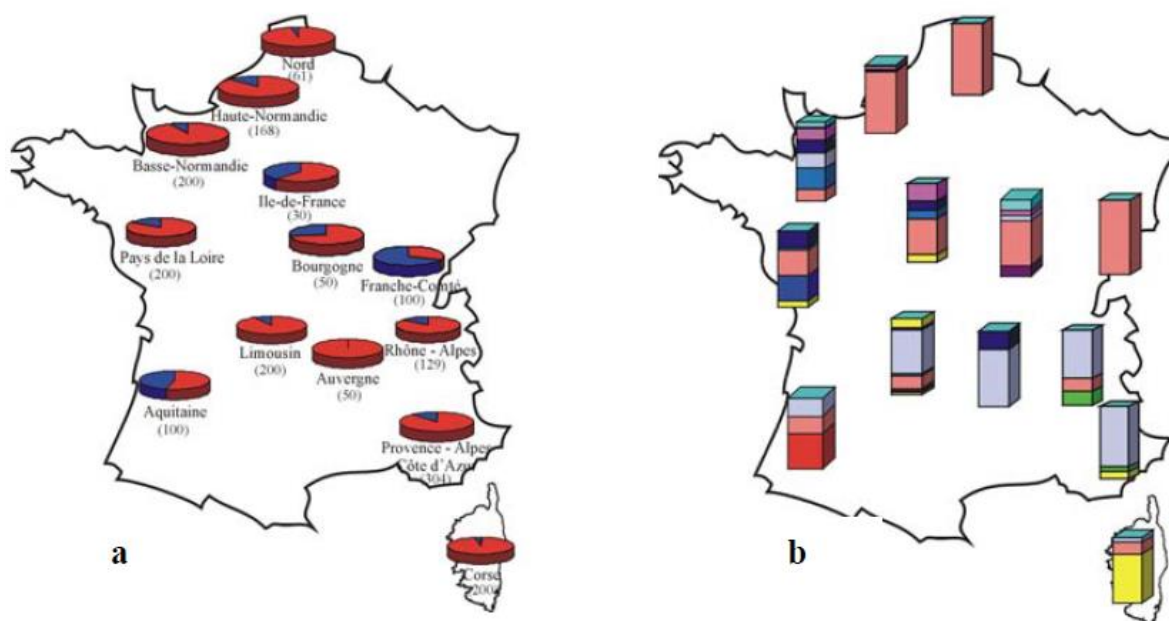


Figure 27 : a. Proportions des différentes lignées mitochondriales (la lignée M est en rouge et les lignées C/O en bleu). b. Répartition des différents haplotypes de la lignée M (représentés chacun par une couleur), (d'après Garnery et al., 2004)

En 2012, l'ITSAP-Institut de l'abeille a réalisé, en coopération avec le réseau COLOSS, une enquête sur les mortalités d'abeilles (Holzmann et al., 2012). A cette occasion, 113 apiculteurs ont répondu par la même occasion sur les souches d'abeilles qu'ils utilisaient. La race d'abeille la plus utilisée est l'abeille noire *Apis mellifera mellifera* (dans 43 % des exploitations). Viennent ensuite la Buckfast (18 %), les hybrides (15 %), et de façon minoritaire *Apis mellifera carnica* (2 %) et *Apis mellifera caucasica* (4 %). 4 % des apiculteurs utilisaient une autre race, et, enfin, 15 % d'entre eux déclaraient ne pas connaître la race d'abeille majoritaire sur leur exploitation.

Au niveau local cette fois, Perrier et al. (2003) ont étudié les introgressions mitochondriales et nucléaires pour des abeilles appartenant à l'écotype des Landes de Gascogne. Le taux d'introgression mitochondriale était de 27,8 % tandis que le taux nucléaire était situé entre 17 et 25%. Il s'agissait ici aussi d'introgressions provenant de la lignée C. Plus récemment, Bertrand et al. (2013) ont analysé la structure génétique des populations d'abeilles de 5 Conservatoires (voir chapitre suivant) en France et en Belgique (Belgique, Cévennes, Ouessant, Savoie, et Vendée) afin de confirmer, justement, leur capacité à être des Conservatoires. Ces derniers sont situés dans des zones de forte apiculture professionnelle, ou dans des zones de contact naturel entre lignées M et C. En excluant celui de l'île d'Ouessant, les conservatoires étudiés présentaient un niveau d'introgression d'au minimum 10%. C'est-à-dire qu'au moins 10% des allèles sont issus d'autres lignées. Cependant, les populations étudiées présentaient toutes plus de 80% d'allèles d'abeille noire, elles constituaient donc un bon point de départ pour s'établir en tant que Conservatoire.

# CHAPITRE 4 : ETAT DES LIEUX DE LA SELECTION APICOLE EN France

## A. De l'intérêt de la sélection en apiculture

### a. Pistes de réflexions pour la mise en place d'une sélection

Comme nous l'avons vu, un prérequis à toute opération de sélection en apiculture est d'être capable de reconnaître les sous-espèces, ce qui n'est pas une sinécure. Nous avons vu les moyens disponibles pour y parvenir. Il s'agira ensuite de prélever et de sauvegarder des souches raciales pures et stables qui seront la base à partir de laquelle pourront être réalisés des travaux de sélection. Ce processus est déjà largement entamé pour l'abeille noire *A. m. mellifera* (voir chapitre B.c.). Il conviendra cependant de conserver la plus grande diversité possible, au-delà des abeilles sauvages, pour puiser sans cesse de quoi améliorer l'abeille d'élevage, éventuellement à travers des croisements raciaux maîtrisés pour bénéficier de l'effet d'hétérosis (Roberts, 1961 ; Cornuet, 1982). Comme nous le verrons plus bas (voir chapitre C.a.), la maîtrise de l'accouplement est une contrainte difficile à gérer en apiculture. Les apiculteurs amateurs sont bien souvent contraints et forcés de subir les essaimages de leurs colonies et de laisser faire la nature quant au vol de fécondation des reines vierges. Cela donne la possibilité à de nombreux mâles sauvages à la génétique inconnue de transmettre leur patrimoine. Néanmoins, l'insémination artificielle des reines est possible (Laidlaw, 1987). En conséquence, on peut tout à fait imaginer que la filière apicole se structure, à terme, à la manière des filières aviaires et porcines. Avec en haut de la pyramide des sélectionneurs qui pilotent exclusivement la génétique, puis des multiplicateurs chargés de la production des reines, et, à la base de la pyramide, les apiculteurs producteurs de miel. La fourniture régulière des apiculteurs en reines fécondées permettrait de s'affranchir du problème de maîtrise de l'accouplement. Car une fois fécondées, les reines deviennent « imperméables » à la présence de mâles sauvages. En cas d'essaimage, il suffirait alors à l'apiculteur d'introduire une reine fécondée du commerce.

Avant d'aborder en détail la sélection en apiculture, il convient de rappeler l'une des caractéristiques majeures de la filière apicole qui est son hétérogénéité. Aussi, contrairement à d'autres filières telle que les filières bovine ou porcine, les travaux de sélection ne font en aucun cas l'objet d'une structuration centralisée. Les choses ont tendance à changer actuellement, sous l'impulsion de l'ITSAP (voir chapitre B. d.) notamment. Voyons maintenant quels peuvent être les critères de sélection en apiculture.

## **b. Héritabilités des caractères chez l'abeille**

Imaginons que l'on demande à un apiculteur de définir l'abeille idéale et les critères qu'il faudrait par conséquent sélectionner. Il réclamerait probablement une abeille qui travaille avec assiduité pour une bonne production, qui essaime peu, qui n'est pas agressive, qui est propre, résiste aux maladies et qui présente une fécondité élevée avec une bonne longévité. Il n'oublierait probablement pas non plus de demander qu'elle soit adaptée à sa situation géographique, qu'il s'agisse du climat ou des espèces florales. Et, en réfléchissant encore, il réclamerait sûrement des caractères plus secondaires dont l'intérêt dépend du type d'apiculteurs : faculté à récolter du pollen, faible ou forte utilisation de la propolis, capacité de se défendre (par exemple contre le frelon), capacité à économiser les réserves de miel, etc. Malheureusement, une telle abeille n'existe pas et n'existera peut-être jamais car il est probable qu'à la manière de ce que l'on observe chez d'autres espèces de rente, des antagonismes existent entre certains caractères. Cependant, aucune étude d'envergure ne l'a encore démontré.

Pour pouvoir espérer améliorer efficacement un caractère, il faut que celui-ci soit héritable (Visscher et al., 2008). En génétique, on définit une performance  $P$  comme la somme d'un effet génétique  $G$  (lui-même décomposé en  $A$ , valeur génétique additive (somme des effets moyens des gènes), et  $D$ , valeur génétique de dominance, due à l'interaction entre gènes présents aux même loci) et d'un effet environnemental  $E$ . L'héritabilité, notée  $h^2$ , est la part de variation des performances mesurées  $P$  qui est due aux variations des valeurs de génétique additives  $A$  entre les individus d'une population. Autrement dit, un caractère héritable est un caractère dont la variabilité dépend suffisamment des gènes pour qu'on puisse espérer l'améliorer par sélection. Chez l'abeille, en raison du mode d'organisation de la société, la performance pour la plupart des caractères économiques résulte de la somme d'une contribution de la reine et d'une contribution moyenne des ouvrières (Bienefeld et Pirchner, 1990). Et l'héritabilité de ces caractères est différente pour les 2 castes. Par conséquent, sauf si la différence entre les 2 est trop importante, nous donnerons essentiellement un ordre de grandeur, pour lequel la précision de l'estimation n'est d'ailleurs jamais précisée. Il faut toutefois noter que des corrélations génétiques fortement négatives existent entre les caractères mesurés chez la reine et les caractères mesurés chez les ouvrières (Bienefeld et Pirchner, 1990). Par exemple, cette corrélation est de - 0,88 pour la production de miel (Bienefeld, Pirchner 1990). Cette relation génétique négative constitue un obstacle pour sélectionner efficacement.

Les caractères morphologiques sont globalement très héréditaires (Poklukar et Kezic, 1994). Par exemple, la longueur des ailes a une héréditabilité  $h^2$  de 0,66, la largeur des ailes 0,85, l'index cubital 0,79 et la longueur de la langue 0,85. Mais ces caractères sont peu intéressants pour l'apiculteur. Le caractère « production de miel » a une héréditabilité assez variable selon les études. Certains auteurs ont montré qu'elle était située entre 0,2 et 0,3 seulement (Bienefeld et Pirchner, 1990) tandis que d'autres donnent une valeur de 0,76 (Jevtic et al., 2012). Finalement, Rinderer et al. (Rinderer 2013) la situe entre 0,23 et 0,75, ce qui, dans tous les cas, rend l'amélioration de ce caractère par sélection possible. Pour la production de cire, elle est proche de 0,4. Etant donné qu'il ne s'agit pas réellement, pour le miel, d'une production mais davantage d'une récolte, il est logique que ce caractère soit très dépendant de l'environnement, incluant les pratiques de l'apiculteur. En ce qui concerne les caractères liés à la résistance aux maladies et notamment au varroa, ils présentent des héréditabilités relativement élevées (Harbo et Harris, 1999), ce qui a ouvert des perspectives quant à leur sélection (voir chapitre C. d.). Ainsi, l'héréditabilité de la durée de la période operculée est de 0,89, tandis que celle du caractère qui permet à l'abeille de contenir la reproduction de l'acarien (SMR pour *Suppressed mite reproduction*; Harbo et Harris, 2005) est de 0,46. Par ailleurs, le caractère « comportement hygiénique », intimement lié à la capacité de résistance au varroa, est lui aussi très héréditaire (0,65; Harbo et Harris, 1999), et donc potentiellement sélectionnable. Le comportement hygiénique des abeilles consiste en la détection et le rejet hors de la ruche des animaux morts ou du couvain malade (Bigio et al., 2014). Il s'agit d'un caractère gouverné en partie par 7 QTLs dont chacun contrôle entre 9 et 15% de la variance phénotypique (Lapidge et al., 2002). Il est très important car il constitue le premier moyen de défense contre les maladies et parasites : c'est une forme d'immunité sociale (Schöning et al., 2012). Dans le cadre d'un accouplement multiple de la reine, une partie seulement des mâles sont issus de ruches « hygiéniques ». Cela ne pose pas de problème en soi car il suffit qu'une fraction des ouvrières aient ce comportement pour qu'il soit efficace (Arathi et al., 2000). Une étude a montré que le niveau d'hygiène d'une colonie dont la reine est fécondée naturellement par des mâles environnants est très proche de celui d'une colonie dont la reine a été fécondée de manière artificielle avec des mâles issus uniquement de ruches hygiéniques ... à la condition toutefois que la reine soit issue d'une colonie « hygiénique » (Bigio et al., 2014). Par conséquent, le maintien de ce caractère n'est pas absolument dépendant d'une insémination artificielle de la reine. Ceci pourrait permettre aux apiculteurs de bénéficier de ce caractère, même dans le cadre d'accouplements non maîtrisés.

En ce qui concerne les traits de comportement, ils sont plutôt héritable eux aussi. L'agressivité a une hérabilité de 0,4 tandis que celle du caractère « calme à l'ouverture de la ruche » varie beaucoup entre la reine et les ouvrières (0,58 contre 0,91) (Bienefeld et Pirchner, 1990). Enfin, l'hérabilité du comportement de défense est située entre 0,3 et 0,6 (Moritz et al., 1987) et celle de l'aptitude à se développer au printemps est entre 0,5 et 0,8. Finalement, à bien des égards, la professionnalisation de la filière et la maîtrise de la génétique sont déjà en cours. Intéressons-nous aux acteurs principaux de ce processus.

## **B. Principaux acteurs de la sélection en France**

### **a. Les producteurs de reines**

Par leur rôle au sein de la filière qui est quasi-exclusivement d'élever des reines vierges ou prêtes à pondre en vue d'une commercialisation, on comprend aisément que ces apiculteurs ont une influence majeure sur la composition génétique des cheptels apicoles français. Ils sont quantitativement peu nombreux et leur chiffre d'affaire global ne représente même pas 1% du chiffre d'affaire total de la filière (voir Partie I, chapitre D, d.) mais les abeilles issues de leurs ruchers, et donc de leur sélection sont comparativement nombreuses, *a fortiori* avec les fortes mortalités qui touchent les apiculteurs. Ces apiculteurs à l'activité atypique sont regroupés au sein de l'association loi 1901 ANERCEA (Association nationale des éleveurs de reines et des centres d'élevages apicoles). Cette dernière a été créée en 1979 et comptait 640 membres en 2015 (source : site officiel de l'ANERCEA).

Peu de statistiques existent en France sur le nombre de reines vendues ou sur le nombre de colonies issues de reines achetées. Par contre, Aux Etats-Unis, près d'un million de reines sont fournies annuellement aux 2,4 millions de colonies à travers le pays (Cobey et al., 2012), ce qui est colossal. Pour plus de détails sur l'élevage des reines, un excellent article très complet a été publié récemment sur le sujet (Büchler et al., 2013).

### **b. Les producteurs de gelée royale**

Au-delà des producteurs de reines, il existe un autre type d'apiculteurs opérant un rôle non négligeable dans la sélection en apiculture. Il s'agit des producteurs de gelée royale, dont 80% (soit 90 adhérents) sont regroupés au sein d'une structure couramment désignée par son acronyme, GPGR, pour Groupement des Producteurs de Gelée Royale. Il s'agit d'une association relativement récente puisqu'elle a été créée en 1995 seulement, en réponse notamment à la concurrence déloyale due aux importations massives et de qualité douteuse en provenance de Chine et de Thaïlande. A cette époque, ces dernières étaient de l'ordre de 100 tonnes pour une production nationale de moins de 300 kg. Cette association vise à faire la promotion de la gelée royale française et à aider à l'installation et la spécialisation d'apiculteurs dans cette activité. A ce titre, elle constitue un support technique soucieux de développer des améliorations pour la production ou la vente de gelée royale en France. En outre, l'association est fortement intégrée, via des travaux délégués ou des participations à des commissions dans les instances qui gèrent le développement de la filière apicole dans son ensemble.



En raison de la spécificité de leur production qui demande rigueur et expertise, il s'agit d'une catégorie d'apiculteurs qui, en plus d'une grande maîtrise technique, possède des connaissances théoriques élevées, en particulier sur la physiologie de l'abeille. D'autre part, la féroce concurrence à laquelle ils font face et la particularité de leur produit en font des consommateurs de génétique et des acteurs spécialement impliqués dans l'amélioration génétique de l'abeille.

Ainsi, il existe une commission « sélection » au sein du GPGR. Celle-ci est dédiée à la gestion du plan de sélection dont l'objectif est d'obtenir des abeilles fortes productrices de gelée royale et bonnes éleveuses mais également douces et résistantes aux maladies. Dans cette optique, le groupement possède 5 ruchers jouant le rôle de pôles génétiques et répartis sur plusieurs régions de France. Les reines issues de ces ruchers sont ensuite testées par des adhérents du groupement impliqués dans le plan de sélection. Ce réseau de testage est national.

Les membres du GPGR et de l'ANERCEA se côtoient régulièrement, par exemple dans la Commission technique Sélection et Elevage de l'ITSAP.

### **c. Les Conservatoires de l'abeille noire**

Dans le but de préserver la diversité génétique de certaines populations d'abeilles noires bien adaptées localement à des conditions climatiques et à des espèces végétales particulières (écotypes), et plus généralement de préserver cette sous-espèce, des associations régionales d'apiculteurs ont entrepris la création de conservatoires de l'Abeille noire. En effet, l'abeille noire française *Apis mellifera mellifera* est particulièrement menacée par l'importation d'abeilles étrangères (Pinto et al., 2014) à travers l'introduction de reines notamment, ce qui conduit à des hybridations. La transhumance des colonies peut parfois conduire au même résultat. Or, l'hybridation entre une sous-espèce locale et une importée peut engendrer l'extinction de l'espèce locale (Perry et al., 2002). Des adaptations à l'environnement résultant de milliers d'années de sélection naturelle sont alors perdues par la même occasion. De telles structures ont été créés dans plusieurs régions de France : Savoie, Cévennes, Pyrénées ariégeoises, Provence (île de Porquerolles), Corse, Belle-Île mais aussi sur l'île d'Ouessant. Certaines abeilles utilisées dans la partie expérimentale (voir partie 3) proviennent d'ailleurs de ce dernier site. Par son isolement géographique, l'île d'Ouessant constitue un territoire idéal pour élever une lignée pure d'abeille noire. Par ailleurs, cet isolement est complété par d'autres mesures : des mesures législatives tel qu'un arrêté municipal interdisant l'introduction de colonies sans autorisation du Conservatoire et des mesures de « biosécurité » puisque chaque nouvelle souche introduite sur l'île est testée par des méthodes morphométriques et/ou

moléculaires pour s'assurer de sa pureté. L'apport de nouvelle génétique reste néanmoins indispensable pour lutter contre la consanguinité. Ainsi, les abeilles noires de l'île d'Ouessant sont généralement considérées comme les abeilles les plus pures de la sous-espèce *Apis mellifera mellifera*. En outre, des conservatoires de la sorte ont également été créés à l'étranger, par exemple en Norvège (Flekkefjord) ou au Danemark (île de Læsø) (Bertrand, 2013). En France, ils sont la plupart du temps inclus dans des parcs régionaux ou nationaux.

Il existe depuis les années 80 une association internationale qui regroupe toutes les associations régionales ou nationales. Elle s'appelle la SICAMM (*Societas Internationalis pro Conservatione Apis melliferae melliferae*) et vise à la préservation, la protection et la restauration de l'abeille noire. En Europe du Nord, une étude a montré que les introgressions d'abeilles étrangères étaient inférieures dans les populations d'abeille protégées (Pinto et al., 2014), ce qui signifie que les efforts de conservation portent leurs fruits. Les Conservatoires de l'abeille noire ne sont pas simplement des structures de protection agissant tel un réservoir de génétique, mais aussi des structures de valorisation. Ainsi, les Conservatoires possèdent généralement à proximité un rucher destiné à la sélection avec pratique de l'insémination artificielle et vente de reines performantes prêtes à pondre. Il faut comprendre toutefois que la préservation de races pures n'exclut pas pour autant la possibilité de créer des hybrides de qualité, justement grâce à la pureté des souches parentales. La mise en place d'un conservatoire de l'abeille noire obéit à un cahier des charges qui oriente le travail réalisé, décrit les études préliminaires nécessaires et la méthodologie de mise en place de la structure. L'une des conditions préliminaires est l'existence d'un niveau d'introgression le plus faible possible en provenance des lignées C, O ou A. La mise en place d'un conservatoire est envisageable si la zone est suffisamment pure, c'est-à-dire si au moins 90% des abeilles sont classées dans la lignée M. Au-delà de l'abeille noire, la biodiversité des races et écotypes de l'espèce *Apis mellifera* constitue une richesse fruit d'un processus long et continu d'adaptation à des milieux variés. Cette diversité est un capital de grande valeur qu'il convient de préserver en vue d'une sélection future, notamment en réponse aux évolutions écologiques et sociétales.

#### **d. L'ITSAP**

Pour finir, comment parler de sélection en apiculture et de génétique sans parler de l'ITSAP (Institut Technique et Scientifique de l'Apiculture et de la Pollinisation) parfois appelé « Institut de l'abeille ». Ce dernier, localisé en Avignon, constitue un pôle d'expertise technique et scientifique majeur en France. Outre les nombreuses équipes de recherche dédiée à l'abeille, l'institut est très impliqué dans la communication autour de l'abeille mais aussi dans la

formation. Il coordonne au niveau national les travaux de recherche conduits en apiculture, notamment ceux de l'INRA d'Avignon, et fédère les associations régionales de développement apicole (ADA). Son spectre d'action sur l'abeille est donc bien loin de se résumer à la génétique et la sélection. Mais néanmoins, l'amélioration du cheptel apicole français constitue l'une de ses missions principales. Ainsi, l'ITSAP accompagne la structuration de la sélection et coordonne le développement et la mise en place des nouveaux outils et méthodes issus des travaux de recherche. En 2014, une station de testage a été développée, elle vise à tester les protocoles de contrôle de performances et à évaluer, en conditions contrôlées, les colonies sélectionnées par la filière et celles de n'importe quel sélectionneur français désireux d'y recourir. Cependant, les reines sur lesquelles un contrôle de performances est réalisé doivent obligatoirement avoir une généalogie connue, au moins pour la voie maternelle. Les critères suivants peuvent être évalués sur les reines : production, douceur, essaimage, tenue au cadre, comportement hygiénique, évolution de la population de *Varroa*, hivernage, autonomie alimentaire, dynamique de printemps. L'évaluation de ces critères est faite selon les méthodes standardisées produites par BeeBook (Dietemann et al., 2013a).

Il sera de nouveau question de l'ITSAP dans la partie expérimentale (partie 3).

## **C. Limites et perspectives**

### **a. La maîtrise de l'accouplement**

En raison de sa biologie et de son mode de reproduction, l'abeille constitue un animal plus difficile à élever et sélectionner que les espèces de rente habituelles (Pérez-Sato et al., 2009). En particulier, la maîtrise de l'accouplement est un frein considérable. Pour pallier à cela, l'une des pistes explorée est l'insémination artificielle. L'abeille étant l'un des rares insectes pour lequel elle a été développée (Laidlaw et Page, 1997 ; Baer et Schmid-Hempel, 2005). Elle présente des applications potentielles en recherche mais également en apiculture car elle permet de contrôler totalement l'accouplement et donc la génétique de la colonie. Cet intérêt est d'autant plus grand que, contrairement à des idées reçues, elle n'est pas délétère pour les performances de ponte de la reine. En effet, une reine inséminée a les mêmes performances qu'une reine naturellement fécondée (Cobey, 2007). Néanmoins, son caractère technique fait qu'elle ne s'est pas encore démocratisée au sein de la filière apicole (Bigio et al., 2014). Pour davantage de précisions, sur la technique notamment, un article de synthèse exhaustif existe à ce sujet (Cobey et al., 2013).

### **b. Des critères de sélection divergents**

Comme nous l'avons vu à maintes reprises, la filière apicole est particulièrement hétérogène. La mise en place d'une sélection en apiculture aboutira donc nécessairement à la création de plusieurs profils d'abeilles. Car les caractéristiques que recherchent les apiculteurs dépendent de leur type d'activité. Par exemple, un apiculteur dont le revenu est assuré par la vente de reines recherchera, quelle que soit la race choisie, une forte fécondité et une abeille qui élève un couvain massif le plus longtemps possible au cours de l'année. A l'inverse, un apiculteur professionnel qui vit de la vente de miel cherchera une abeille qui maximise la production de miel avec le minimum d'abeilles. Car élever beaucoup de couvain engendre une forte consommation de miel. Un apiculteur amateur cherchera lui une abeille rustique qui possède une bonne longévité là où un professionnel ne verra aucun inconvénient à remplacer ses reines tous les ans ou tous les 2 ans si cela lui permet de produire davantage. De manière générale, les caractères liés au rendement seront plébiscités par les professionnels de la filière tandis que les amateurs chercheront davantage la facilité d'élevage. Ces spécificités rendent compte une fois de plus de la nécessité de préserver toutes les races et tous les écotypes d'abeilles pour que chaque apiculteur trouve l'abeille qui correspond à ses objectifs.

### **c. L'absence de contrôle de performance**

Que l'on souhaite mettre en place une sélection sur performances et généalogies avec calcul d'index, une sélection assistée par marqueurs ou une sélection génomique, il existe un prérequis impérieux qui est l'obtention rigoureuse, dans des conditions maîtrisées et standardisées, de données de contrôles de performances. Or, il s'agit là d'un des principaux facteurs limitant pour le développement de la sélection en apiculture. En effet, malgré les initiatives telles que la mise en place d'une station de testage et de contrôle de performances par l'ITSAP, l'acquisition de données reste balbutiante à ce jour et son intérêt globalement méconnu par les apiculteurs. Assez récemment, une source éventuelle de progrès a vu le jour avec la mise au point d'une évaluation génétique basée sur la méthodologie « BLUP – modèle animal » adaptée pour tenir compte des particularités de la génétique et de la reproduction de l'abeille (Bienefeld et al., 2007, 2008). Ce modèle estime des valeurs pour les effets « reine » et « ouvrières » et prend en compte les effets dus à l'environnement. Il est pour l'instant destiné aux races italienne, noire, carniolienne et sicilienne. Sa création a donné lieu à la naissance d'une base de données centralisée, située en Allemagne, et disponible à l'adresse suivante : <http://www.beebreed.eu>. Mais l'intérêt de cette évaluation génétique est nul tant qu'il n'existe pas un socle solide de données de contrôle de performance à valoriser. La mise en place d'un tel contrôle reste donc actuellement l'un des points sur lequel il reste le plus de travail à réaliser.

### **d. La sélection de la résistance au Varroa**

Comme nous l'avons vu dans la première partie, les infestations par l'acarien *Varroa destructor* sont une cause majeure du déclin des colonies d'abeilles dans le monde et particulièrement en Europe, que cela soit pour les colonies d'abeilles sauvages ou domestiques (Rosenkranz et al., 2010). Ce dernier cause des dommages directs, par son action de parasite, et indirects, en favorisant notamment le développement de virus (Sumpter et Martin, 2004). Avant l'émergence et l'extension d'un clone de l'acarien en Europe (Solignac et al., 2005), les programmes de sélection faisaient surtout la part belle aux caractères de production et de comportement, tandis que les caractères de résistance aux maladies pouvaient être ignorés et compensés par des moyens chimiques (Büchler et al., 2010). Mais désormais, l'utilisation régulière de traitements chimiques a conduit, outre l'augmentation des coûts et du travail supplémentaire, à la sélection de varroas résistants aux acaricides (Martin et al., 2002 ; Kamler et al., 2016). Rajoutons également que cette utilisation systématique de traitements pose des problèmes de résidus dans les produits de la ruche (Lodesani et al., 1992).

Il se trouve que la sélection naturelle, dont font l'objet les colonies d'abeilles sauvages et certaines colonies domestiques, a fait émerger des caractères de résistance à ce parasite (Büchler et al., 2010). Naturellement, la recherche s'est intéressée à ce phénomène et, depuis les années 1980, il continue de recevoir une attention particulière. On définit la résistance au varroa comme l'aptitude pour une colonie à survivre sans traitements thérapeutiques. On parle de colonie VSB (pour *Varroa Surviving Bee*). Les premières colonies de ce type ont été découvertes en 1994 dans la Sarthe (Büchler et al., 2010). Des colonies issues de ces premières souches ont été observées sur des années et sans intervention chimique. Elles se sont ainsi reproduites de manière naturelle par essaimage et élevage d'une nouvelle reine. En moyenne, elles sont parvenues à survivre près de 8 ans, certaines allant jusqu'à 15 ans (Le Conte et al., 2007). Le nombre de parasites collectés était trois fois inférieur dans les colonies VSB par rapport aux colonies « témoins » qui recevaient un traitement, ce qui montre que les colonies VSB résistent au varroa par l'aptitude à inhiber la croissance de sa population (Le Conte et al., 2007). Trois QTL liés à cette caractéristique ont été découverts (Behrens et al., 2011). Cette aptitude s'accompagne d'autres attributs. Les colonies VSB sont d'une part plus aptes à reconnaître l'acarien que des colonies standards (Martin et al., 2002). D'autre part, elles présentent un comportement hygiénique supérieur avec notamment une meilleure capacité à extraire des cellules les pupes infestées par le parasite (Spivak et Reuter, 2001). Ce comportement est associé significativement avec la présence de 6 marqueurs SNP dans le génome (Spötter et al., 2016). Le comportement de nettoyage entre abeilles, ou épouillage, est également prépondérant pour se débarrasser des varroas fixés (Boecking et Spivak, 1999 ; Arechavaleta-Velasco et al., 2012). Mais ce caractère est par contre peu héritable ( $< 0,15$  ; Ehrhardt et al., 2007). L'analyse de l'expression génétique chez les colonies VSB montre une surexpression des gènes liés à la réponse aux stimuli olfactifs (Navajas et al., 2008) ce qui dénote une réponse comportementale différente. De plus, les colonies VSB sont particulièrement essaimeuses, ce pourrait constituer un obstacle pour le développement du varroa (Fries et al., 2003). Comme nous l'avons déjà vu, les caractères liés à la résistance au varroa, hormis le nettoyage, ont une héritabilité assez élevée (Harbo et Harris, 1999 ; Harbo et Harris, 2005), ce qui permet d'envisager de les sélectionner.

L'obtention de colonies résistantes s'est faite via un processus appelé Bond test (Kefuss et al., 2009) car le principe était le suivant : « vivre et laisser mourir » ! Il s'agissait simplement de laisser une pression de sélection s'appliquer en ne réalisant aucun traitement. Cette approche s'est révélée efficace, par exemple en France (Kefuss et al., 2004) ou encore en Suède (Fries et al., 2006). Par ailleurs, l'abeille syrienne *Apis mellifera syriaca* est particulièrement résistante

au varroa (Kence et al., 2013) et de nombreux gènes responsables ont été récemment identifiés (Haddad et al., 2015).

Désormais, la résistance au varroa est un critère de sélection pertinent, régulièrement inclus dans les programmes de sélection sur l'abeille qui sont en cours en Europe (Büchler et al., 2010). Mais ces programmes de sélection sont nombreux, non coordonnés et souvent l'œuvre d'associations d'apiculteurs. Nous pouvons citer le programme Carnica AGT, l'élevage d'abeilles croisées Buckfast-Primorsky, l'élevage Buckfast-Brandenburg, l'abeille Elgon ou encore les travaux de sélection de John Kefuss. Une fondation appelée Arista Bee Research a vu le jour il y a quelques années en vue de coordonner tous ces travaux. Il semble tout de même que ces derniers portent leurs fruits, car des colonies issues de ces programmes survivent significativement plus longtemps que des colonies non sélectionnées sur ce caractère (Büchler et al., 2002). La sélection de la résistance au varroa est aussi un sujet majeur aux Etats-Unis (Rinderer et al., 2010) où des colonies naturellement résistantes ont également été découvertes (Seeley, 2007) et où elles sont plébiscitées (Kim et Gillespie, 2010 ; De Guzman et al., 2007). Il convient toutefois de noter que les mécanismes de résistance, notamment moléculaire et génétique, sont encore assez flous à ce stade. Mais de nouvelles découvertes sont régulièrement révélées (Danka et al., 2013).

Ainsi se termine cette seconde partie où il fut question dans un premier temps des particularités génétiques de l'abeille, puis des sous-espèces d'*Apis mellifera*, des moyens de les reconnaître, de leurs caractéristiques et de leur répartition géographique, et enfin de la sélection en apiculture. Dans la troisième et dernière partie, qui est le fruit d'un travail expérimental réalisée à l'INRA d'Auzeville (UMR GENPHYSE), nous allons nous intéresser plus en détail à l'une des particularités génétiques de l'abeille qui est la détermination du sexe avec l'implication du locus *csd*.







***PARTIE III :***

***PARTIE EXPERIMENTALE : ETUDE DU  
LOCUS CSD SUR UN ECHANTILLON  
REPRESENTATIF D'ABEILLES DU PROJET  
SeqApiPop***



# CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

## A. La détermination sexuelle chez *A. mellifera*

### a. L'haplodiploïdie

La détermination sexuelle est un processus essentiel de la vie. Elle est responsable de nombreux caractères comportementaux et morphologiques. Naturellement, lorsque l'on évoque le sujet, nous sommes vite amenés à penser aux différences entre hommes et femmes, ou entre mâles et femelles pour les espèces d'oiseaux ou de mammifères domestiques que nous élevons ou que nous côtoyons, qui pratiquent la reproduction sexuée et pour lesquelles des chromosomes sexuels sont présents et la diploïdie de rigueur. Pourtant, environ 20% du règne animal est composé d'espèces haplo-diploïdes, telle *Apis mellifera* et l'ensemble des espèces d'hyménoptères (Bull et al., 1983). Pour l'abeille, on parle précisément de parthénogénèse arrhénotoque. Ce mode de reproduction est connu depuis longtemps, en particulier chez l'abeille. Cette hypothèse a été émise pour la première fois en 1845 (Dzierzon, 1845), bien avant la découverte de l'ADN et des chromosomes.

Chez *A. mellifera*, une partie des oeuf pondus par la reine, mère de la colonie, sont non fécondés. Les oeufs non fécondés reçoivent la moitié des chromosomes de leur mère, et aucun de leur père. Ils sont donc haploïdes (hémizygotes quel que soit le gène) et mâles. Si, par contre, la fécondation a lieu, la reine pondra des œufs diploïdes devenant des femelles ... sauf cas particulier ...

En réalité, ce n'est pas directement la fécondation ou non de l'œuf, et donc le nombre de paires de chromosomes, qui décide du sexe, mais la composition allélique au locus *csd*, et plus exactement le nombre de versions différentes de la protéine issue de *csd*. Ce locus multi-allélique de détermination du sexe, appelé *csd* pour *complementary sex determiner* (Cook, 1993 ; Heimpel et de Boer, 2008), a été mis en évidence chez les hyménoptères. Il a d'abord été découvert chez le genre *Habrobracon* (Whiting, 1943), puis confirmé peu après chez *Apis mellifera* (Mackensen, 1951). Les individus haploïdes sont « hémizygotes » à ce locus. Ils ne synthétisent qu'un seul type de protéine à partir de leur unique allèle *csd* et sont mâles. Les individus diploïdes hétérozygotes au locus synthétisent, eux, 2 versions différentes de la protéine, et sont des femelles. Chez les homozygotes porteurs de 2 allèles identiques au locus *csd*, la synthèse d'un seul type de protéine conduit à la naissance non pas de femelles mais de

mâles diploïdes. Ces derniers sont toutefois inaptes à se reproduire, ce qui n'a pas réellement d'importance étant donné qu'ils sont dévorés par les ouvrières avant même leur naissance (Woyke, 1963), en tout cas chez *Apis mellifera*. En effet, chez d'autres espèces d'hyménoptères, les mâles diploïdes ne sont pas stériles, mais leur descendance l'est (Oishi et al., 1993 ; Krieger et al., 1999 ; Ayabe et al., 2004 ; Liebert et al., 2004).

## b. Structure du gène *csd*

Depuis sa découverte, le locus *csd* a fait l'objet de plusieurs travaux de recherche, en particulier d'une équipe allemande (Hasselmann, Beye, Biewer, Gempe et al.). Les lignes qui suivent en font une synthèse, nécessaire à la compréhension de nos travaux.

### i. Localisation chromosomique

Le locus *csd* est situé sur le chromosome 3 de l'abeille. Pour rappel, l'abeille possède 16 chromosomes, ou paires chromosomiques, différents (2 x 16 chromosomes chez les femelles, 1 x 16 chromosomes chez les mâles).

### ii. Région génomique de *csd*

La figure 28 présente la région génomique du locus *csd*, à plusieurs échelles. Sont représentées notamment la carte génétique de la région et la carte issue de la digestion par l'enzyme de restriction EcoRI (partie A, figure 28).

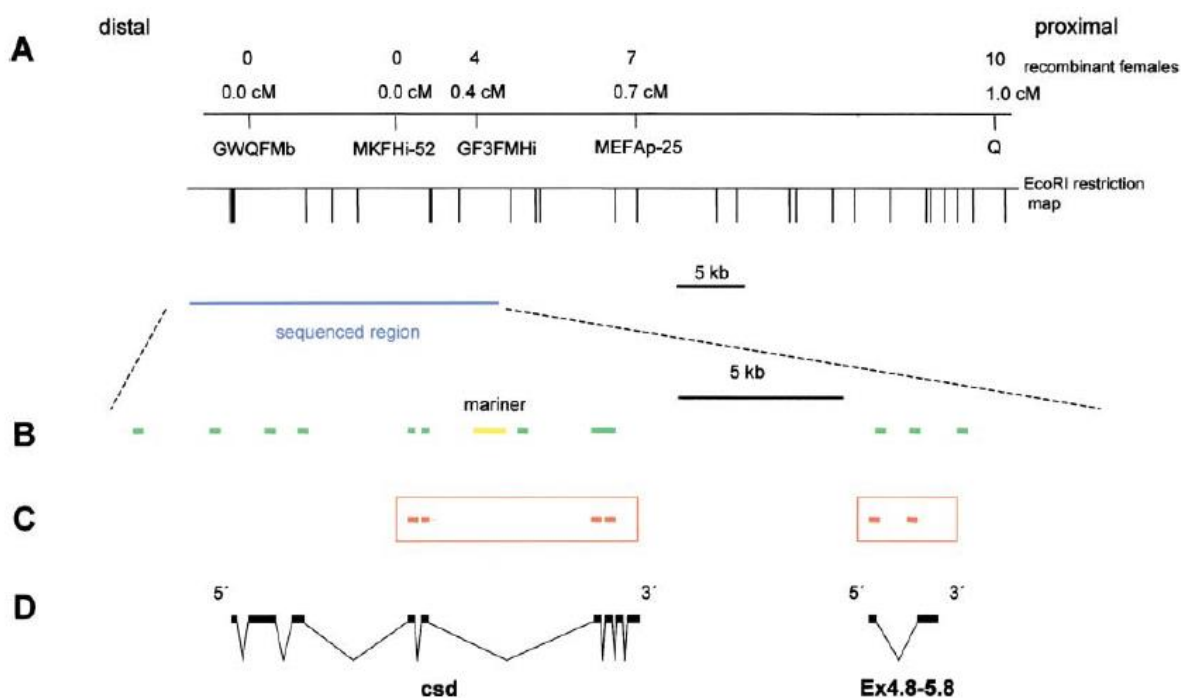


Figure 28 : Région génomique du locus *csd* (d'après Beye et al., 2003)

La carte génétique indique les positions relatives, les uns par rapport aux autres, de marqueurs polymorphes. La distance entre 2 marqueurs est exprimée en cM, et est une fonction de la fréquence de recombinaison entre ces 2 marqueurs au cours de la méiose. L'étude de ces différentes cartes a permis de situer le locus *csd*. Ce dernier figure à proximité des marqueurs GWQFMb et MKFHi-52, distants de 13 kb. Finalement, *csd* est une séquence d'ADN d'environ 9300 paires de bases (9279 bp dans Beye et al., 2003), possédant 9 régions codantes ou exons (partie D, figure 28). En raison de la taille des introns les séparant, ces exons sont parfois regroupés en 3 régions (Wang et al., 2012) : exons 1-2-3 (région 1), exons 4-5 (région 2) et exons 6-7-8-9 (région 3), respectivement. Les séquences codantes représentent un total d'environ 1400 paires de bases (1453 bp dans Beye et al., 2003) pour une protéine d'environ 400 acides aminés. Ces informations sont résumées sur la figure 29. Les noms des acides aminés, leurs abréviations et leurs symboles internationaux figurent en annexe 1 tandis que les triplets de nucléotides correspondants sont en annexe 2.

1	AAAAATATTCTACTAGCGTCTTCTCTAAGCACTTGGGTGATTATACATTTCAGGTTAAATTTTCATTAAATATATACTTGTTCGGTATTATCATAAAAATTTATCATAAAAAATGAAACGA	120
		M K R 3
121	AATATATCAAGTTTATTCACRTACAGGATGAGAAATTTAAACRAATTACGAAATGAAGATAACGAAATTTGATCTCCGTTCAAGAACAAAAGAAGAACGATTACAACATAGACCGGAAGCATGG	240
	N I S S Y S H H D E K F K Q L R N E D N E I D L R S R T K E E R L Q H R R E A W	43
241	TTGATACAACAAAGACCGGACGAGAACATCAAAGATTGATGAAAAAATGATTTTAGAATATGAATTACGACGATTCGTGAAATAGAAAAATTAGGATCGGAAGAAGTAAAGTAGA	360
	L I Q Q E R E R E H Q R L M K K M I L E Y E L R R I R E I E K L G S E R S K S R	83
361	TCCCAGATAGTCGTGATAGAAGTAAATGCATCAAAACACATCTAAAACAGTTATATATCCGATAAATTAGAATCTTCAGATGATATATCTTTATTTAGAGGACGAGGATTCAAATT	480
	S P D S R D R S N A S N T S K T V I L S D K L E S S D D I S L F R G P E E G I Q I	123
481	AATGCAACAGAACTACAAAAATTAAGCTAGAAATTCACAGAGATTTGCCAGGAAATCAACAACAACACTGTGGAAGTTAAACGAGATATTCAAATCCTGAAGATGTGATTCCTCAIDA	600
	N A T E L Q K I K L E I H R D L P G K S T T T T V E V K R D I I N P E D V I L I	163
601	AGAAGAACGGGAGAAGGATCTAAGCCTATATTTGAAAGAGAAGAAATAAAAATGTATTAACAAAAATAAATAAATTTGAAGAACATGATACACTTTTAGTTTAAATATTGAAAAATCA	720
	R R T G E G S K P I F E R E E I K N V L T K I N K I E E H D T V L V V N I E K S	203
721	GGAAACGAAACAAAAATATGCTACTTCATCAAAATCTTTAANGAAATCGAATCATGGTTTCAACATACATCCTCTCCTTATTCCAGCGAAAGAAAGTTGAGTAGAGATAGAAATAGA	840
	G N E S K K Y A T S S N S L R N R T H G F Q H T S S R Y S R E R S C S R D R N R	243
841	GAATATAAAAAAAGGACAGACGATATGAAAAATACACAATGAAAAAATAAATTTTAGAAGAAAGAACAGTCTGAGCGCTAATTCCTGTTCAAGAGAACGAGAGCAAAAATCATAT	960
	E Y K K K D R R Y E K L H N E K K K L L E E R T S R K R Y S R S R E R E Q K S Y	283
961	AAAAATGAAATTTCTATCGAAAAATATCGAGAACATCGAAAGAACGATCTCGAGATAGAAGAGAAGGAAAGATCTAGAGAACATAGAAATATTCATCTCATTTATTGAACAAATT	1080
	K N E N S Y R K Y R E T S K E R S R D R R R E R G R S R E H R I I P S H Y I E Q I	323
1081	CCTGTTCTGTTTACTATGGGAATTTTCACCAAGACCAATATGCTIAGACCTTGGGTTCCAATGCGGGGTCAAGTACCAGGATCTAGACATATTGGTCCACTAACACCATTTCCACCA	1200
	P V P V Y Y G N F P P R P I M V R P W V P M R G Q V P G S R H I G P L T P F P P	363
1201	CGATTTATTCCTCCGGATATGTATAGACTTCGTCACCTCCAAATCCTAGATTTGGACCTATGATTAATGACAAATGIGAAAATTTTATAATATGCCAATAATGAATAATGAATTTGAAT	1320
	R F I P P D M Y R L R P P P P N P R F G P M Y stop	385
1321	AATATTGAATAATGAAATATGAGATGATATTTGATAAAAAATAAGAATTTCTAAAATTTGTCATGATATATCGAGATTTGGATAACTAGCAGCTTACAAGTCAATTGTATATTATTTCGTTT	1440
1441	GTTCAAAAAACT 1453	

Figure 29 : Première séquence publiée d'ADN codant de *csd* et correspondance en acides aminés (d'après Beye et al., 2003). Plusieurs séquences sont représentées : sur la ligne la plus haute il s'agit de la séquence en bases azotées avec la numérotation des bases. La seconde représente les acides aminés correspondants

*NB* : le terme *csd* peut être utilisé pour décrire des entités aussi diverses que le gène, l'ARN pré-messager, l'ARN messager ou encore la protéine. C'est pourquoi, pour faciliter la compréhension, il sera précisé à chaque fois de quel *csd* il est question, sauf si le contexte ou le sens de l'assertion ne laisse aucune place au doute. Par convention, *csd* sera écrit en italique lorsqu'il s'agit du gène et en écriture normale lorsqu'il s'agit de la protéine.

### iii. Des domaines remarquables

Le peptide *csd* présente 3 domaines particuliers (figure 30 ; Lechner et al., 2014). Il existe notamment un domaine hypervariable (HVR) sur l'exon 7. Il est encadré par un domaine RS (riche en acides aminés arginine (R) et sérine (S)) avec lequel il forme le domaine PSD (*potential specifying domain*) côté N-terminal et un domaine riche en proline côté C-terminal.

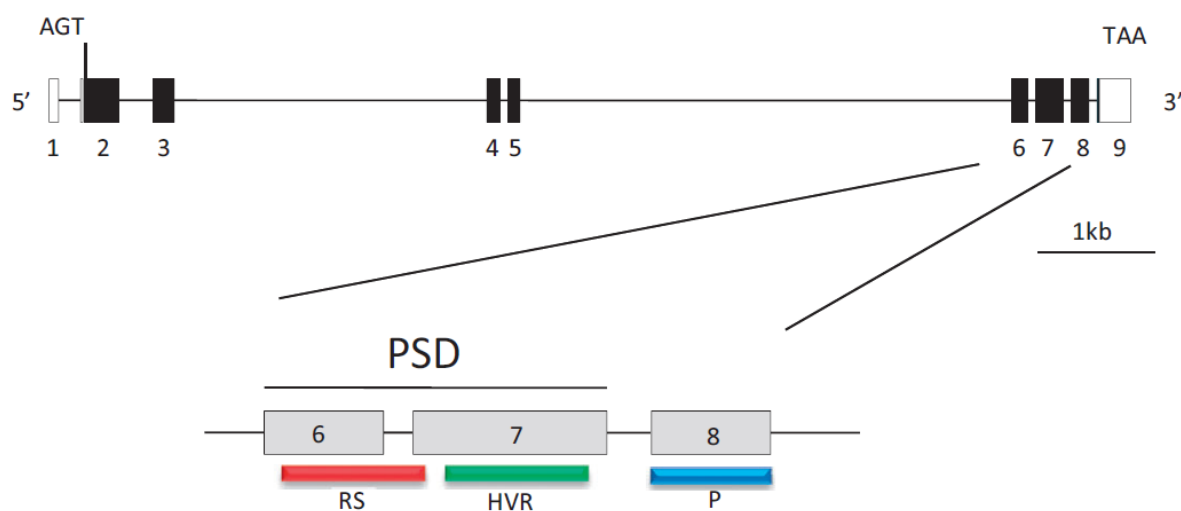


Figure 30 : Représentation schématique de la région d'intérêt du locus *csd* (d'après Lechner et al., 2014)

- Le domaine hypervariable (HVR)

On parle de domaine hypervariable car, d'un allèle à un autre, la protéine *csd* présente, dans cette région, une séquence assez différente en acides aminés, que cela soit en nombre ou en nature. Cette variabilité a été estimée à environ 60%, soit 60% d'acides aminés qui diffèrent, en moyenne, entre le transcrit de 2 allèles différents (Beye et al., 2003). Ce domaine code notamment pour de nombreux acides aminés asparagine (N) et tyrosine (Y) assemblés dans un motif (NY, NNY, N<sub>1-5</sub>Y) dont le nombre de répétitions constitue une source de variabilité (Lechner et al., 2014). Il existe un autre motif assez fréquemment rencontré chez d'autres espèces d'abeilles (*A. cerana*, *A. dorsata*). Celui-ci contient de l'histidine (H) et de la lysine (K) en plus de l'asparagine et de la tyrosine. Il se présente sous la forme (KHYN)<sub>1-4</sub> (Wang et al., 2012). Ce motif n'existe pas chez *Apis mellifera* et l'hypothèse formulée pour l'expliquer est qu'il aurait été perdu au cours de l'évolution. Les acides aminés situés dans les séquences flanquantes qui encadrent la région HVR sont en revanche particulièrement conservés (Biewer et al., 2016). On trouve notamment un motif SLS (Sérine-Leucine-Sérine) en amont (côté N-terminal) et un motif IEQIP (Isoleucine-Acide glutamique-Glutamine-Isoleucine-Proline) en aval (côté C-terminal). Comme nous allons le voir, cette région hypervariable est d'une importance majeure pour la genèse de nouveaux allèles car elle est hautement évolutive.





Finalement, les différences entre 2 allèles sont de 3 types (Lechner et al., 2014) et concernent :

- Le nombre total d'acides aminés au sein de la région HVR (différence de taille)
- Le nombre de substitutions au sein de la région PSD
- Le nombre de substitutions au sein de l'exon 8

La variabilité entre allèles se concentrant quasi-exclusivement au niveau de cette région (Biewer et al., 2016), l'étude de la variabilité au locus *csd* et de la composition allélique peut donc être réalisée en amplifiant seulement les exons 6, 7 et 8 (Lechner et al., 2014). Cela a été le cas dans notre étude, au cours de laquelle nous nous sommes concentrés sur la région HVR.

*NB* : Un variant de *csd* via un épissage alternatif a été trouvé, il consiste en la délétion de 11 acides aminés issus de l'exon 3 (Beye et al., 2003). Cet allèle rare a été observé indifféremment chez des mâles et des femelles ce qui est en défaveur d'un rôle dans la détermination sexuelle.

### **c. CSD, un gène issu d'une duplication**

#### *i. Origine du gène *csd**

Le gène *csd* provient de la duplication locale du gène *fem* (pour *feminizer*) (Hasselmann et al., 2008) qui est un autre gène impliqué dans la cascade de détermination du sexe, en aval de *csd*. Une duplication est une mutation caractérisée par le doublement d'une portion chromosomique. L'un étant issu d'une copie de l'autre au sein d'un même génome, les gènes *csd* et *fem* sont dits « paralogues ». Chez *Apis mellifera*, les gènes *csd* et *fem* sont éloignés d'une distance d'environ 12 kb (Hasselmann et al., 2008) ce qui est assez proche (voir figure 32). Cela signifie que les 2 gènes appartiennent à la même région génomique, appelée SDL (pour *sex determination locus*). Il a été montré que *csd* exerçait une action sur *fem* (Hasselmann et al., 2010). Les autres gènes de la région (GB11211, GB13727, GB30480) ne sont par contre pas impliqués dans le processus de détermination sexuelle (Gempe et al., 2009). Ce phénomène de duplication de *fem* est apparu chez de nombreuses autres espèces d'hyménoptères (fourmis, bourdons) mais de manière indépendante (Koch et al., 2014).



Figure 32 : Carte génétique de la région SDL (d'après Hasselmann et al., 2008)

Lorsqu'est évoqué le gène *fem*, il est aussi parfois question de *tra* (pour *transformer*). Certains auteurs les confondent alors qu'en réalité ils diffèrent : *tra* a la même fonction que *fem* mais chez d'autres espèces d'insectes, en particulier chez la drosophile (*Drosophila melanogaster*). Les gènes *fem* et *tra* dérivent d'un même ancêtre commun et sont dits « orthologues ».

Après la duplication de l'ancêtre de *fem* et *csd*, ce dernier a fait l'objet d'une sélection positive forte accompagnée de néofonctionnalisation (Hasselmann et al., 2010). En génétique, on parle de néofonctionnalisation suite à une duplication lorsque l'une des copies (la plupart du temps la forme ancestrale) garde sa fonction première alors que l'autre copie (ici *csd*) acquiert une nouvelle fonction. Une sélection positive signifie qu'il y a davantage de substitutions nucléotidiques provoquant le changement d'un acide aminé (substitutions non synonymes) que de substitutions n'en provoquant pas (substitution synonymes). Cela se traduit par le fait que les mutations conservées par l'évolution sur *csd* sont situées sur les 1<sup>er</sup> et 2<sup>ème</sup> nucléotide du codon. Cela signifie que ces mutations sont avantageuses et donc qu'il existe un « intérêt » pour l'abeille de conserver ces nouvelles formes de la protéine. Ainsi, il existe, en moyenne au sein de la région PSD, entre 5 et 6 différences d'acides aminés sous sélection positive lorsque l'on compare deux allèles pris au hasard dans la population. Cette observation peut être objectivée en calculant le rapport dN/dS, où dN est le taux de substitutions non-synonymes et dS le taux de substitutions synonymes. Le dN/dS renseigne sur l'intensité de la sélection et sur la forme de la sélection à l'œuvre dans un gène :

- si  $dN/dS < 1$ , cela signifie que les substitutions non-synonymes se sont fixées moins facilement au cours de l'évolution que les substitutions synonymes. On parle de sélection purificatrice (*purifying selection* ; voir plus bas).
- si  $dN/dS = 1$ , cela signifie que les substitutions synonymes et non-synonymes se sont fixées de la même façon au cours de l'évolution.
- si  $dN/dS > 1$ , c'est la sélection positive expliquée ci-dessus.

D'autre part, le locus *csd* fait l'objet d'une sélection dite équilibrante (*balancing selection* en anglais), favorisant le maintien de la diversité allélique (Lechner et al., 2014). Plus précisément, il s'agit d'une sélection balancée « fréquence-dépendante négative » (Hasselmann et Beye, 2004). Cela signifie que plus un allèle (un génotype) est répandu dans une population, plus la valeur sélective associée diminue. On peut comprendre ce type de sélection à la lumière du système de détermination du sexe chez les abeilles, vu plus haut. En effet, il est intéressant de remarquer que la nécessaire hétérozygotie pour les individus femelles et la destruction des individus homozygotes au locus *csd* par les ouvrières, conduit effectivement à une sélection des allèles rares ou récemment mutés, peu fréquents dans la population tandis que les allèles très communs ne sont pas favorisés.

A l'inverse de *csd*, le gène *fem* a fait l'objet d'une sélection directionnelle (*purifying selection* en anglais) (Hasselmann et al., 2010) qui est l'inverse de la sélection positive. Cela tend à ne conserver que les mutations synonymes qui ne changent pas la séquence en acides aminés et qui sont les plus favorables, d'où une certaine stabilité de la séquence. Cette sélection purifiante s'est accentuée sur *fem* après l'évènement de duplication (Hasselmann et al., 2010).

A titre d'exemple, des mutations de la séquence originale ayant engendré 6 substitutions d'acides aminés se sont fixées chez *csd* (voir figure 33). Ces acides aminés ont permis, d'après un modèle de prédiction (Lupas et al., 1991), la formation d'un motif en superhélice qui donne à *csd* des propriétés de liaison avec d'autres protéines.

Par ailleurs, il n'existe pas de traces de conversion génique, c'est-à-dire d'échange non réciproque de séquence, entre *fem* et *csd* (Koch et al., 2014).

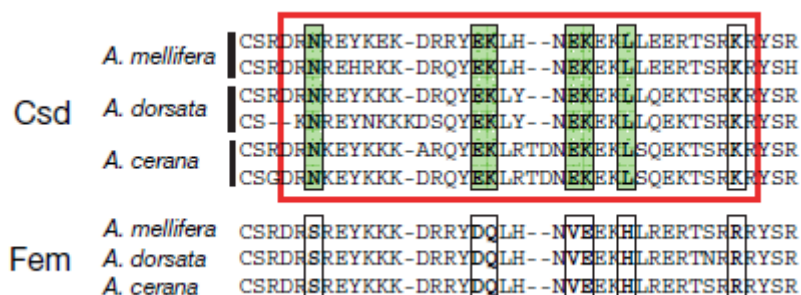


Figure 33 : Mutations non-synonymes fixées chez *csd* (d'après Hasselmann et al., 2008). Le cadre rouge contient les acides aminés intégrés dans un motif en superhélice tandis que les substitutions d'acides aminés vis-à-vis de *fem* sont encadrées en noir

## ii. Structure du gène *fem*

A l'instar de *csd*, la protéine *fem* est une protéine-RS. En effet, elle possède deux domaines RS (riche en acides aminés arginine et sérine ; en rouge sur la figure 34). De plus, elle possède également un domaine riche en proline (en bleu sur la figure 34).

Côté C-terminal, sont situés un domaine RS et le domaine riche en proline. Ces 2 domaines présentent environ 70% d'acides aminés en commun avec les domaines équivalents de la protéine *csd* (Hasselmann et al., 2008). Côté N-terminal, le deuxième domaine RS est présent. En revanche, la protéine *fem* ne possède pas de domaine hypervariable (Biewer et al., 2016). Comme nous le verrons, l'ARN pré-messager de *fem* fait l'objet d'un épissage alternatif.

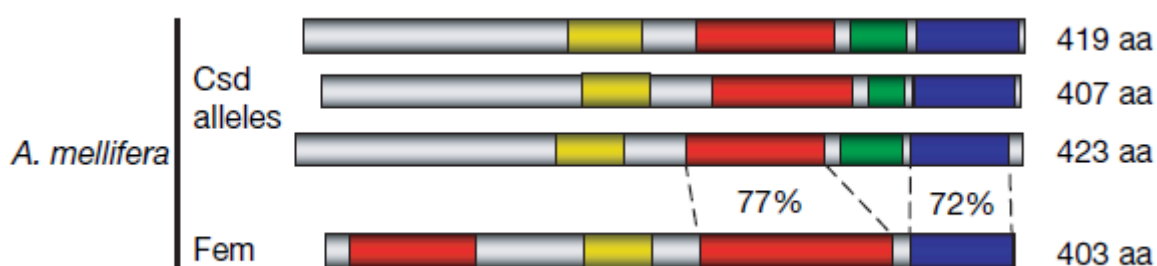


Figure 34 : Représentation schématique de plusieurs séquences protéiques de *csd* et comparaison à la séquence de *fem* (d'après Hasselmann et al., 2008). Les domaines RS sont représentés en rouge, les régions HVR en vert et les domaines riches en proline en bleu. En jaune sont représentés des domaines conservés au sein de plusieurs espèces d'insectes.

## d. Mécanisme moléculaire de détermination du sexe

### i. *CSD, un signal primaire*

La différenciation du sexe implique un dimorphisme sexuel entre mâles et femelles. Ces différences phénotypiques observées s'appuient sur l'activité de gènes. Le gène *csd* constitue le signal primaire. Cela signifie qu'il agit en aval sur d'autres gènes, engendrant une cascade d'activation/modulation.

Le gène *csd* n'est pas exprimé dans les 12 premières heures de vie de l'embryon, il le devient seulement à partir de ce stade (Beye et al., 2003). La transcription du gène a été étudiée chez des embryons femelles. Lorsqu'on compare ensuite à ce qui se passe chez les mâles, pour un allèle donné, aucune différence dans la transcription n'est observée, que cela soit au stade d'embryon, de larve ou de pupa. Autrement dit, le gène *csd* est transcrit aussi bien chez les mâles que chez les femelles, ce n'est donc pas la répression ou non de la transcription qui est à l'origine du sexe. Par contre, quel que soit le sexe, des allèles différents entraînent la formation de polypeptides assez différents, que cela soit dans la taille ou dans la séquence d'acides aminés.

Pour étudier l'effet d'un gène, il existe une méthode appelée « interférence par ARN ». Cette technique consiste en l'injection dans une cellule d'ARN qui est dit « interférent » (ARNi). Celui-ci va conduire à la dégradation ou à la diminution de la traduction d'un ARNm, rendant ainsi « silencieux » le gène duquel il est issu.

Lorsqu'un tel procédé est utilisé contre une partie constante de *csd*, entre 76 et 92% des individus hétérozygotes développent des gonades mâles (Beye et al., 2003 ; Gempe et al., 2009). Avec le même traitement, les mâles haploïdes développent aussi des gonades mâles.

Ceci suggère que le produit du gène *csd* doit être fonctionnel pour obtenir le développement du sexe femelle, mais qu'il n'est pas requis pour le sexe mâle. En pratique, cela signifie également que le produit de la transcription de *csd* n'est fonctionnel que lorsque 2 allèles différents sont coexprimés, alors qu'il ne l'est pas lorsqu'un seul allèle est présent.

Cette constatation a conduit Beye (2003) à proposer dans un premier temps un modèle basé sur l'hypothèse que le développement du sexe femelle nécessite la formation d'un hétérodimère protéique composé des 2 polypeptides issus de l'expression des 2 allèles différents de *csd*. Gempe abonde dans son sens (Gempe et al., 2009). En 2013, il renouvelle cette hypothèse, arguant du fait que les différences nucléotidiques observées au sein de la région d'intérêt jouent probablement un rôle dans la structure tridimensionnelle des protéines *csd* et en conséquence sur leurs capacités de liaison entre elles (Beye et al., 2013).

## ii. *L'épissage sexe-spécifique de fem*

Au niveau moléculaire, il a finalement été montré (Biewer et al., 2015) que l'ARN pré-messager de *fem* subissait un épissage sexe-spécifique dépendant de *csd*. Ainsi, lorsque l'individu est hétérozygote au locus *csd*, c'est une version « féminine » qui résulte de l'épissage de l'ARN pré-messager de *fem*, tandis que c'est une version « masculine » lorsque l'individu est hémizyote ou homozygote.

Une fois activée, la transcription de *fem* se maintient sous cette forme via l'effet d'une boucle de rétro-action positive (Gempe et al., 2009). Cela signifie que la protéine issue de *fem* agit sur son propre ARN pré-messager pour diriger l'épissage vers la formation de l'isoforme « féminin ». Lorsqu'on réalise cette fois une interférence par ARN dirigée spécifiquement contre la version féminine de l'ARN pré-messager de *fem*, alors l'individu suit un développement mâle (Gempe et al., 2009). Même chose si le processus est dirigé contre la version masculine. Ainsi, cela permet de conclure que la version « féminine » conduit à un isoforme protéique fonctionnel tandis que la version « masculine » conduit à un produit non-fonctionnel (Hasselman et al., 2008). On retrouve le même type de signal chez d'autres espèces d'insectes (Verhulst et al., 2010). En regardant de plus près, il se trouve que la version « masculine » de *fem* est une protéine tronquée en raison de l'apparition précoce d'un codon-stop sur l'ARNm (exon 3) qui n'existe pas pour la version « féminine » (Gempe et al., 2009). De manière très schématique, tout se passe en fait comme si le développement mâle était le processus par défaut, ne nécessitant aucun contrôle, tandis que le développement femelle est une option plus élaborée nécessitant la réunion de différentes conditions, dont l'hétérozygotie au locus *csd*.

## iii. *L'action de la protéine tra2*

Pour opérer l'épissage initial de *fem*, le produit de *csd* agit en coopération avec la protéine issue du gène *tra2* (Nissen et al., 2012). Cette dernière est un co-facteur présentant un domaine de reconnaissance de l'ARN d'une longueur de 85 acides aminés environ, domaine encadré par 2 domaines RS (Biewer et al., 2015). Au sein de ce domaine RRM, 2 séquences RNP1 et RNP2 sont particulièrement conservées au sein de plusieurs espèces (Biewer et al., 2015). Brièvement, de l'épissage alternatif de *tra2* résultent 6 isoformes protéiques différents, qui partagent tous un domaine de liaison à l'ARN (Nissen et al., 2012). Au-delà de son rôle dans la cascade de détermination du sexe, *tra2* joue également un rôle dans l'embryogenèse de l'abeille (Nissen et al., 2012).

Cela suggère qu'à l'inverse des gènes en amont dont nous venons de parler, son expression n'est pas dépendante du sexe. En particulier, *tra2* est suspecté d'être responsable de l'aiguillage de l'épissage de l'ARNm de *fem* vers la forme masculine, en l'absence d'une forme fonctionnelle de *csd* (Nissen et al., 2012). Sa présence est donc nécessaire dans tous les cas, même pour un développement mâle.

Par ailleurs, nous avons vu ci-dessus que la transcription de *fem* s'entretenait par le biais d'une boucle de rétro-action positive. Or, la protéine *fem* ne possédant pas de domaine de liaison à l'ARN (motif RRM) (Biewer et al., 2015), la médiation de l'épissage de ce dernier nécessite donc l'intervention d'un co-facteur protéique en possédant un. Et ce co-facteur est également *tra2*.

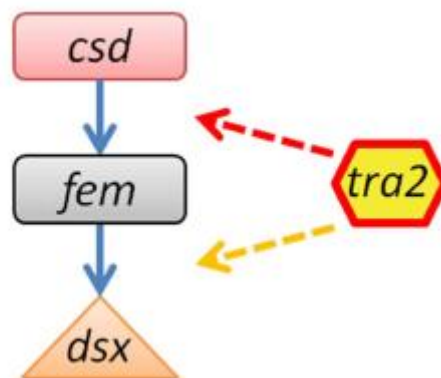
#### *iv. Suite de la cascade de détermination du sexe*

Après l'épissage de l'ARN pré-messager de *fem*, *tra2* reste lié et le complexe fonctionnel actif *fem/tra2* va ensuite agir sur l'épissage du gène cible en aval de la cascade de détermination du sexe, qui est le gène *dsx* (*doublesex*) (Biewer et al., 2015). Ce gène clé chez de nombreux insectes code pour une protéine qui va agir en tant que facteur de transcription. Lorsqu'on compare sa séquence entre plusieurs espèces d'abeilles, cette protéine présente de nombreuses différences entre acides aminés. Néanmoins, au même titre que pour *tra2*, 2 domaines sont particulièrement conservés : OD1 et OD2.

OD1 possède un domaine de liaison à l'ADN en doigt de zinc tandis que OD2 possède un domaine de dimérisation. Dans tous les cas, ces 2 domaines ont des propriétés de liaison à l'ADN et aux protéines. Une fois de plus, l'ARNm de *dsx* subit un épissage sexe-spécifique. Les isoformes masculin et féminin diffèrent par leur côté C-terminal (Nissen et al., 2012).

L'une des questions qui peut venir à l'esprit est de savoir si la transcription de *csd* est nécessaire seulement au début du développement ou si elle doit être maintenue tout au long de la vie de l'animal, ce qui pose également la question sur la possibilité d'une dédifférenciation. Aucune réponse concrète n'existe à ce jour dans la littérature. Par contre, une réponse partielle indirecte est apportée par plusieurs études. En effet, en ce qui concerne *tra2*, le niveau de transcription diminue de manière substantielle au stade pupa (Nissen et al., 2012), ce qui laisse penser que l'activation de la cascade de détermination du sexe est moins importante à ce stade et dans les suivants. Il s'avère que c'est la même chose pour *fem* (Gempe et al., 2009).

En résumé, il faut noter que le signal primaire de détermination du sexe, *csd* chez *A. mellifera*, est extrêmement variable entre espèces et évolue très rapidement (Biewer et al., 2015). Des processus déjà mentionnés plus haut tels que la duplication et la néofonctionnalisation des gènes y contribuent activement. En revanche, les voies moléculaires en aval (*fem*, *dsx*) sont très conservées et opèrent au sein de nombreuses espèces d'insectes (Gempe et al., 2009). La figure 35 récapitule les interactions entre les premiers intervenants de la cascade de détermination du sexe. En ce qui concerne *tra2*, le scénario le plus probable est qu'il a co-évolué avec *csd* (Biewer et al., 2015). Ainsi, il a gardé sa fonction première qui est d'agir avec *fem* sur l'épissage de *dsx* mais la duplication de *fem* ayant engendré *csd*, il a coévolué avec *csd* pour agir sur l'épissage de *fem*.



**Figure 35 : Représentation schématique des premières étapes moléculaires de la cascade de détermination du sexe (d'après Biewer et al., 2015).**



## e. Variabilité allélique de *csd*

### i. Polymorphisme au sein de l'espèce *A. mellifera*

La sélection balancée fréquence-dépendante négative du locus *csd* a favorisé la genèse de nombreux allèles. Les premières études suspectaient l'existence de 19 allèles différents au locus *csd* (Beye et al., 2003). Près de 10 ans plus tard (Lechner et al., 2014), la même équipe a montré qu'il en existait en réalité entre 53 (localement, dans une région du Kenya) et 87 (dans le monde entier), voire probablement davantage. En effet une extrapolation à un échantillon de taille supérieure été réalisée et a conduit à un chiffre de 145 allèles, ce qui constitue une très forte variabilité. Les différences entre 2 allèles sont parfois faibles, ce qui n'empêche pas l'hétérozygotie. En effet, il suffit qu'il existe au moins 5 acides aminés différents et/ou une taille de la région HVR différente pour obtenir un développement femelle (Beye et al., 2013). On estime par ailleurs qu'un nouvel allèle est généré tous les 400 000 ans (Lechner et al., 2014). Au sein de l'espèce *Apis mellifera*, il existe parmi les sous-espèces un polymorphisme important pour *csd*, en particulier au sein de la région d'intérêt (contenant les exons 6 à 9) (Wang et al., 2012). En moyenne, le niveau de polymorphisme est 7 fois plus élevé dans les régions codantes que dans les régions non codantes (Hasselman et al., 2006).

A ce jour, assez peu d'études se sont intéressées à la variabilité allélique au locus *csd* et notamment à la variabilité entre sous-espèces d'*Apis mellifera*. En particulier, aucune étude sur la variabilité allélique au locus *csd* de populations d'abeilles françaises n'existe. La partie expérimentale de ce travail de thèse (voir plus loin) a pour but de remédier à cette absence de connaissance.

### ii. Polymorphisme interspécifique

Pour 3 espèces du genre *Apis*, *A. mellifera*, *A. dorsata* et *A. cerana*, les analyses réalisées ne montrent aucun allèle en commun, ce qui va dans le sens d'une différenciation rapide du locus au cours du temps (Hasselman et al., 2008). En moyenne, 3% des acides aminés diffèrent entre les protéines *csd* d'un couple de ces 3 espèces, hors région HVR. Par ailleurs, la diversité nucléotidique au locus *csd* est encore plus élevée pour *A. florea* que pour *A. mellifera*, *A. cerana* ou *Apis dorsata* (Liu et al., 2011).

La recherche de gènes orthologues de *csd* chez les insectes de la tribu Meliponini (bourdons, abeilles sans aiguillon) s'est révélée infructueuse, ce qui signifie que la duplication du gène *fem* donnant naissance à *csd*, a eu lieu après la séparation évolutive entre les espèces de cette tribu et les abeilles à miel du genre *Apis* (Biewer et al., 2016). Cette séparation a eu lieu il y a environ 80 millions d'années. Par contre, cette duplication a eu lieu avant la ségrégation des espèces du genre *Apis* (Koch et al., 2014). *Apis florea* est l'espèce considérée comme la plus primitive du genre *Apis* (Lo et al., 2010). La séparation avec les autres espèces du genre est survenue il y a environ 30 millions d'années. En conséquence, la naissance de *csd* a eu lieu il y a entre 30 et 80 millions d'années.

## B. Le projet SeqApiPop

### a. Objectifs, enjeux et contexte

Porté par l'UMT PrADE (Protection des abeilles dans l'environnement), regroupant l'INRA (Institut National de la Recherche Agronomique) et l'ITSAP (Institut Technique et Scientifique de l'Apiculture et de la Pollinisation), le projet SeqApiPop vise à caractériser la diversité génétique de l'abeille domestique *Apis mellifera* en France par séquençage de génomes complets. Ce projet, qui s'étend de 2013 à 2016, a été validé et est financé par FranceAgriMer.

Il fait suite au Plan de développement durable de l'apiculture (PDDA) de 2012 qui faisait le constat que les apiculteurs ne bénéficiaient pas suffisamment du progrès génétique. Plusieurs objectifs intermédiaires ont été fixés. En premier lieu celui de mieux connaître la variabilité du génome de l'abeille domestique par re-séquençage de génomes complets, rendu possible par les nouveaux outils de séquençage du génome (Koboldt et al., 2013). En effet, avec l'évolution spectaculaire des technologies constatée depuis 10 ans (Goodwin et al., 2016) le séquençage de génomes entiers devient abordable de nos jours pour un laboratoire de recherche. *A fortiori* un petit génome comme celui de l'abeille, qui est dix fois plus petit que les génomes des animaux de rente habituels (bovins, porcins, volailles), donc encore moins cher à séquencer (environ 200 euros par individu). Cette connaissance fine du génome permet d'améliorer notre connaissance de la diversité des populations d'abeilles françaises et de leur histoire.

Comme nous l'avons vu dans la deuxième partie, l'abeille française est assez diverse. Elle est issue du croisement de nombreuses races, parmi lesquelles des races d'Italie ou du Caucase, importées par l'homme. Et ces introgressions sont plus ou moins importantes, certaines lignées restant proches d'une race pure tandis que d'autres sont très métissées. Les populations d'abeilles françaises sont donc très disparates et connaître leur diversité implique de connaître leur variabilité intra et inter-populations. Cette connaissance est la condition *sine qua non* à la réalisation de l'objectif ultime pour la filière qui est de développer un programme de sélection de l'abeille. Jusqu'alors, aucune étude d'envergure récente n'avait poursuivi ces buts, celles disponibles étant soit trop anciennes (car les populations se sont modifiées), soit trop locales, soit, et c'est un corollaire de l'ancienneté, manquaient de résolution sur la séquence du génome.

## **b. Populations échantillonnées**

Afin d'être le plus représentatif possible du cheptel d'abeilles français, l'échantillonnage du projet a ciblé les « multiplicateurs » de la filière, c'est-à-dire les acteurs les plus impliqués dans la sélection et dans la fourniture des apiculteurs en abeilles. Des abeilles ont donc été fournies par :

- Les groupes de sélection régionaux : Rhône-Alpes, Corse, Réunion ... ;
- Les groupes de sélection nationaux par « type » (race et/ou objectif de sélection) : *A. carnica*, production de gelée royale ... ;
- Les sélectionneurs privés intéressés par le projet et désireux de connaître la génétique de leur cheptel ;
- Les conservatoires de l'abeille noire.

Pour chaque population définie, 30 colonies « souches » ont été choisies, sur la base du degré de connaissance de leur parenté. En effet, pour avoir une bonne représentation de la diversité intra-population, il est important de ne pas prélever des colonies trop apparentées. Pour chaque colonie, un mâle a été choisi, de sorte qu'un mâle égale une colonie. Et chaque mâle a été séquencé. Le choix s'est porté sur les mâles car le fait qu'ils soient haploïdes facilite grandement le séquençage. En effet, à l'inverse des femelles, il n'y a pas de risque de confusion entre les deux versions d'un même chromosome.

En outre, ces travaux de séquençage permettront l'accumulation de données susceptibles de servir à des travaux de recherche ultérieurs sur le génome des populations d'abeilles françaises, en particulier pour la recherche de marqueurs moléculaires dans le cadre de programmes de sélection génomique ou encore pour des études sur la consanguinité.

### c. Intérêt du projet pour le locus *csd*

Initialement non inclus dans les thèmes du projet, cette particularité qu'est l'haplodiploïdie chez les abeilles et la spécificité du locus *csd*, ont éveillé la curiosité de l'équipe de recherche de l'INRA d'Auzeville. A plus forte raison car l'étude de la variabilité au locus *csd* constitue une forme d'étude originale de la diversité génétique de l'abeille domestique française. Les méthodes de séquençage « tout génome » n'ayant pas permis d'obtenir de résultats satisfaisants pour ce gène, c'est assez naturellement qu'un projet subsidiaire de séquençage de ce locus par des méthodes classiques a émergé. Dans un premier temps, de brèves tentatives ont été faites en mai 2015 pour amplifier ce locus à partir des amorces utilisées par d'autres auteurs (données non présentées). Mais les résultats ne furent pas ceux escomptés et conduisirent à l'abandon momentané du projet. En effet, *csd* étant issu de la duplication de *fem*, les 2 gènes présentent encore une homologie non négligeable. L'amplification de *csd* sans l'amplification de *fem* nécessite donc la création d'amorces complémentaires avec des séquences de *csd* qui sont suffisamment différentes de *fem* mais suffisamment conservées entre plusieurs allèles *csd*.

## C. Objectifs de l'étude

Dans le cadre de ma thèse vétérinaire, je me suis intéressé à de nombreux sujets inhérents à l'abeille et à ce locus en particulier. J'ai réalisé dans un premier temps un travail bibliographique destiné à approfondir ma connaissance du gène *csd* et à collecter les amorces utilisées par les auteurs ayant déjà réussi à séquencer ce locus.

J'ai ensuite travaillé sur ces amorces en analysant leur homologie avec *csd*, leur possibilité de fixation sur le génome de l'abeille, les zones susceptibles d'être amplifiées et le nombre de mésappariement avec *fem*. Sur la base de ces travaux, des amorces ont été éditées et commandées pour l'amplification du locus. Certaines sont issues de la modification d'amorces préexistantes tandis que d'autres ont été créées *de novo*. Des tests préliminaires sur 3 abeilles ont permis de mettre au point la PCR puis le séquençage. La région 3 du gène *csd* (de l'exon 6 jusqu'à l'exon 8) a ensuite été amplifiée avec succès pour 183 abeilles d'intérêt du projet SeqApiPop, puis les produits d'amplification ont été séquencés et alignés sur le génome de référence. Ces séquences, formant un résultat en soi, ont tout de même été analysées et croisées dans plusieurs sens pour en tirer un maximum d'information. Ainsi, un arbre phylogénétique a été réalisé pour établir la présence ou non d'une structure de population. Les séquences ont été traduites en protéines, puis comparées à l'intégralité des allèles connus, ce qui a permis de découvrir 25 nouveaux allèles. Des fréquences alléliques intra et inter-populations ont été calculées à titre indicatif. Enfin, la diversité allélique à ce locus et la taille de la région hypervariable ont été comparées entre plusieurs sous-populations de notre échantillon.

Par ailleurs, nous avons constaté sur le navigateur de génome *Ensembl metazoa*<sup>®</sup> que la séquence de référence d'*Apis mellifera* (Amel\_4.5) pour *csd* présentait, en dépit des études ayant déjà établi la séquence, des anomalies :

- L'exon 1 n'est pas représenté
- Une zone située dans l'intron entre les exons 5 et 6 est inconnue
- La région d'intérêt (exons 6,7 et 8) est dupliquée, avec très vraisemblablement les 2 allèles de l'individu diploïde utilisé pour réaliser la séquence de référence mis bout à bout.

Un travail annexe a donc été réalisé parallèlement à l'étude principale. Il a consisté en l'amplification de la région inconnue entre les exons 5 et 6 chez un échantillon d'abeilles issues de l'étude principale, en vue de sa reconstitution et de l'établissement d'une séquence de référence corrigée.

## CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES

### A. Travaux préliminaires

#### a. Compilation des amorces préexistantes

Afin d'amplifier correctement la région d'intérêt du locus *csd*, la première étape fut de trouver des amorces susceptibles de se fixer spécifiquement sur des allèles variables de *csd* et non sur *fem*. En première intention, les amorces utilisées par des auteurs ayant déjà étudié cette région ont été collectées (voir tableau 5).

Ces amorces ont ensuite été alignées respectivement sur les séquences de référence de *csd* et *fem*, via l'algorithme BLAST et le navigateur de génome *Ensembl metazoa*, afin d'évaluer l'appariement probable. A l'issue de ce travail, aucune amorce n'a été gardée sous sa forme native, seules 2 d'entre elles ont été conservées (genoRfw et AD2s-39) mais sous forme modifiée (voir ci-après).

**Tableau 5 : Amorces collectées dans la bibliographie**

Article	Espèce	Portion du gène amplifiée	Brin	Séquence de l'amorce	Matrice	Nom de l'amorce
BIEWER, M., LECHNER, S., et HASSELMANN, M. Similar but not the same : insights into the evolutionary history of paralogous sex-determining genes of the dwarf honey bee <i>Apis florea</i> . <i>Heredity</i> , 2016, vol. 116, no 1, p. 12-22.	<i>Apis florea</i>	Gène entier	Sens	5'-CGGTTTCTCTAAGCATATAGGTGA-3'	ADN	S-166
			Antisens	5'-GTCAAGGCTGAGTAATAGTATTAA-3'		S-158
		Exons 2 à 3	Sens	5'-CTCCCGTTCTTCTTTTGATTATCACATT-3'	ADN	S-156
			Antisens	5'-CAGAAGAACGATTACGACGGA GACGCG-3'		S-143
		Exons 6 à 9 (région HVR)	Sens	5'-CATTGACCCGCTAGTTGTCCAATCTCG-3'	ADN	S-176
			Antisens	5'-GTTGCAGTAGAGATAGAAAATAGAGG-3'		S-177
HASSELMANN, M., LECHNER, S., SCHULTE, C., et al. Origin of a function by tandem gene duplication limits the evolutionary capability of its sister copy. <i>Proceedings of the National Academy of Sciences</i> , 2010, vol. 107, no 30, p. 13378-13383.	<i>Apis mellifera</i>	Exons 6 à 9 (région HVR)	Sens	5'- AGACRATATGAAAAATTACACAATGA-3'	ADN	genoRfw
			Antisens	5'-TCA TCTCATWTTTCATTATTCAAT-3';		Conscsdrev
			Sens	5'-TATAATGAAAAAGAAAAATTTTGTAGAAG-3'		S-39
			Antisens	5'-ACTATGTGCATCAATATA AATTC-3'		S-40
HYINK, Otto, LAAS, Frans, et DEARDEN, Peter K. Genetic tests for alleles of complementary-sex-determiner to support honeybee breeding programmes. <i>Apidologie</i> , 2013, vol. 44, no 3, p. 306-313.	<i>Apis mellifera</i>	Exons 6 à 9 (région HVR)	Antisens	5'- GTAAAACGACGGCCAGTCATCTCATWTTTCATTATTCAAT-3'	ADN	M13FConscsdrev
			Sens	5'- TCGCTGTCGGTGAAGACRATATGAAAAATTACACAATGA-3'		AD1genoRfw
			Antisens	5'- GTAAAACGACGGCCAGTACTATGTGCATCAATATAAATTC-3'		M13FS-40
			Sens	5' - TCGCTGTCGGTGATATAATGAAAAAGAAAAATTTTGTAGAAG-3'		AD2S-39
WANG, Zilong, LIU, Zhiyong, WU, Xiaobo, <i>et al.</i> Polymorphism analysis of <i>csd</i> gene in six <i>Apis mellifera</i> subspecies. <i>Molecular biology reports</i> , 2012, vol. 39, no 3, p. 3067-3071.	<i>Apis mellifera</i>	Exons 6 à 9 (région HVR)	Sens	5'-AATTGGATTTATTAATATAATTTATTATTTCAGG-3'	ADN	/
			Antisens	5'-ATYTCATTATTCAATATGTTNGCATCA-3'		/



## b. Etude de la séquence de référence

Suite à la collection des amorces utilisées dans des études précédentes, la séquence d'ADN génomique de *fem* et de multiples séquences génomiques de *csd* prises aléatoirement sur GenBank® ont été alignées sur la séquence de référence de *csd*. Cette opération a permis de visualiser les régions conservées au sein d'allèles multiples de *csd*. Lorsque ces régions étaient suffisamment différentes de la séquence de *fem* alors elles constituaient des régions candidates dans lesquelles choisir des amorces.

Un travail similaire a été réalisé sur les séquences des exons 4, 5 et 9 dans l'éventualité où nous souhaiterions amplifier une partie plus importante du gène (voir p 197 : Etude complémentaire).

## c. Définition de nouvelles amorces

Finalement, 10 amorces, parmi lesquelles 2 amorces préexistantes modifiées, ont été sélectionnées pour commande à l'entreprise Sigma-Aldrich®. Les 8 nouvelles amorces ont été écrites *de novo*. Toutes les informations sur ces amorces sont disponibles dans le tableau 5 ci-dessous.

Tableau 6 : Caractéristiques des amorces

Amorces brin sens	Localisation	Nom amorce	Séquence nucléotidique
	Exon 4	CSD_4500_Up	5'-AAGAACATGATACAGTTTTAGT-3'
		CSD_4615_Up	5'-ATTATACTAAATTTATACTG-3'
		CSD_7942_Up	5'-TATGTTTCATTTTCTTAAATG-3'
	Exon 6	CSD_10984_Up	5'-AGACGATATGAAAAATTACACAATGA-3'
		CSD_8091_Up	5'-AGACAATATGAAAAATTACACAATGA-3'
		CSD_8110_Up	5'-ACAATGAAAAAGAAAACTTTTAGA-3'
Amorces brin antisens			
	Exon 8	CSD_8633_Dn	5'-TATTGAAATCCAAGGTCCCATTGG-3'
		CSD_8657_Dn	5'-CCTAAATCTGGTATTTGTTCTT-3'
		CSD_8695_Dn	5'-GGAATGAATCGTGGAATGG-3'
	Exon 9	CSD_11795_Dn	5'-ACTGTGACAGATTTTACATTC-3'

## **B. Tests d'amplification et de séquençage**

### **a. De nombreux couples testés**

A partir des amorces commandées, 16 couples d'amorces ont été formés en vue de l'amplification de la région hypervariable. Chacun de ces couples a été testé sur 3 ADN tests : UK21C, UK22C et UK28C. Par ailleurs, un témoin négatif (ADN remplacé par le même volume d'eau) a été réalisé pour chaque couple tandis qu'un témoin positif (amorces d'ADN mitochondrial) a été mis en place pour chaque ADN. Tous les puits-témoins étaient disposés sur la même plaque que les puits-tests.

#### *i. Protocole PCR*

Les amorces ont été diluées jusqu'à l'obtention d'une concentration de 10  $\mu\text{mol/L}$  et les ADN-tests à une concentration de 10  $\text{ng}/\mu\text{l}$ . Pour la réaction PCR, les concentrations finales de chaque élément étaient les suivantes : 0,5  $\mu\text{mol/L}$  d'amorces, 200  $\mu\text{mol/L}$  de mélange de dNTP, 1X de tampon GoTaq, 0,1 unité d'enzyme Taq polymérase et 50  $\text{ng}/\mu\text{l}$  d'ADN, pour un volume total de 25  $\mu\text{l}$ . Les conditions d'amplification étaient les suivantes :

- Dénaturation : 5 min à 94°C (1 cycle)
- Elongation : 45 s à 94°C, 45 s à 58°C et 45 s à 72°C (30 cycles)
- Elongation finale : 20 min à 72°C puis 15°C à l'infini

#### *ii. Electrophorèse sur gel d'agarose*

Les produits PCR ont été déposés sur gel d'agarose à 1,5% puis ont migré par électrophorèse 1h à 185V. La révélation a été réalisée grâce à une table UV et la visualisation via le logiciel GeneSnap (Syngene®).

### iii. Résultats

La description des couples testés et les résultats obtenus pour chaque ADN-test figurent dans le tableau 7 ci-dessous.

**Tableau 7 : Résultats des tests d'amplification. 1 signifie que l'amplification a réussi, 0 qu'elle a échoué**

Numéro couple d'amorce	Couple amorce		Amplification		
	Amorce sens	Amorce antisens	UK21C	UK22C	UK28C
1	CSD_7942_Up	CSD_8633_Dn	0	0	0
2	CSD_7942_Up	CSD_8657_Dn	0	0	0
3	CSD_7942_Up	CSD_8695_Dn	0	0	0
4	CSD_7942_Up	CSD_11795_Dn	0	0	0
5	CSD_10984_Up	CSD_8633_Dn	0	1	1
6	CSD_10984_Up	CSD_8657_Dn	1	1	1
7	CSD_10984_Up	CSD_8695_Dn	1	1	1
8	CSD_10984_Up	CSD_11795_Dn	0	1	0
9	CSD_8091_Up	CSD_8633_Dn	0	1	1
10	CSD_8091_Up	CSD_8657_Dn	1	1	1
11	CSD_8091_Up	CSD_8695_Dn	1	1	1
12	CSD_8091_Up	CSD_11795_Dn	0	1	0
13	CSD_8110_Up	CSD_8633_Dn	0	1	1
14	CSD_8110_Up	CSD_8657_Dn	1	1	1
15	CSD_8110_Up	CSD_8695_Dn	1	1	1
16	CSD_8110_Up	CSD_11795_Dn	0	1	0

L'utilisation d'un marqueur de taille sur nos électrophorèses a permis de constater que les tailles des fragments obtenus étaient proches de 700 pb, soit la longueur moyenne attendue entre nos couples d'amorces. En définitive, 6 couples d'amorces (n° 6, 7, 10, 11, 14, 15) ont permis d'amplifier la région hypervariable chez nos 3 ADN-test. Ces résultats auguraient de la possibilité de choisir entre 3 amorces sens et 2 amorces anti-sens pour notre étude principale.

## **b. Des séquences conformes**

Afin de s'assurer que les fragments amplifiés correspondaient effectivement à la région attendue, certains produits PCR ont été séquencés puis alignés sur la séquence de référence. Par ailleurs, cette étape a permis de mettre au point le séquençage pour l'étude principale.

### *i. Choix des produits à séquencer*

Les tests de séquençage ont été réalisés sur les produits les plus longs, choisis sur la base de la netteté et de l'intensité de la bande observée lors de la révélation. Ainsi, 8 produits PCR ont été séquencés, parmi lesquels au moins 2 produits pour chacune des 3 abeilles-tests. Chaque produit a été séquencé dans les 2 sens.

### *ii. Protocole du séquençage*

#### ○ Purification (Réaction Exo/Sap)

La première réaction de purification des produits PCR vise à éliminer les amorces non fixées ainsi que les dNTP non incorporés. Entre 3 et 5  $\mu$ l de produit de PCR (selon l'intensité de la bande) ont été prélevés et ajoutés à un volume complémentaire d' $H_2O$  de sorte à atteindre un volume de 14  $\mu$ l, auquel a été rajouté 1  $\mu$ l d'un mélange équimolaire de deux enzymes hydrolytiques (ExoI et SAP). L'enzyme SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase) retire les groupes phosphates en 5' des dNTPs en excès afin de permettre l'action de l'Exonucléase I qui digère les séquences simple brin (amorces) en dNTPs. Les conditions de cette réaction étaient les suivantes :

- Etape 1 : 45 min à 37°C (action des enzymes)
- Etape 2 : 30 min à 80°C (inactivation des enzymes)
- Etape 3 : 15° à l'infini

#### ○ Réaction de Sanger

Suite à la purification, la réaction de Sanger a été réalisée. Elle consiste en l'incorporation aléatoire par une ADN polymérase de didésoxyribonucléotides interrupteurs de chaîne (ddNTPs) et marqués par un fluorochrome. Chaque ddNTP (ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTP) est marqué par un fluorochrome différent dont le spectre d'émission est spécifique.

Dans un premier temps les produits de PCR sont dénaturés de sorte à permettre la fixation d'une amorce de séquençage, complémentaire du brin matrice. A la suite de cette amorce, un nouveau brin complémentaire est créé. Dans le milieu de réaction sont présents une enzyme polymérase, des dNTPs non marqués et des ddNTPs marqués. A chaque incorporation de base, il existe, pour chaque fragment, une compétition entre dNTPs et ddNTPs. A chaque fois qu'un ddNTP est incorporé, l'élongation s'arrête. Par contre, elle continue si c'est un dNTP qui est incorporé. Dans tous les cas, l'élongation de chaque produit monobrin se termine par l'incorporation d'un ddNTP marqué spécifique.

En fin de réaction, il existe donc pour chaque position nucléotidique un fragment se terminant par un ddNTP. Lors de la révélation, une analyse spectrale va différencier les différents fluorochromes et donc définir la séquence nucléotidique du brin d'ADN initial. Une représentation schématique du principe de cette réaction figure en annexe 3 tandis que le protocole utilisé est en annexe 4.

Aux 15 µl de la réaction de purification ont été ajoutés, dans chaque puit, 1 µl d'amorce de séquençage, et 4 µl d'un mélange réactionnel composé d'eau (1,5 µl), de Big Dye terminator® (0,5 µl) et de tampon (2 µl). Le Big Dye terminator® est un mélange de ddNTPs marqués par un fluorochrome et d'une polymérase. Les conditions de cette réaction étaient les suivantes :

- Dénaturation : 5 min à 94°C (1 cycle)
- Elongation : 30 s à 94°C, 15 s à 55°C et 4 min à 60°C (25 cycles)
- Etape finale : 15°C à l'infini
- 
- o Révélation sur séquenceur

L'électrophorèse avec détection des fluorophores a été réalisée par la plate-forme INRA GenoToul. Le détail pratique et le mode opératoire complet sont consignés en annexe 5.

### iii. Résultats des tests de séquençage

Les chromatogrammes de chaque réaction de séquençage ont été corrigés manuellement en utilisant le logiciel de visualisation et d'édition Chromas® (2.6) (voir figure 36). Les séquences ont ensuite été extraites au format FASTA puis alignées avec la séquence de référence (Amel\_4.5) de *csd* grâce à un outil d'alignement de séquences multiples : Clustal Omega® (1.2.1) (Sievers et al., 2011 ; Goujon et al., 2010) puis l'alignement a été corrigé manuellement en utilisant le logiciel Jalview® (2.9) (Waterhouse et al., 2009).

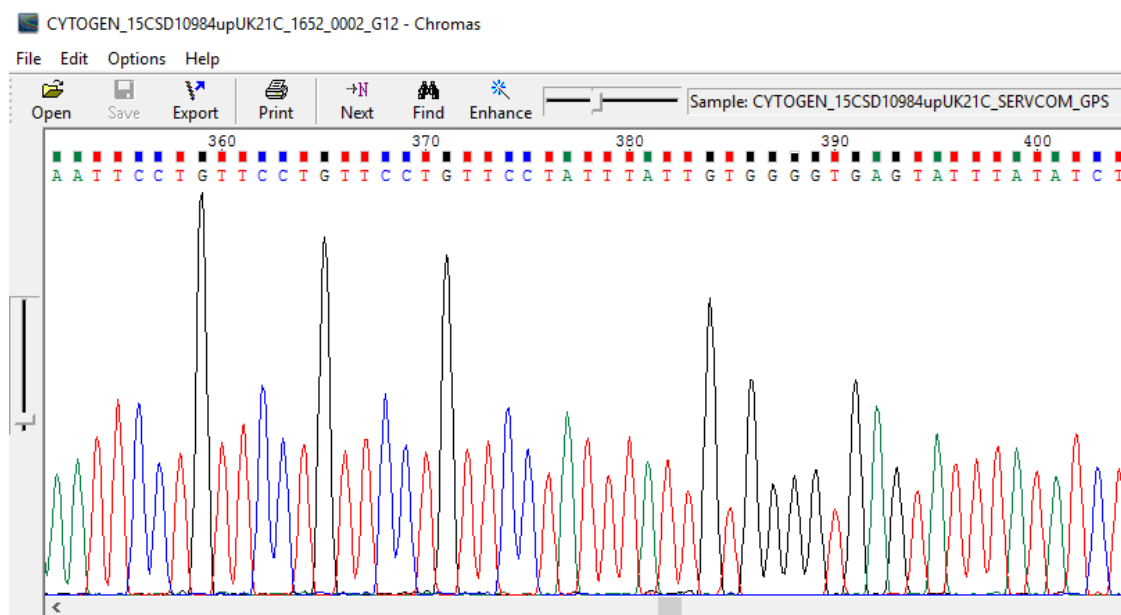


Figure 36 : Exemple de visualisation d'une séquence avec Chromas® (2.6)

Comme on peut le voir sur la figure 37 suivante, les séquences obtenues correspondent effectivement à la région que l'on cherchait à amplifier. Par ailleurs, la taille de nos séquences est en adéquation avec celle qui sépare les 2 amorces.

Sur la figure 37, la première ligne représente la séquence de référence de *csd* tandis que la seconde ligne est la séquence référence de l'exon 7 où est située la région hypervariable. Chaque « pack » de séquences situé en-dessous correspond à l'une de nos abeilles-tests, respectivement UK21C (en haut), UK22C (au milieu) et UK28C (en bas). On observe que cette région est effectivement hypervariable avec la taille la plus longue chez UK28C et la plus courte pour UK22C. Il est intéressant de remarquer que cette différence de taille de la région HVR était déjà visible sur l'image du gel d'agarose. En effet, pour 2 couples d'amorces ayant permis une amplification de nos 3 abeilles tests (encadré en rouge), on observe que la bande la plus haute (donc la plus longue) est à droite (UK28C) tandis que la plus basse (la plus courte) est au centre (UK22C).

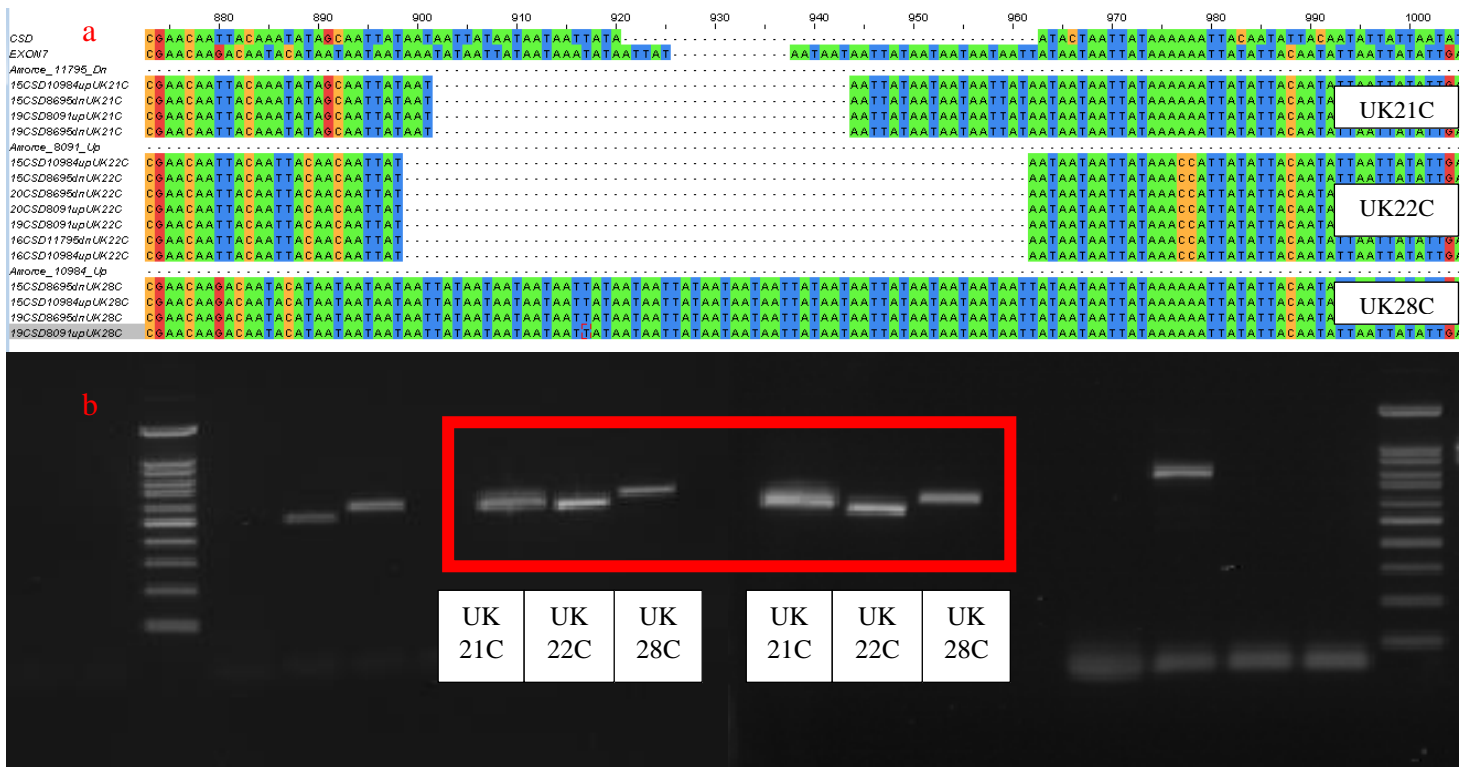


Figure 37 : a. Région hypervariable de nos abeilles tests. b. Observation de la différence de taille sur le gel d'agarose

Ces résultats validaient l'ensemble de notre protocole, de l'ADN jusqu'aux séquences, c'est pourquoi l'étude principale a pu être débutée.

## C. Etude principale

### a. Échantillonnage

#### i. *Les abeilles du projet SeqApiPop*

L'ensemble des abeilles du projet SeqApiPop a été collecté par l'équipe de l'ITSAP et notamment par Mr Benjamin Basso, coordonnateur "Sélection et élevage". Il s'agit d'individus mâles (faux-bourçons), chacun représentant une ruche. L'utilisation de mâles haploïdes permet de s'affranchir du problème posé par la présence de 2 allèles différents dans le même échantillon. En effet, si 2 allèles sont très proches, les séparer par électrophorèse est la plupart du temps impossible ce qui fait que le séquençage l'est également. Ceci étant, l'utilisation d'ouvrières reste possible à condition de cloner chaque allèle dans un vecteur de clonage bactérien. C'est ce qui a été réalisé par Lechner et al. (2014). Mais ce procédé est assez lourd et n'est pas nécessaire avec des mâles. Les mâles ont été prélevés au stade nymphe pour s'assurer de leur provenance et placés dans des tubes de 2 ml remplis d'éthanol. Ces prélèvements ont eu lieu en 2015, en France et dans les pays avoisinants. L'extraction d'ADN a eu lieu à l'INRA d'Auzeville-Tolosane, via un protocole présenté en annexe 6.

#### ii. *Les abeilles de notre étude*

Afin d'étudier la diversité génétique au locus *csd*, un sous-ensemble des abeilles du projet SeqApiPop a été sélectionné.

D'une part, un pool important d'abeilles françaises de la station de testage de l'ITSAP d'Avignon, de provenance et de races diverses, souvent des hybrides, a été choisi. Ces dernières ont pour appellation « ITSAP » car elles ont été collectées dans des localisations variées de France par l'ITSAP (Institut Technique et Scientifique de l'Abeille et de la Pollinisation). La provenance de ces abeilles est consignée en annexe 7.

D'autre part, des abeilles *Apis mellifera mellifera*, *Apis mellifera ligustica* et *Apis mellifera carnica*, choisies comme références pour ces trois sous-espèces, ont été incorporées dans un second temps. Ainsi, des abeilles noires (*Apis mellifera mellifera*) des îles d'Ouessant (France, appellation « OUE ») et de Colonsay (Royaume-Uni, appellation « UK ») ont été jointes. Leur caractère insulaire n'a pas été choisi innocemment, en effet cette particularité permettait d'étudier la diversité allélique au locus *csd* pour des populations séparées du continent, probablement à faible effectif génétique, et de voir si une pression de sélection s'opérait sur ces abeilles.



Pour l'abeille jaune (*Apis mellifera ligustica*), des abeilles italiennes (appellation « ITA ») ont été adjointes. Enfin, des représentantes de la race carnolienne (*Apis mellifera carnica*) ont été ajoutées, en provenance de Slovénie (appellation « SLO ») et d'Allemagne (appellation « BER »). Les 3 races d'abeilles représentées dans notre échantillon sont celles dont l'aire de répartition est la plus proche du territoire français (voir figure 38).

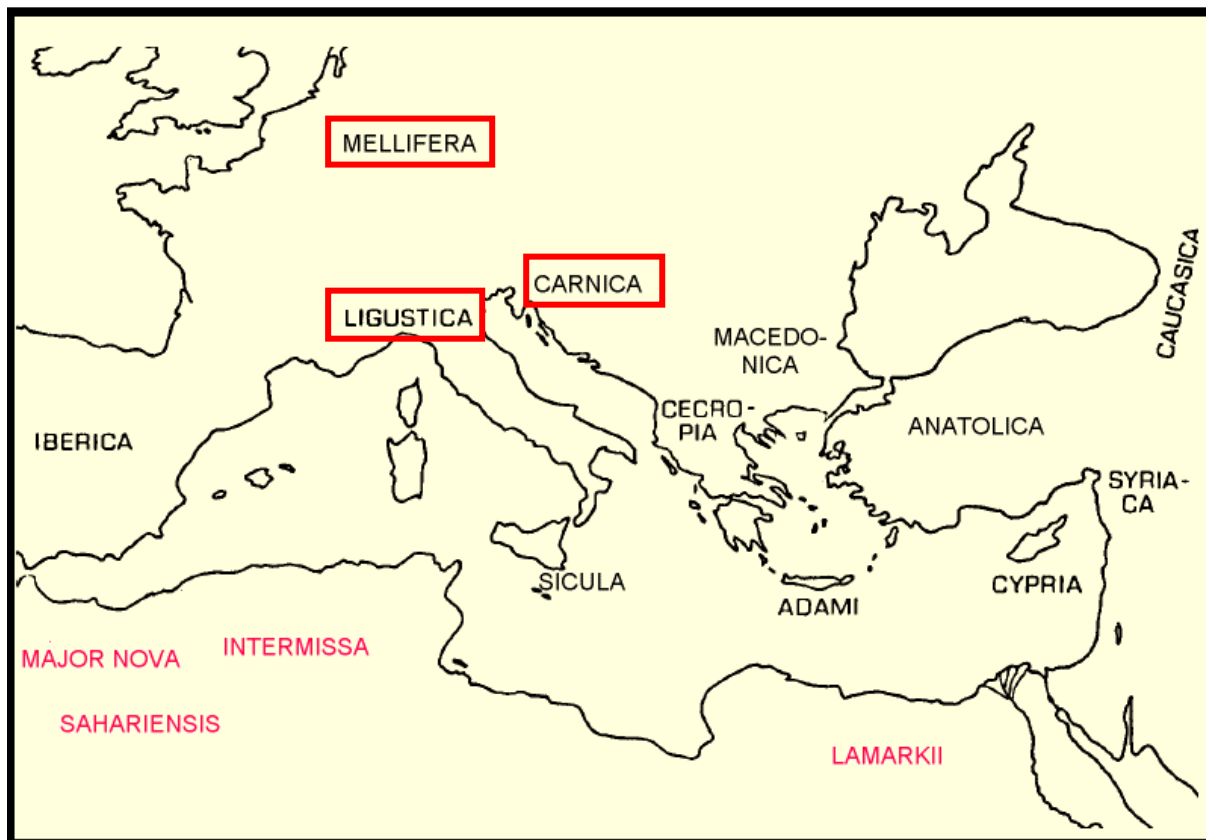


Figure 38 : Aire de répartition des races et variétés d'*Apis mellifera*, en Europe et dans le pourtour méditerranéen (source : Pedigreeapis [en ligne]. Disponible sur : <http://www.pedigreeapis.org/biblio/artcl/HRHonningbien96fr.html> (consulté le 07/07/2016)).

Les effectifs et les noms des abeilles de notre échantillon initial sont détaillés en annexe 8. Le nombre total d'abeilles de l'échantillon initial est de 188.

## **b. De l'ADN jusqu'aux séquences**

Tout le protocole expérimental mis en place de l'ADN jusqu'aux séquences est quasi-identique à celui présenté dans la partie *B. Tests d'amplification et de séquençage* p 185. Par conséquent, nous n'y reviendrons pas, sauf pour énoncer les étapes spécifiques.

### *i. Couples d'amorces utilisés*

Les ADN des 188 abeilles ont été dilués puis l'amplification a été réalisée. Un premier couple d'amorce puis un second, ont été utilisés sur les 188 abeilles. A l'issue de ces PCR, seules 16 abeilles n'avaient pas été amplifiées. Finalement, un 3<sup>ème</sup> et un 4<sup>ème</sup> couple ont été essayés sur ces dernières. Les couples d'amorces utilisés sont présentés dans le tableau 8.

**Tableau 8 : Couples d'amorces de l'étude principale**

Numéro couple d'amorce	Couple amorce		Nb abeilles
	Amorce sens	Amorce antisens	
15	CSD_8110_Up	CSD_8695_Dn	188
6	CSD_10984_Up	CSD_8657_Dn	188
11	CSD_8091_Up	CSD_8695_Dn	16
14	CSD_8110_Up	CSD_8657_Dn	16

A l'issue de l'amplification, des produits PCR ont été finalement obtenus pour 183 des 188 abeilles. Seules 5 abeilles (UK1, UK10, ITA 9, BER 5 et ITSAP 53) n'ont pu être amplifiées malgré l'utilisation de 4 couples d'amorces différents, probablement en raison d'une différence de séquence trop importante par rapport aux amorces, due au polymorphisme.

### *ii. Seconde purification*

Afin d'optimiser la qualité des séquences, les produits PCR ont été choisis sur la base des résultats des électrophorèses (finesse, taille de la bande, pas de bandes multiples, etc.). Chaque produit a été séquençé dans les 2 sens afin d'aboutir plus facilement à une séquence consensus et éventuellement corriger des erreurs. Les réactions de purification Exo/SAP et réaction de Sanger ont été réalisées de la même manière que pour les tests préliminaires.

La seconde purification qui suit la réaction de séquence, a cette fois été réalisée par nos soins. Cette purification consiste à éliminer les excès de ddNTPs fluorescents avant la migration sur un séquenceur automatique. Le détail du mode opératoire est consigné en annexe 9.

### iii. Correction des séquences et de l'alignement

Après le séquençage, les chromatogrammes de chaque séquence nucléotidique ont été corrigés manuellement via le logiciel Chromas® (2.6). Les séquences ont ensuite été alignées avec Clustal Omega (1.2.1) ®. Cet alignement a été corrigé manuellement et édité avec Jalview® (2.9). En définitive, nous avons obtenu des séquences correctes pour 183 abeilles. Ces séquences débutent au sein de l'exon 6 et se terminent au sein de l'exon 8. Elles incluent donc l'intégralité de l'exon 7 (dont la région hypervariable) et des introns 6 et 7.

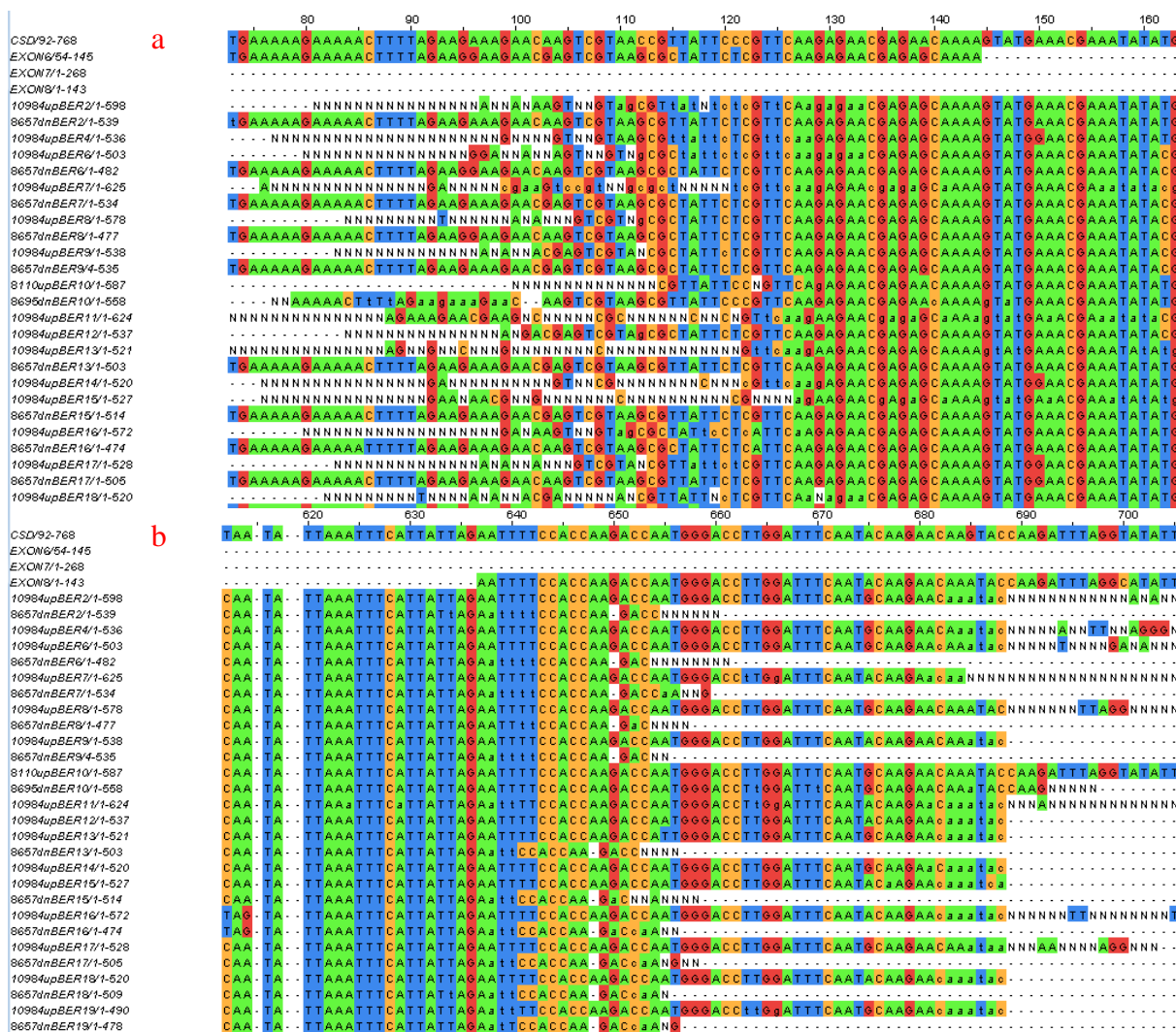


Figure 39 : a. Extrémité 5' des séquences sur l'exon 6. b. Extrémité 3' des séquences sur l'exon 8

Parmi les 183 abeilles, 149 avaient les 2 séquences (sens et anti-sens) exploitables, ce qui a permis de corriger des erreurs plus aisément, ou le plus souvent de confirmer les polymorphismes observés. Après avoir construit des séquences consensus, l'une des deux séquences a été retirée.

Nous avons déterminé des bornes au sein des séquences, de manière à ce qu'elles commencent et se terminent toutes à la même position du gène et de manière à ne pas avoir d'ambiguïté de séquence, pour éviter les faux SNP par exemple. Un jeu de données nettoyé de la sorte était un préalable pour les analyses ultérieures, notamment pour la réalisation d'un arbre phylogénétique.

Ainsi, pour les 34 abeilles restantes dont une seule des 2 séquences (sens et anti-sens) était exploitable, la séquence n'a été conservée dans le jeu de données que si la partie située entre les 2 bornes ne présentait pas d'erreurs sur le chromatogramme. Par chance, c'était le cas des 34 séquences.

### **c. Arbres phylogénétiques**

A partir des séquences obtenues, un arbre phylogénétique a été réalisé selon la méthode NJ (Neighbour-Joining) grâce au logiciel MEGA® (7.0.18) (Kumar et al., 2016). Le but est de comprendre les relations de parenté et de retracer l'historique évolutif du gène *csd* à partir de notre échantillon. Les arbres phylogénétiques sont une très bonne manière de schématiser et d'appréhender ces relations rapidement. La méthode NJ est basée sur le calcul de distances évolutives séparant des séquences homologues. La distance évolutive estimée entre des séquences homologues est une fonction de la divergence observée entre des paires de séquences. Brièvement, plus deux séquences homologues sont différentes, plus la distance évolutive qui les sépare est grande. Or, plus la distance évolutive les séparant est grande, plus les séquences ont divergé il y a longtemps. C'est évidemment l'inverse si deux séquences homologues sont proches. Ainsi, de proche en proche, l'algorithme regroupe les séquences avec une faible distance évolutive en admettant le minimum d'évolution, ce qui aboutit à la réalisation d'un arbre.

Initialement, les séquences utilisées pour générer l'arbre phylogénétique contenaient la région hypervariable ainsi que les différents *indels* (insertion-délétion) et le polymorphisme SNP. Toutefois, le logiciel MEGA® ne tient pas compte en réalité des positions nucléotidiques dès qu'au moins une séquence du jeu de données présente un « gap » (vide). Par conséquent, cela revient à exclure la région hypervariable et les indels.

#### **d. Détection de nouveaux allèles**

Afin de détecter la présence de nouveaux allèles *csd* dans nos séquences, l'ensemble des séquences *csd* disponibles sur GenBank (ADN génomique et ADN complémentaire), soit environ 400 séquences, a été récupéré puis aligné manuellement avec Jalview® (2.9). L'utilisation d'un script R utilisant le package « sidier » a permis de regrouper les séquences identiques et ainsi de détecter parmi nos abeilles les séquences nucléotidiques non présentes dans la base de données. Après traduction en séquences d'acides aminés, nous avons pu établir la présence d'allèles jamais publiés auparavant.

Par ailleurs, nous nous sommes intéressés à la provenance de ces nouveaux allèles. Nous avons ainsi, pour chacune de nos sous-populations, calculé le ratio du nombre de nouveaux allèles sur le nombre d'abeilles de la sous-population.

#### **e. Fréquences alléliques**

L'ensemble des allèles présents chez nos abeilles a été recensé et des calculs de fréquence allélique intra- et inter-population ont été réalisés. Pour une population définie, les fréquences ont été calculées simplement de la manière suivante : nombre de fois où l'allèle est retrouvé dans la population divisé par le nombre d'abeilles dans cette population. Ces estimations de fréquences alléliques sont toutefois peu précises compte-tenu des tailles d'échantillons.

Nous nous sommes également intéressé, pour chaque population, à la longueur de la région HVR : longueur minimale, maximale et moyenne. En effet, la taille de cette région est un facteur de variabilité conduisant à l'hétérozygotie (Lechner et al., 2014).

Enfin, nous avons calculé, pour chaque échantillon, le ratio Nb allèles/Nb abeilles. Celui-ci constitue un estimateur de la diversité allélique de nos sous-populations.

## D. Etude complémentaire

Comme énoncé dans le chapitre 1 introductif, nous avons constaté sur le navigateur de génome Ensembl metazoa® que la séquence de référence d'*Apis mellifera* pour le gène *csd* présentait, dans l'intron 5, une région notée comme inconnue (voir figure 40, cadre rouge) et représentée sous forme d'une séquence de lettres N en nombre aléatoire.

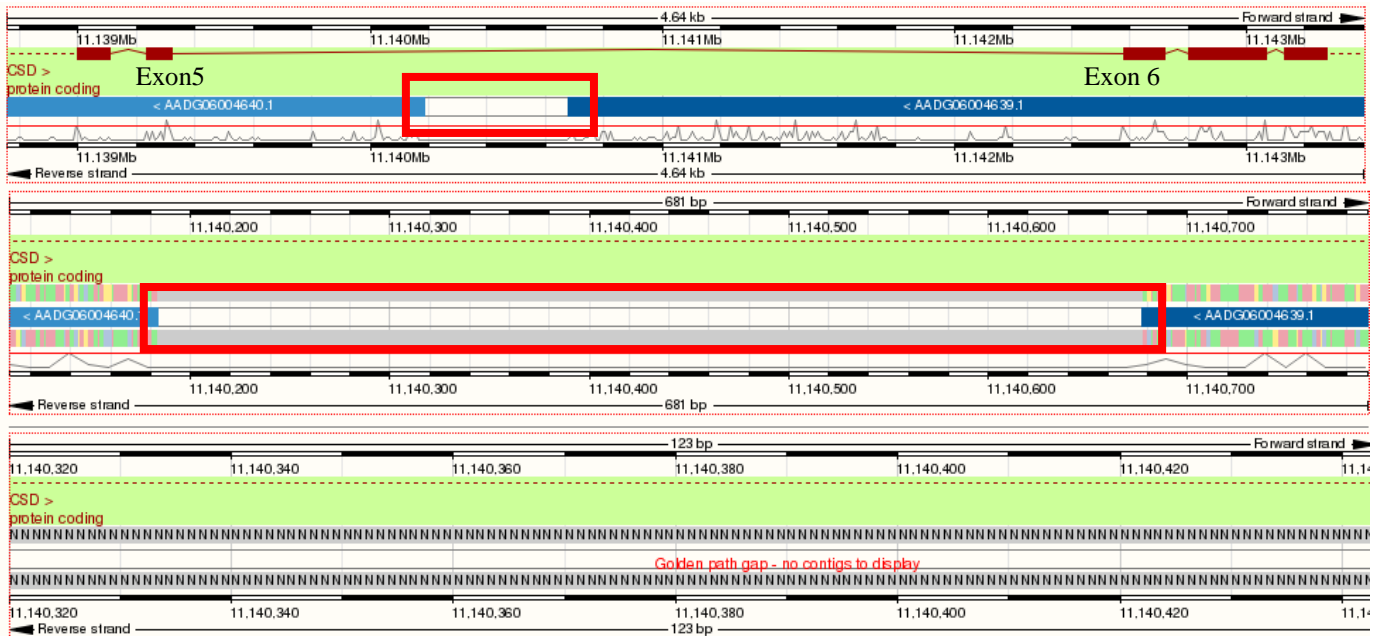


Figure 40 : Région inconnue du gène *csd*, située entre les exons 5 et 6 (vue à 3 échelles différentes). Copie d'écran Ensembl metazoa®, disponible sur : [http://metazoa.ensembl.org/Apis\\_mellifera/Location/View?db=core;g=GB47022;r=3:11139818-11141034;t=GB47022-RA](http://metazoa.ensembl.org/Apis_mellifera/Location/View?db=core;g=GB47022;r=3:11139818-11141034;t=GB47022-RA).

A partir des séquences flanquantes connues, des amorces ont été éditées, de part et d'autre de la région inconnue, grâce au logiciel Primer3® (Untergasser et al., 2012). A l'instar de l'étude principale, des tests préliminaires (amplification et séquençage) ont été réalisés et 9 couples d'amorces ont été essayés avec 8 amorces différentes disposées tout au long de l'intron 5. Ces tests ont été menés selon le même protocole expérimental que pour l'étude principale. Seule la durée du troisième temps d'élongation à 72°C de la PCR a été modifiée, passant de 45s à 2min30s, à cause de la taille plus importante du fragment attendu. En effet, le fragment étant plus long, il faut davantage de temps à la polymérase pour le synthétiser. L'un des couples testés a permis d'amplifier, sur nos 3 abeilles test, un fragment de près de 2000 pb. Ces produits ont été séquencés, avec 4 amorces différentes (les 2 amorces d'amplification et 2 amorces internes), car l'activité de la polymérase chute au bout d'une certaine longueur, conduisant à un signal dégradé dans les chromatogrammes au-delà de 700 pb (voir figure 41).

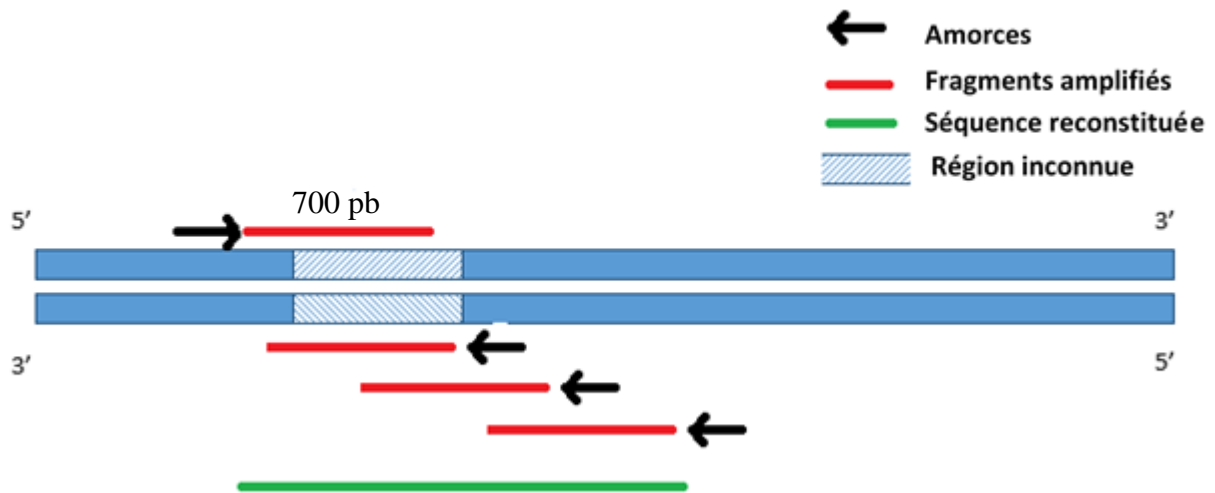


Figure 41 : Stratégie de séquençage pour la région inconnue

L'alignement des différentes séquences chevauchantes a permis une première reconstitution partielle de l'intron 5.

Dans le but d'aboutir à une reconstitution complète de la région inconnue, nous avons sélectionné de manière aléatoire un échantillon d'abeilles dans chaque sous-population des abeilles de l'étude principale, pour un total de 72 abeilles. Le détail des abeilles choisies est présenté en annexe 10. Suite à l'amplification, 10 abeilles parmi les 72 ont été séquencées. Il s'agit des abeilles suivantes :

- OUE4, OUE5, OUE12
- UK18, UK27
- SLO9, SLO10
- BER11
- ITSAP6, ITSAP9

Ces dernières ont été choisies en fonction de la netteté et de l'intensité de la bande observée après révélation aux UV. Chaque abeille a été séquencée avec 4 amorces, les mêmes que pour les tests préliminaires. L'alignement manuel des séquences avec Jalview® (2.9) a permis de reconstituer une séquence consensus complète.

# CHAPITRE 3 : RESULTATS

## A. Description des séquences

A l'issue de l'alignement, nous avons donc 183 séquences correspondant à 183 abeilles. Les bornes communes choisies étaient respectivement situées au sein de l'exon 6 et de l'exon 8 pour une longueur totale de 509 paires de bases. Nos séquences contenaient donc l'intégralité de l'exon 7 ainsi que les introns 6 et 7. Cette longueur de 509 pb ne correspond toutefois à aucune abeille de notre échantillon, il s'agit de la longueur qui permet de visualiser l'ensemble des *indels* et des régions hypervariables. En d'autres termes, c'est le nombre de bases situées entre les 2 bornes pour une abeille hypothétique qui présenterait la totalité des insertions et aucune délétion ainsi que la taille maximale de la région hypervariable observée dans nos échantillons. Inversement, lorsque l'on retire l'intégralité des *indels* et de la région hypervariable, les séquences ne font plus que 330 paires de bases.

Les différences entre séquences sont donc de 3 types : région hypervariable (séquence et taille ; ce qui engendre une forte variation de la taille de l'exon 7), insertions/délétions (Indels) et polymorphisme SNP. Chaque type de mutation est représenté sur la figure 42 (page suivante) à travers des exemples issus de portions de la séquence étudiée.



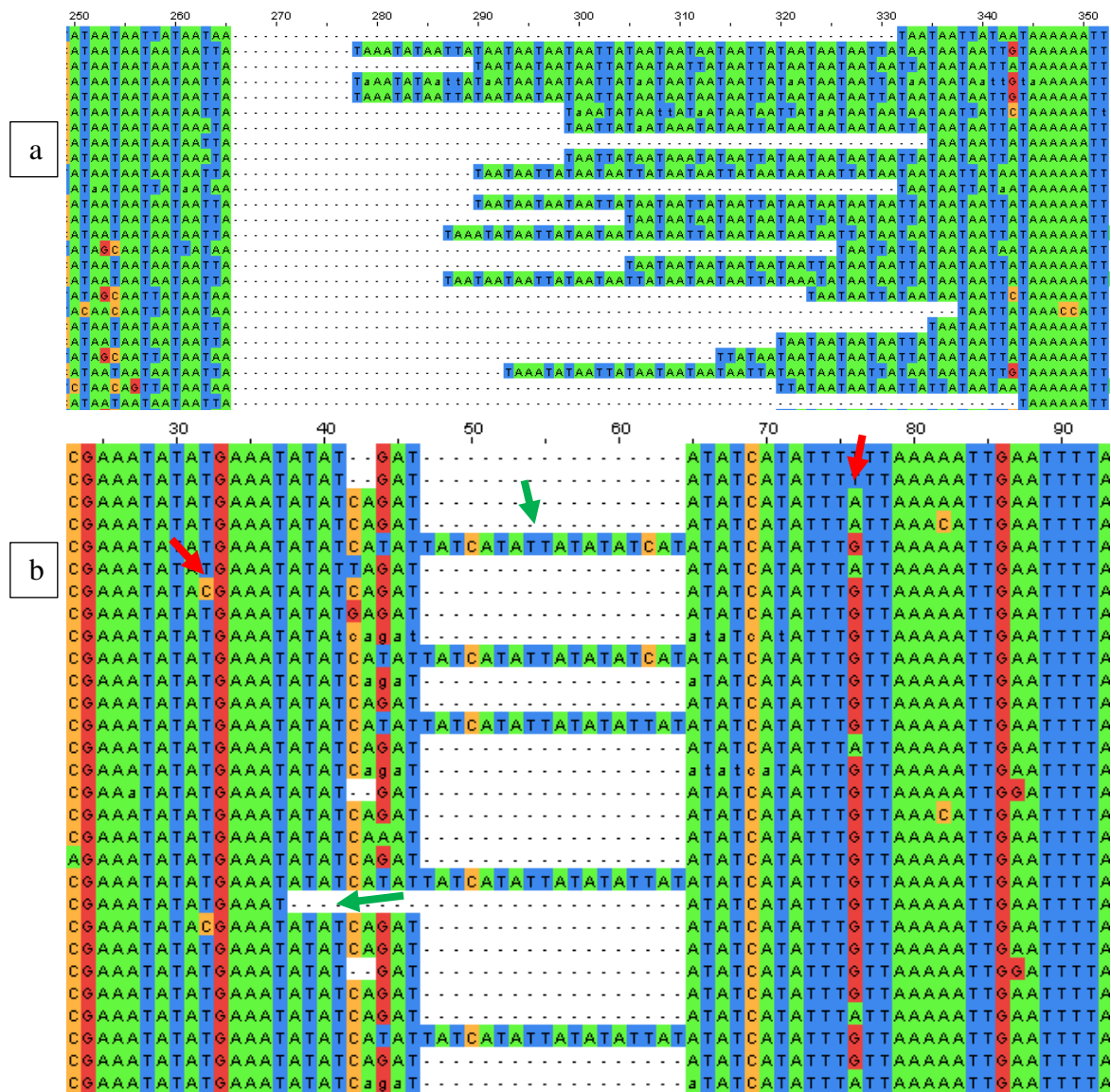


Figure 42 : Polymorphisme des séquences *csd*. a. Région hypervariable b. Insertions/délétions (flèches vertes) et SNP (flèches rouges)

L'étude de la région hypervariable fait l'objet d'une partie séparée (voir p 218). Pour chaque région de nos séquences, le polymorphisme est caractérisé dans le tableau 9 suivant. Le nombre de SNP a chaque fois été compté sur la plus petite partie commune à toutes les séquences.

Tableau 9 : Caractérisation du polymorphisme des séquences *csd*

		Exon 6	Intron 6	Exon 7	Intron 7	Exon 8	Exons (séquence codante)	Introns (séquence non codante)	Total
Taille (pb)	Maximale	15	97	297	63	12	321	158	461
	Minimale	12	68	213	60	9	234	129	372
Polymorphisme	Nb SNP	2	13	74	17	1	77	30	107
	Nb <i>Indels</i>	1	3	11	4	1	13	7	20

Le détail des *indels* est donné dans le tableau 10 suivant. La partie hypervariable n'a pas été comptée comme telle. Par ailleurs, l'attribution du caractère délétion ou insertion découle simplement de la comparaison entre le nombre de séquences où les bases azotées sont présentes et celui où elles sont absentes.

**Tableau 10 : Caractérisation des indels des séquences *csd***

Région	Indels	Taille (pb)	Région	Indels	Taille (pb)	Région	Indels	Taille (pb)
Exon 6	Délétion 1	3	Exon 7	Délétion 4	9	Intron 7	Délétion 10	1
	Délétion 2	9		Insertion 2	9		Insertion 7	1
Intron 6	Insertion 1	18		Délétion 5	6		Délétion 11	2
	Délétion 3	2		Insertion 3	3	Insertion 8	2	
				Délétion 6	3	Exon 8	Délétion 12	3
				Délétion 7	3			
				Insertion 4	6			
				Insertion 5	6			
				Insertion 6	6			
				Délétion 8	3			
			Délétion 9	3				

## B. Structure des populations échantillonnées

Afin d'évaluer la ségrégation des allèles *csd* au sein des abeilles échantillonnées, un arbre phylogénétique a été généré suivant la méthode Neighbour-Joining. Comme vu précédemment dans le Chapitre 2 (Matériel et méthodes), cet arbre (voir annexe 11) ne tient compte en réalité que des différences nucléotidiques de type SNP car il n'utilise pas toute position nucléotidique avec une donnée manquante ou plus.

L'algorithme compare les séquences entre elles et les regroupe de proche en proche. Comme on peut le voir sur l'arbre, il n'existe aucune structure de population basée sur les SNP. Des abeilles d'origine et de race différentes sont regroupées alors qu'inversement les abeilles d'une même sous-population sont séparées dans des branches différentes. C'est-à-dire que les abeilles d'une même sous-population (par exemple « ITA ») ne peuvent être regroupées à partir de leur polymorphisme SNP au locus *csd*. Autrement dit, les SNP observés s'observent indifféremment chez des abeilles de l'île d'Ouessant ou chez des abeilles de Slovénie par exemple et ne sont donc pas spécifiques d'une population. En outre, cela suppose aussi que de nombreux allèles sont probablement partagés entre des abeilles issues de populations différentes.

Par ailleurs, des nombres variant entre 0,5 et 1 sont représentés sur les branches de l'arbre. Il s'agit des valeurs de bootstrap. Ces valeurs sont des estimateurs de la confiance que l'on peut avoir dans telle ou telle branche. En effet, l'arbre est réalisé de manière itérative (ici 500 fois). Pour le premier arbre,  $n$  positions sont choisies aléatoirement parmi les  $m$  positions possibles puis les séquences les plus proches pour ces  $n$  positions sont regroupées. Et cette simulation est réalisée 500 fois. Ainsi une valeur de bootstrap de 0,98 signifie que dans 98% des 500 simulations, cette branche a été obtenue. Par contre, si aucun chiffre n'apparaît, c'est que la valeur de bootstrap est inférieure à 0,5, ce qui veut dire que cette branche n'a été générée que dans un cas sur 2 maximum.

Finalement, ces résultats sont assez peu surprenants. En effet, comme nous l'avons vu dans l'introduction, les séquences se situent dans une région hypervariable et soumise à une forte pression pour muter. Les mutations prennent plusieurs formes possibles et on trouve notamment les SNP. A titre d'exemple, nous avons vu qu'il en existait 107 pour des séquences de 330 paires de bases, soit un nombre très élevé. Et sur ces 107 SNP, 14 sont au moins tri-alléliques, c'est à dire qu'il existe 3 voire 4 nucléotides possibles à cette position ce qui est pourtant assez rare.

Nous pouvons émettre l'hypothèse que ces nombreux SNP se sont fixés par sélection positive et qu'en l'absence de dérive génétique au locus *csd*, ils ont été conservés au cours de l'évolution au sein de populations pourtant éloignés géographiquement. Par conséquent, l'algorithme se retrouve pour ainsi dire « noyé » par l'importante variabilité, devenant inapte à regrouper des abeilles de même population ou au moins de même race. Cet aspect sera abordé plus en détail dans la discussion.

# C. Inventaire des allèles et calculs des fréquences alléliques

## a. Haplotypes et allèles

Pour rappel, nous avons travaillé sur des séquences dont la partie codante varie de 234 à 321 paires de bases tandis que la partie non codante varie de 129 à 158 paires de bases.

Le regroupement des séquences nucléotidiques codantes identiques a permis de dénombrer 77 haplotypes différents parmi les 183 abeilles. Après traduction avec EMBOSS Transeq® (Rice et al., 2000), ces 77 haplotypes résultent finalement en 73 séquences protéiques différentes (voir figure 43).

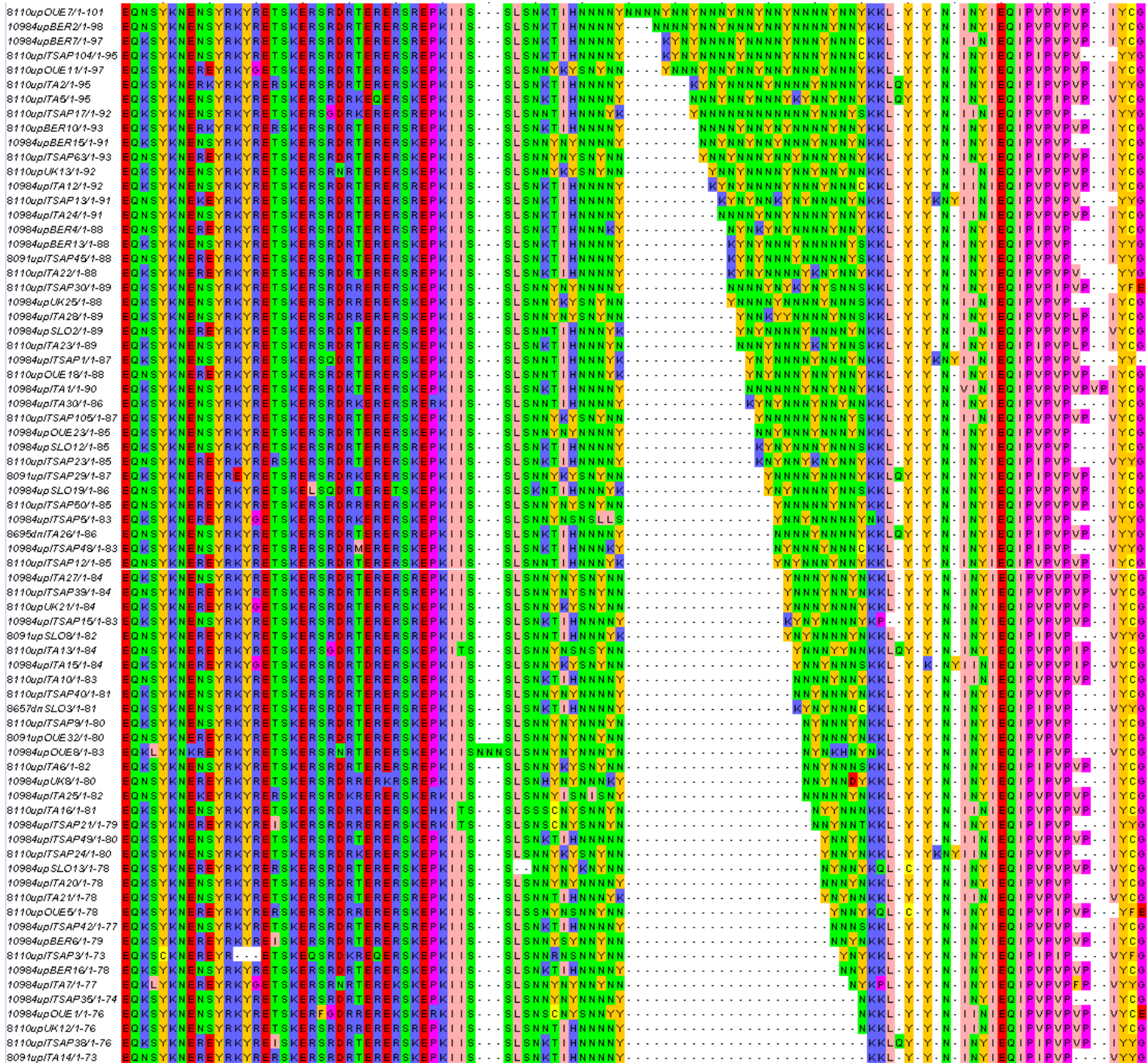


Figure 43 : Les 73 allèles *csd*

Cela signifie donc que la quasi-totalité des différences nucléotidiques observées se traduisent par des différences en acides aminés. Il s'agit donc majoritairement de mutations non-synonymes ce qui va effectivement dans le sens d'une sélection positive, tel qu'énoncé dans l'introduction. Par ailleurs, il est intéressant de remarquer que l'on retrouve les régions riches en acides aminés arginine (R) et sérine (S) du côté N-terminal et proline (P) du côté C-terminal. L'ensemble de ces 73 allèles sont répertoriés dans le tableau 11 page suivante.

**Tableau 11 : Séquences protéiques et fréquences alléliques des 73 allèles csd des abeilles échantillonnées**

Nom allèle	Séquence d'acides aminés de la région HVR	Individus porteurs	Fréquence allélique (/sous-population)						Fréquence allélique pop totale
			ITSAP	OUE	UK	ITA	SLO	BER	
			N=51	N=40	N=26	N=29	N=20	N=17	
Allèle 1	EQNSYKNENSRYRKYRETSKERSRDRTERERSREPKIIS--- SLSNKTIHNNNNYNNNNYNNNNYNNNNYNNNNYNNNNYNNNYKLY-Y-N-INYIEQIPVVPVVP--IYCG	OUE7, OUE20, OUE15, OUE33, OUE38	0	0.125	0	0	0	0	0.027
Allèle 2	EQNSYKNENSRYRKYRETSKERSRDRTERERSREPKIIS--- SLSNKTIHNNNNY---NNNNYNNNNYNNNNYNNNNYNNNYKLY-Y-N-INYIEQIPVVPVVP--IYCG	BER2, ITA17, ITSAP16, UK2, UK3, UK4, UK9, UK14, UK18, UK19, UK20, UK23	0.020	0	0.346	0.034	0	0.059	0.066
Allèle 3	EQKSYKNENSRYRKYRETSKERSRDRTERERSREPKIIS--- SLSNKTIHNNNNY----KYNYNNNNNYNNNNYNNNNYNNCKKLY-Y-N-IINIEQIPVVPVVP--IYCG	BER7, BER9, BER11, BER12	0	0	0	0	0	0.235	0.022
Allèle 4	EQKSYKNENSRYRKYRETSKERSRDRTERERSREPKIIS--- SLSNKTIHNNNNY----KYNYNNNNNYNNNNYNNNNYNNCKKLY-Y-N-INYIEQIPVVPVVP----YYG	ITSAP104, OUE14, OUE40	0.020	0.050	0	0	0	0	0.016
Allèle 5	EQKSYKNEREYRKYGETSKERSRDRTERERSKEPKIIS--- SLSNNYKYSYNN---YNNNNYNNNNYNNNNYNNNNYNNNYKLY-Y-N-INYIEQIPVVPVVP--IYCG	OUE11, OUE36	0	0.050	0	0	0	0	0.011
Allèle 6	EQKSYKNERKYRKYRETSKERSRDRTERERSKEPKIIS--- SLSNKTIHNNNNY-----KYNYNNNNNYNNNNYNNNNYNNKLY-Y-N-INYIEQIPVVPVVP--IYCG	ITA2	0	0	0	0.034	0	0	0.005
Allèle 7	EQKSYKNENSRYRKYRETSKERSRDRKEQERSKEPKIIS--- SLSNKTIHNNNNY-----NNNNYNNNNYNNNNYNNNYKLY-Y-N-INYIEQIPVPIVVP--VYCG	ITA5, OUE27, OUE28, OUE39, SLO18, OUE4, OUE17	0	0.125	0	0.034	0.050	0	0.038
Allèle 8	EQKSYKNENSRYRKYRETSKERSGDRKERERSREPKIIS--- SLSNNTIHNNNNY-----YNNNNNNNNNNNNNNNNYSKLY-Y-N-IINIEQIPVVPVVP----IYCG	ITSAP17	0.020	0	0	0	0	0	0.005
Allèle 9	EQKSYKNERKYRKYRETSKERSRDRTERERSREPKIIS--- SLSNKTIHNNNNY-----NNNNYNNNNYNNNNYNNNYKLY-Y-N-INYIEQIPVVPVVP--IYCG	BER10, BER21, ITSAP2, ITSAP20, ITSAP31, ITSAP54, ITSAP65, OUE2	0.098	0.025	0	0	0	0.118	0.044
Allèle 10	EQKSYKNENSRYRKYRETSKERSRDRTERERSKEPKIIS--- SLSNNYNNNNYNNNNYNNNNYNNNNYNNNYKLY-Y-N-INYIEQIPVVPVVP----IYCG	BER15, BER18, ITA18, ITSAP61	0.020	0	0	0.034	0	0.118	0.022
Allèle 11	EQNSYKNEREYRKYRETSKERSRDRTERERSKEPKIIS--- SLSNNYNSYNN---YNNNNYNNNNYNNNNYNNNYKLY-Y-N-INYIEQIPVVPVVP--IYCG	ITSAP63	0.020	0	0	0	0	0	0.005

Allèle 12	EQKSYKNENSYRKYRETSKERSRNRTERERSKEPKIIS--- SLSNNYKYSYNN-----YNNYNNNNYNNYNNNKKL-Y-Y-N-IINIEQIPVVPV--IYCG	UK13, UK15, UK27	0	0	0.115	0	0	0	0	0.016
Allèle 13	EQKSYKNENSYRKYRETSKERSRDRTERERSREPKIIS--- SLSNKTIHNNNNY-----KYNYNNNYNNYNNNCKKL-Y-Y-N-IINIEQIPVVPV--IYCG	ITA12	0	0	0	0.034	0	0	0	0.005
Allèle 14	EQNSYKNEKEYRKYRETSKERSRDRTERERSREPKIIS--- SLSNKTIHNNNNY-----KYNYNKNYNNNNYNNKKL-Y-YKNIINIEQIPVVPV---YYG	ITSAP13	0.020	0	0	0	0	0	0	0.005
Allèle 15	EQNSYKNENSYRKYRETSKERSRDRTERERSREPKIIS--- SLSNKTIHNNNNY-----NNNNYNNYNNNNYNNYKKL-Y-Y-N-IINIEQIPVVPV--IYCG	ITA24, SLO17	0	0	0	0.034	0.050	0	0	0.011
Allèle 16	EQNSYKNERYRKYRETSKERSRDRTERERSREPKIIS--- SLSNKTIHNNNKY-----NYNKYNNNNYNNYKKL-Y-Y-N-INYIEQIPVVPV---IYCG	BER4, BER14, BER17, ITSAP18, ITSAP64	0.039	0	0	0	0	0	0.176	0.027
Allèle 17	EQKSYKNENSYRKYRETSKERSRDRTERERSKEPKIIS--- SLSNKTIHNNNNY-----KYNYNNNYNNNNYSKKL-Y-Y-N-INYIEQIPVVPV---IYYG	BER13, ITSAP7	0.020	0	0	0	0	0	0.059	0.011
Allèle 18	EQNSYKNERYRKYRETSKERSRDRTERERSKEPKIIS--- SLSNKTIHNNNNY-----KYNYNNNYNNNNYSKKL-Y-Y-N-INYIEQIPVVPV---IYYG	ITSAP103, ITSAP45	0.039	0	0	0	0	0	0	0.011
Allèle 19	EQKSYKNERYRKYRETSKERSRDRTERERSREPKIIS--- SLSNKTIHNNNNY-----KYNYNNNYNNYNNYKKL-Y-Y-N-INYIEQIPVVPV---YYG	ITA22, SLO5	0	0	0	0.034	0.050	0	0	0.011
Allèle 20	EQKSYKNENSYRKYRETSKERSRDRTERERSKEPKIIS--- SLSNNYNNYNNNY-----NNNNYNYKYNNSKKL-Y-Y-N-INYIEQIPVVPV---YFE	ITSAP30	0.020	0	0	0	0	0	0	0.005
Allèle 21	EQKSYKNENSYRKYRETSKERSRDRTERERSKEPKIIS--- SLSNNYKYSYNN-----YNNNNYNNNNNSKKL-Y-Y-N-IINIEQIPVVPV---IYCG	UK25, UK26, UK16, OUE10, OUE25, OUE26, OUE31, OUE34, OUE37, UK5, UK6, UK7	0	0.150	0.231	0	0	0	0	0.066
Allèle 22	EQKSYKNENSYRKYRETSKERSRDRTERERSKEPKIIS--- SLSNNYNSYNN-----YNNKYNNNNYNNNSKKL-Y-Y-N-INYIEQIPVVPVPLP--IYCG	ITA28, OUE24	0	0.025	0	0.034	0	0	0	0.011
Allèle 23	EQNSYKNERYRKYRETSKERSRDRTERERSREPKIIS--- SLSNNTIHNNNYK-----YNNNNYNNNNYNNKKL-Y-Y-N-IINIEQIPVVPV--VYCG	SLO2, SLO4, SLO15, ITSAP28	0.020	0	0	0	0.150	0	0	0.022
Allèle 24	EQKSYKNENSYRKYRETSKERSRDRTERERSKEPKIIS--- SLSNKTIHNNNNY-----NNNNYNNYNNNSKKL-Y-Y-N-INYIEQIPVVPVPLP--IYCG	ITA23, SLO14, ITSAP52	0.020	0	0	0.034	0.050	0	0	0.016
Allèle 25	EQKSYKNENSYRKYRETSKERSQDRTERERSKEPKIIS--- SLSNNTIHNNNYK-----YNNNNYNNNNYNNKKL-Y-YKNIINIEQIPVVPV---YY-	ITSAP1	0.020	0	0	0	0	0	0	0.005



Allèle 26	EQNSYKNERYRKYRETSKERSRDRTERERSKEPKIIS--- SLSNNTIHNNNYK-----YNYNNNNYNNYNYKKL-Y-Y-N-INYIEQIPVVPVVP--IYCG	OUE18, OUE6, OUE21, OUE22, OUE35	0	0.125	0	0	0	0	0	0.027
Allèle 27	EQKSYKNENSYRKYRETSKERSRDKTERERSKEPKIIS--- SLSNKTIHNNNNY-----NNNNNNYNNYNYKKL-Y-Y-N-VINIEQIPVVPVVPVIYCG	ITA1, ITA4	0	0	0	0.069	0	0	0	0.011
Allèle 28	EQKSYKNENSYRKYRETSKERSRDRKERERSRERKIIS--- SLSNNTIHNNNYK-----KYNYNNNYNNYNNKKL-Y-Y-N-INYIEQIPVVPV---IYCG	ITA30	0	0	0	0.034	0	0	0	0.005
Allèle 29	EQKSYKNENSYRKYRETSKERSRDRTERERSKEPKIIS--- SLSNNYKYSYNN-----YNNNNYNNNYSKKL-Y-Y-N-IINIEQIPVVPVVP--VYCG	ITSAP105	0.020	0	0	0	0	0	0	0.005
Allèle 30	EQKSYKNENSYRKYRETSKERSRDRTERERSKEPKIIS--- SLSNNYNNNNY-----NNYNNNNYNNYKKL-Y-Y-N-INYIEQIPVVPV---IYCG	OUE23, SLO1, SLO10	0	0.025	0	0	0.100	0	0	0.016
Allèle 31	EQKSYKNENSYRKYRETSKERSRDRTERERSREPKIIS--- SLSNKTIHNNNNY-----KYNYNNNYNNNSKKL-Y-Y-N-INYIEQIPVVPV---IYCG	SLO12	0	0	0	0	0.050	0	0	0.005
Allèle 32	EQNSYKNERYRKYRETSKERSRDRTERERSKEPKIIS--- SLSNKTIHNNNNY-----KNYNNYKYNYYKKL-Y-Y-N-INYIEQIPVVPV---VYCG	ITSAP23	0.020	0	0	0	0	0	0	0.005
Allèle 33	EQKSYKNERYREYRETSRERSRDRKERERSKEPKIIS--- SLSNNYKYSYNN-----YNNNNYNNNYKKLQY-Y-N-INYIEQIPVVPV--IYCG	ITSAP29, ITSAP55	0.039	0	0	0	0	0	0	0.011
Allèle 34	EQNSYKNERYRKYRETSKELSQRTERETSKEPKIIS--- SLSKNTIHNNNYK-----YNYNNNNYNNNSKKL-Y-Y-N-INYIEQIPVVPVVP--IYCG	SLO19, SLO6, SLO7	0	0	0	0	0.150	0	0	0.016
Allèle 35	EQNSYKNERYRKYRETSKERSRDRRERERSKEPKIIS--- SLSNNYNSYNN-----YNNNNYNNYKKL-Y-Y-N-INYIEQIPVVPVVP--IYCG	ITSAP50, ITA11	0.020	0	0	0.034	0	0	0	0.011
Allèle 36	EQKSYKNERYRKYGETSKERSRDRKERERSKEPKIIS--- SLSNNYNSNLS-----YNNYNNNNYKLY-Y-N-INYIEQIPVVPV---VYCG	ITSAP5	0.020	0	0	0	0	0	0	0.005
Allèle 37	EQNSYKNENSYRKYRETSKERSRDRTERERSREPKIIS--- SLSNKTIHNNNNY-----NNNNYNNNYKKLQY-Y-N-INYIEQIPVVPV--IYCG	ITA26, ITA19, ITSAP37	0.020	0	0	0.069	0	0	0	0.016
Allèle 38	EQKSYKNENSYRKYRETSRERSRDRMERERSKEPKIIS--- SLSNKTIHNNNY-----NYNNYNNNCKKL-Y-Y-N-INYIEQIPVVPV---VYCG	ITSAP48, SLO9	0.020	0	0	0	0.050	0	0	0.011
Allèle 39	EQNSYKNERYRKYRETSKERSRDRTERERSKEPKIIS--- SLSNNTIHNNNYK-----YNYNNNNYNYKKL-Y-Y-N-INYIEQIPVVPVVP--IYCG	ITSAP12, ITSAP51	0.039	0	0	0	0	0	0	0.011

Allèle 40	EQKSYKNENSYRKYRETSKERSRDRTERERSREPKIIS--- SLSNNYNYSNYNN-----YNNNNYNNKKL-Y-Y-N-INYIEQIPVPVPV--VYCG	ITA27	0	0	0	0.034	0	0	0.005
Allèle 41	EQNSYKNERYRKYRETSKERSRDRTERERSREPKIIS--- SLSNNYNYSNYNN-----YNNNNYNNKKL-Y-Y-N-INYIEQIPVPVPV--VYCG	ITSAP39	0.020	0	0	0	0	0	0.005
Allèle 42	EQKSYKNERYRKYGETSKERSRDRTERERSKEPKIIS--- SLSNNYKYSNYNN-----YNNNNYNNKKL-Y-Y-N-INYIEQIPVPVPV--IYCG	UK21, UK28, UK29	0	0	0.115	0	0	0	0.016
Allèle 43	EQKSYKNENSYRKYRETSKERSRDRTERERSREPKIIS--- SLSNKTIHNNNNY-----KYNNNNNYKPL--Y-Y-N-INYIEQIPVPVPV--IYCG	ITSAP15, ITSAP25, UK17, SLO16	0.039	0	0.038	0	0.050	0	0.022
Allèle 44	EQNSYKNERYRKYRETSKERSRDRTERERSREPKIIS--- SLSNNTIHNNNNY-----YNNNNYNNKKL-Y-Y-N-INYIEQIPVPV---VYYG	SLO8	0	0	0	0	0.050	0	0.005
Allèle 45	EQNSYKNERYRKYRETSKERSRDRTERERSKEPKITS--- SLSNNYNSNSYNN-----YNNNNYNNKQLY-Y-N-INYIEQIPVPVPIV--IYCG	ITA13	0	0	0	0.034	0	0	0.005
Allèle 46	EQKSYKNERYRKYGETSKERSRDRTERERSKEPKIIS--- SLSNNYKYSNYNN-----YNNNNNSKKL-Y-K-N-IYIIEQIPVPVPIV--VYCG	ITA15, OUE13	0	0.025	0	0.034	0	0	0.011
Allèle 47	EQNSYKNENSYRKYRETSKERSRDRTERERSREPKIIS--- SLSNKTIHNNNNY-----NNNNYNNKKL-Y-Y-N-IINIEQIPVPVPV--IYCG	ITA10, ITSAP36	0.020	0	0	0.034	0	0	0.011
Allèle 48	EQKSYKNENSYRKYRETSKERSRDRTERERSKEPKIIS--- SLSNNYNNNNNNY-----NNNNYNNKKL-Y-Y-N-INYIEQIPVPV---IYCG	ITSAP40	0.020	0	0	0	0	0	0.005
Allèle 49	EQKSYKNENSYRKYRETSKERSRDRTERERSREPKIIS--- SLSNKTIHNNNNY-----KYNNNNCKKL-Y-Y-N-INYIEQIPVPV---VYYG	SLO3, SLO11	0	0	0	0	0.100	0	0.011
Allèle 50	EQKSYKNENSYRKYRETSKERSRDRTERERSKEPKIIS--- SLSNNYNNNNNNY-----NYNNYNNKKL-Y-Y-N-INYIEQIPVPVP---IYCG	ITSAP9, ITSAP60	0.039	0	0	0	0	0	0.011
Allèle 51	EQNSYKNERYRKYRETSKERSRDRTERERSKEPKIIS--- SLSNNYNNNNNNY-----NYNNYNNKKL-Y-Y-N-INYIEQIPVPVP---IYCG	OUE32	0	0.025	0	0	0	0	0.005
Allèle 52	EQKLYKNKREYRKYRETSKERSRDRTERERSKEPKIISNNN SLSNNYNNNNNNY-----NYNKHNNKLY-Y-N-INYIEQIPVPV---VYCG	OUE8, OUE16	0	0.050	0	0	0	0	0.011
Allèle 53	EQKSYKNENSYRKYRETSKERSRDRTERERSREPKIIS--- SLSNNYKYSNYNN-----NNNNNSKKL-Y-Y-N-INYIEQIPVPVPV--IYCG	ITA6	0	0	0	0.034	0	0	0.005

Allèle 54	EQNSYKNEREYRKYRETSKERSRDRRERKRSREPKIIS--- SLSNHYNYNNNKY-----NNYNNDYKKL-Y-Y-N-INYIEQIPVPV---IYCG	UK8	0	0	0.038	0	0	0	0	0.005
Allèle 55	EQNSYKNEKEYRKYRETSKERSRDRRERERSKERKIIS--- SLSNNYISNISNY-----NNNNNYNKKL-Y-Y-N-INYIEQIPVPVVP---IYCG	ITA25	0	0	0	0.034	0	0	0	0.005
Allèle 56	EQKSYKNENSYRKYRETSKERSRDRRERERSKEHKITS--- SLSSSCNYSNNYN-----NYNNNKKL-Y-Y-N-IINIEQIPVPVVP---IYCG	ITA16, ITA3, ITSAP8	0.020	0	0	0.069	0	0	0	0.016
Allèle 57	EQKSYKNEREYRKYREISKERSRDRRERERSKERKITS--- SLSNSCNYSNNYN-----NNYNNTKKL-Y-Y-N-INYIEQIPVPV---IYCG	ITSAP21	0.020	0	0	0	0	0	0	0.005
Allèle 58	EQKSYKNENSYRKYRETSKERSRDRTERERSKEPKIIS--- SLSNKTIHNNNNN-----YNNYNKKL-Y-Y-N-IINIEQIPVPVVP---IYCG	ITSAP49	0.020	0	0	0	0	0	0	0.005
Allèle 59	EQKSYKNENSYRKYRETSKERSRDRRERERSKEPKIIS--- SLSNNYKYSNNYN-----YNNYNKKL-Y-Y-N-IINIEQIPVPV---IYCG	ITSAP24, OUE30	0.020	0.025	0	0	0	0	0	0.011
Allèle 60	EQKSYKNEREYRKYRETSKERSRDRTERERSKEPKIIS--- S--NNYNYKNYNN-----NYNNYKQL-C-Y-N-INYIEQIPVPVVP---VYCG	SLO13	0	0	0	0	0.050	0	0	0.005
Allèle 61	EQKSYKNENSYRKYRETSKERSRDRTERERSKEPKIIS--- SLSNNYNNNNNY-----NNNYNKKL-Y-Y-N-INYIEQIPVPV---IYCG	ITA20	0	0	0	0.034	0	0	0	0.005
Allèle 62	EQKSYKNENSYRKYRETSKERSRDRTERERSREPKIIS--- SLSNNTIHNNNYK-----YNNYNKKL-Y-Y-N-IINIEQIPVPV---VYCG	ITA21	0	0	0	0.034	0	0	0	0.005
Allèle 63	EQKSYKNEREYRKYRETSKERSRDRRERERSKEPKIIS--- SLSNYSNNYNN-----YNNYKQL-C-Y-N-INYIEQIPVPV---YFE	OUE5, OUE12, OUE19, OUE29	0	0.100	0	0	0	0	0	0.022
Allèle 64	EQKSYKNENSYRKYRETSKERSRDRTERERSREPKIIS--- SLSNKTIHNNNNY-----NNNSKKL-Y-Y-N-INYIEQIPVPV---IYCG	ITSAP42	0.020	0	0	0	0	0	0	0.005
Allèle 65	EQKSYKNEREYRKYREISKERSRDRTERERSKEPKIIS--- SLSNNYSNNYNN-----NNYNKKL-Y-Y-N-INYIEQIPVPVVP---IYCG	BER6, BER8, BER19	0	0	0	0	0	0	0.176	0.016
Allèle 66	EQKSCKNEREYR---ETSKEQSRDKREQERSKEPKIIS--- SLSNNRNSNNYNN-----YNYKQL-Y-Y-N-INYIEQIPVPI---VYFG	ITSAP3, ITSAP6, ITSAP10	0.059	0	0	0	0	0	0	0.016
Allèle 67	EQKSYKNENSYRKYRETSKERSRDRTERERSKEPKIIS--- SLSNKTIHNNNNY-----NNYKQL-Y-Y-N-INYIEQIPVPVVP---IYCG	BER16, ITA8, ITA29, ITSAP11	0.020	0	0	0.069	0	0.059	0	0.022

Allèle 68	EQKLYKNEREYRKYGETSKERSRNRTEREKSKEPKIIS--- SLSNNYNNYNNYNN-----NYKPL-Y-Y-N-INYIEQIPVVPVFP--VYYG	ITA7, OUE9, UK11	0	0.025	0.038	0.034	0	0	0.016
Allèle 69	EQKSYKNENSYRKYRETSKERSRDRTERERSKEPKIIS--- SLSNNYNNYNNYNN-----NKKL-Y-Y-N-INYIEQIPVVPV----IYCG	ITSAP35, ITSAP43	0.039	0	0	0	0	0	0.011
Allèle 70	EQKSYKNENSYRKYRETSKERFGDRREREKSKEPKIIS--- SLSNSCNSYNNY-----NKKL-Y-Y-N-IINIEQIPVVPV--VYCE	OUE1, OUE3	0	0.050	0	0	0	0	0.011
Allèle 71	EQKSYKNENSYRKYRETSKERSRDRRERERSREPKIIS--- SLSNNTIHNNYNN-----NKKL-Y-Y-N-IINIEQIPVVPV--IYCG	UK12, UK22	0	0	0.077	0	0	0	0.011
Allèle 72	EQKSYKNEREYRKYREISKERSRDRTERERSKEPKIIS--- SLSNKTIHNNYNN-----KKLQY-Y-N-INYIEQIPVVPV--IYYG	ITSAP38, SLO20	0.020	0	0	0	0.050	0	0.011
Allèle 73	EQNSYKNEREYRKYRERSKERSRDRTERERSKEPKIIS--- SLSNKTIHNNYNN-----KKL-Y-Y-N-INYIEQIPVVP----VYYG	ITA14, ITSAP46, ITSAP47	0.039	0	0	0.034	0	0	0.016

La comparaison aux séquences de la base de référence GenBank a permis d'identifier 25 nouveaux allèles parmi les 73 totaux (en vert sur la première colonne du tableau 11). Les différences entre allèles sont de plusieurs ordres :

- Différence de taille, notamment au sein de la région à motif répété
- Substitutions d'acides aminés

Pour chaque sous-population de notre échantillon, les fréquences alléliques intra- et inter-population ont été calculées. Ces fréquences figurent à titre indicatif dans le tableau 11. Sont également représentés les individus porteurs pour chaque allèle. Comme on pouvait s'y attendre suite à la réalisation de l'arbre phylogénétique, des allèles identiques sont régulièrement retrouvés chez au moins deux populations différentes et parfois davantage. Ainsi, sur nos 73 allèles, 26 sont partagés entre plusieurs sous-populations, soit 35,6% de notre échantillon. Si on regarde dans un second temps à l'échelle raciale, c'est-à-dire en regroupant les abeilles « UK » et « OUE » d'une part (*A. mellifera mellifera*) et les abeilles « SLO » et « BER » d'autre part (*A. mellifera carnica*), on observe que 13 allèles sont partagés entre plusieurs sous-espèces, soit 17,8% des allèles.

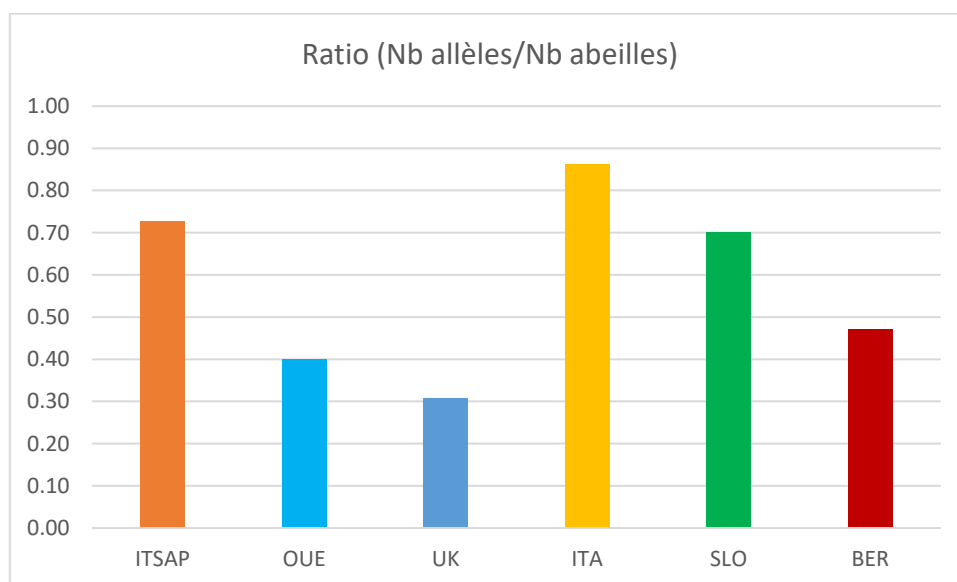
Ce résultat peut s'expliquer de plusieurs manières. Il traduit d'une part le fait que certains allèles sont très anciens chez *Apis mellifera*, et sont apparus avant la séparation des races et des populations, y compris pour des populations insulaires isolées. *A fortiori* car ces populations ne sont pas isolées depuis longtemps à l'échelle de l'évolution. Par exemple, les abeilles noires de l'île d'Ouessant ont été réintroduites en 1978 à partir d'un échantillon d'abeilles noires bretonnes. L'autre hypothèse, est que ces allèles soient apparus indépendamment chez des populations différentes. Le fait d'avoir des SNP tri-alléliques suppose que plusieurs mutations au même site sont possibles. Et donc que des réversions ne sont pas à exclure. Mais cela reste moins probable.

## b. Etude de la diversité allélique des sous-populations

Après avoir recensé la totalité des allèles présents dans nos populations, il était intéressant de regarder combien d'allèles étaient présents dans chaque sous-population et de rapporter ce nombre à celui du nombre d'individus de l'échantillon. Ainsi, un rapport « Nombre d'allèles dans la population » / « Nombre d'abeilles de l'échantillon » pour cette population, a été calculé (voir tableau 12 et figure 44).

**Tableau 12 : Nombre d'allèles dans chaque sous-population de notre échantillon**

Population	ITSAP	OUE	UK	ITA	SLO	BER
Nb allèles	37	16	8	25	14	8
Nb abeilles	51	40	26	29	20	17
Ratio (Nb allèles/Nb abeilles)	0.73	0.40	0.31	0.86	0.70	0.47



**Figure 44 : Variabilité allélique des sous-populations**

On observe que la variabilité allélique la plus faible concerne les 2 populations insulaires d'abeille noire (« UK » et « OUE » ; *A. mellifera mellifera*) avec un ratio respectif de 0,31 et 0,40. Brièvement, des tests statistiques de comparaison de deux proportions ont été réalisés avec la fonction `prop.test` de R. Ils ont permis de conclure qu'il existait un effet de la sous-population sur la diversité allélique ( $p\text{-value} = 2,038 \cdot 10^{-5}$  ; voir figure 45).

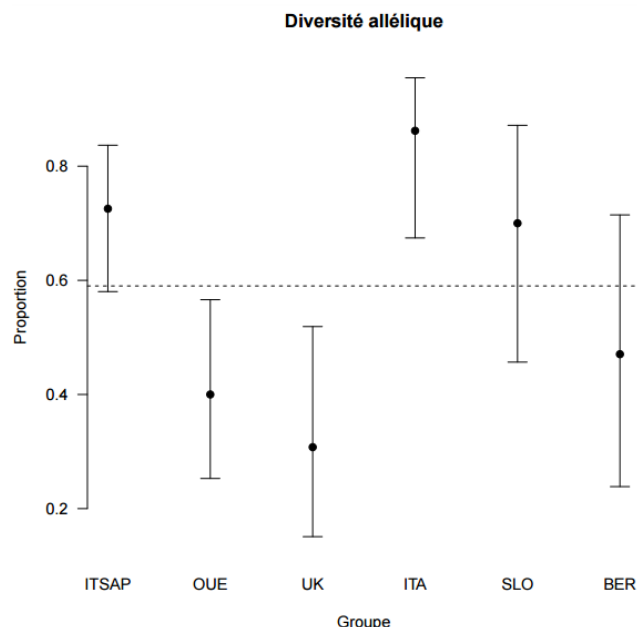


Figure 45 : Intervalles de confiance à 95% des ratios estimateurs de diversité allélique

Ces résultats peuvent être interprétés de plusieurs manières. Les îles d'Ouessant (France) et de Colonsay (Ecosse, Royaume-Uni) mesurant respectivement 15 et 40 km<sup>2</sup>, il serait séduisant de conclure que cela traduit l'existence de consanguinité chez les abeilles insulaires. Néanmoins, il existe probablement un biais d'échantillonnage. En effet, afin de collecter sur ces petites îles un nombre important d'abeilles en respectant la condition d'une seule abeille par colonie, ces dernières ont été tirées de ruchers très proches voire des mêmes ruchers, ce qui peut expliquer la faible variabilité allélique observée. En particulier pour les abeilles d'Ouessant pour lesquelles 40 abeilles ont été sélectionnées alors qu'il n'existe que 150 ruches sur l'île (source : Association Conservatoire de l'abeille noire bretonne).

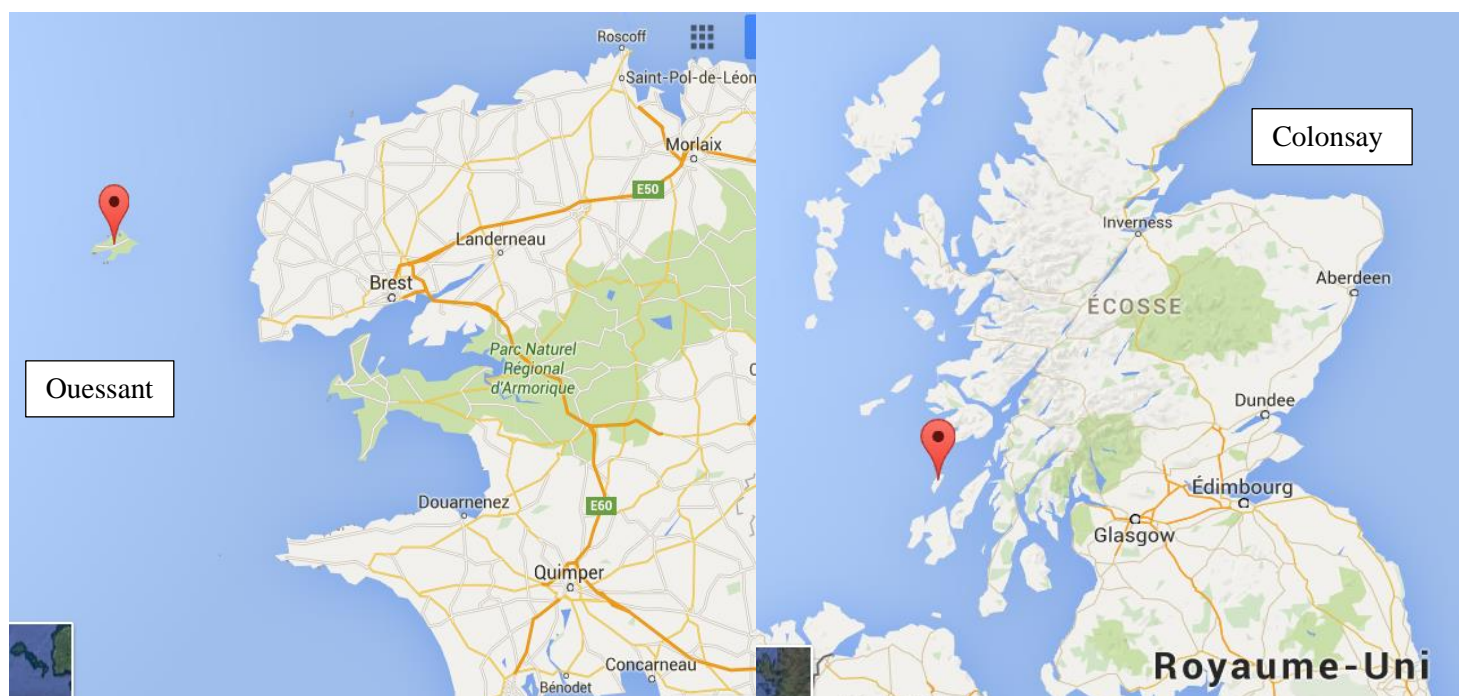


Figure 46 : Localisation des îles d'Ouessant et de Colonsay (source : Google maps)

### **c. Etude des nouveaux allèles**

Pour les allèles n'ayant jamais été découverts (ou publiés) jusqu'ici, nous nous sommes intéressés à leur répartition au sein des sous-populations (voir tableau 13, page suivante). Il s'avère que les nouveaux allèles sont présents majoritairement chez des abeilles « ITSAP ». Rappelons qu'elles sont de races diverses, souvent hybrides et de provenance variée. Or, cette population est aussi celle pour laquelle le nombre d'individus de l'échantillon est le plus important.



**Tableau 13: Répartition des nouveaux allèles au sein des sous-populations**

Nom allèle	Individus porteurs	Nombre d'occurrences/population					
		ITSAP	OUE	UK	ITA	SLO	BER
		N=51	N=40	N=26	N=29	N=20	N=17
Allèle 1	OUE7, OUE20, OUE15, OUE33, OUE38		5				
Allèle 3	BER7, BER9, BER11, BER12						4
Allèle 4	ITSAP104, OUE14, OUE40	1	2				
Allèle 5	OUE11, OUE36		2				
Allèle 8	ITSAP17	1					
Allèle 10	BER15, BER18, ITA18, ITSAP61	1			1		2
Allèle 12	UK13, UK15, UK27			3			
Allèle 13	ITA12				1		
Allèle 15	ITA24, SLO17				1	1	
Allèle 17	BER13, ITSAP7	1					1
Allèle 18	ITSAP103, ITSAP45	2					
Allèle 19	ITA22, SLO5				1	1	
Allèle 25	ITSAP1	1					
Allèle 26	OUE18, OUE6, OUE21, OUE22, OUE35		5				
Allèle 28	ITA30				1		
Allèle 30	OUE23, SLO1, SLO10		1			2	
Allèle 38	ITSAP48, SLO9	1				1	
Allèle 39	ITSAP12, ITSAP51	2					
Allèle 41	ITSAP39	1					
Allèle 42	UK21, UK28, UK29			3			
Allèle 50	ITSAP9, ITSAP60	2					
Allèle 51	OUE32		1				
Allèle 58	ITSAP49	1					
Allèle 62	ITA21				1		
Allèle 64	ITSAP42	1					
Nb d'individus porteurs de nouveaux allèles		15	16	6	6	5	7
Nb nouveaux allèles/population		12	6	2	6	4	3
Nb abeilles échantillon		51	40	26	29	20	17
Ratio (Nb nouveaux allèles/ Nb abeilles)		0.24	0.15	0.08	0.21	0.20	0.18

Rapporté au nombre d'abeilles de chaque sous-population (figure 47), c'est tout de même chez la population « ITSAP » que les nouveaux allèles sont les plus nombreux. Ces dernières ayant été prélevées dans des ruchers de la France entière, il est probable qu'une partie de ces abeilles, isolées, n'avaient, jusqu'alors, jamais été étudiées pour ce locus. Et étant donné qu'elles sont d'origines très variées, il est fort probable qu'elles présentent des introgressions de races étrangères lointaines (par exemple du Caucase) d'où le résultat observé. En revanche, il est plus surprenant d'observer un ratio si faible pour les abeilles noires insulaires, qui, à notre connaissance, n'ont jamais été étudiées au locus *csd*. En particulier pour les « UK » qui n'ont pas, *a priori*, été introduites récemment sur leur île éloignée du continent. En première intention, on aurait pu s'attendre, malgré la faible diversité allélique, à ce qu'une bonne proportion des allèles présents soient nouvellement découverts. Toutefois, compte-tenu de l'ensemble des autres résultats ci-dessus, il est très probable qu'en dépit de leur isolement géographique, les abeilles « UK » et « OUE » présentent tout simplement des allèles identiques à d'autres abeilles continentales qui ont déjà été étudiées.

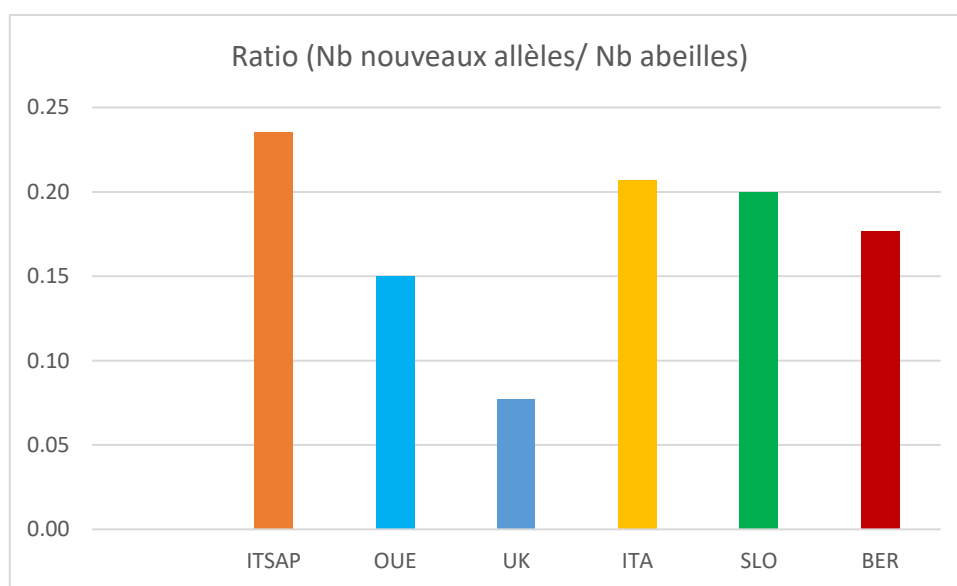


Figure 47 : Ratio du nombre de nouveaux allèles par le nombre d'abeilles de chaque échantillon

#### d. Etude de la taille de la région à motif répété

Finalement, nous nous sommes intéressés, pour chaque sous-population, à la longueur de la région à motif répété. Comme nous l'avons vu dans la partie I (Introduction), il existe malgré tout des motifs conservés au sein de la région hypervariable. Il s'agit du motif SLS (Sérine-Leucine-Sérine) côté N-terminal et du motif IEQIP (Isoleucine-Acide glutamique-Glutamine-Isoleucine-Proline) côté C-terminal. Ces motifs sont représentés sur les 73 allèles, par une couleur de police respectivement rouge et bleue (voir tableau 11 p 206). Les nucléotides correspondant à ces motifs ont été repérés dans les séquences nucléotidiques de sorte à retirer toutes les séquences en amont et en aval. La taille de cette région a été mesurée pour chacune des 183 abeilles puis des moyennes ont été calculées par population (voir tableau 14 et figure 48).

**Tableau 14 : Longueur de la région à motif répété**

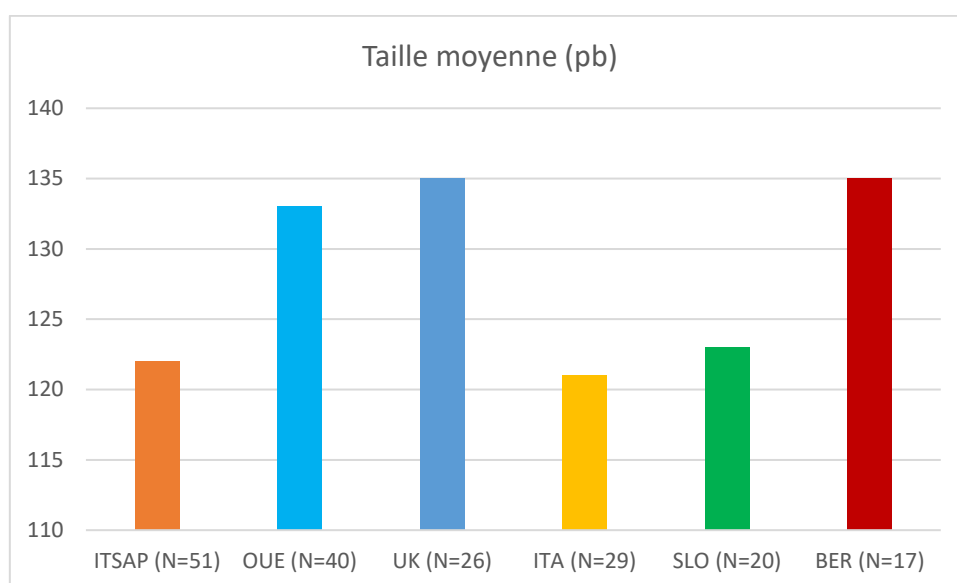
Population	Taille minimale (pb)	Taille maximale (pb)	Taille moyenne (pb)
ITSAP (N=51)	90	159	122
OUE (N=40)	93	168	133
UK (N=26)	93	159	135
ITA (N=29)	90	159	121
SLO (N=20)	93	150	123
BER (N=17)	99	159	135
Population totale	90	168	127

D'après l'ANOVA réalisée avec R, il existe au moins une sous-population pour laquelle la différence de longueur moyenne est différente des autres (p-value =0.00434). Mais la répétition des tests engendre un manque de « puissance » ne permettant pas de conclure quelle est la sous-population en question.

De manière générale, la variance est assez importante dans chaque population (fichier de données brutes). Par contre, on observe que les tailles minimales, maximales et moyennes sont assez homogènes entre les différentes populations. En moyenne, les tailles les plus élevées sont présentes chez des abeilles «UK », « OUE » et « BER ». La taille minimale est observée chez des abeilles « ITA » et « ITSAP » tandis que la taille maximale se trouve, assez largement, chez des abeilles « OUE ».

Précisément, il s'agit de l'allèle 1, nouvel allèle, porté uniquement par des abeilles d'Ouessant. Cet haplotype est intéressant car il est plus long, de 9 nucléotides, que le deuxième plus long, ce qui représente une différence de 3 acides aminés.

Nous avons vu qu'une variation de la taille de cette région était une source de variabilité conduisant à l'hétérozygotie. Par conséquent, il ne serait, *a priori*, pas surprenant de retrouver une taille supérieure chez des abeilles insulaires, sur lesquelles doit s'exercer une pression de sélection forte en raison du faible effectif génétique. Ainsi, les allèles nouveaux dus à un allongement de la région à motif répété seraient très favorablement sélectionnés. Cette déduction reste cependant très hypothétique car il convient de rappeler que les abeilles « OUE » n'ont été réintroduites que très récemment sur l'île et que les fondatrices de ces colonies proviennent de la côte bretonne, donc du continent. Il est fort peu probable que le taux de mutation soit suffisant pour que cela soit arrivé depuis l'isolement sur l'île. Dans notre étude, l'allèle 1 n'a pourtant été observé chez aucune des abeilles « UK », ni même chez des abeilles « ITSAP », qui, pour certaines, présentent très certainement une « base génétique » d'abeille noire. Il faudrait donc idéalement comparer avec des abeilles bretonnes.



**Figure 48 : Taille moyenne par population de la région à motif répété**

On peut difficilement imaginer qu'un nouvel allèle ait été généré puis se soit répandu en si peu de temps à l'échelle de l'évolution dans la population « OUE ». Néanmoins, le temps de génération pour les abeilles est très court et on ne connaît presque rien du mécanisme conduisant à l'allongement de la région à motif répété. Nous reviendrons plus largement sur ces aspects au cours de la discussion.

## D. Reconstitution de la région inconnue de l'intron 5

Parallèlement à l'étude principale, des abeilles ont été séquencées en vue de la reconstitution complète de la région inconnue située entre les exons 5 et 6. Soixante-douze abeilles ont été amplifiées pour cette région et 10 d'entre elles séquencées avec 4 amorces, soit 4 séquences pour chaque abeille. Grâce à ces 40 séquences chevauchantes, un assemblage a pu être réalisé, conduisant à une séquence consensus.

Grâce à nos résultats, la séquence génomique de référence située de la borne 3:11:140:077 à la borne 3:11:140:798 sur le navigateur de génome Ensembl metazoa, qui est la suivante :

```
TATTTTTTTATTGATAAAAAATTATATTGAATTATAACCATGAATAAAATAAAATAAAATATATTGAGTTGGCAACTAAG
TAATTGCGGATTTTTTAGAATCAAGACATTTNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
AAGGTTAATACTCGTTACAAAGCTGTAATGAAAGTTTGTAAATAAAAATCTTGTGTTGAAATATATCCCAGAAAT
TTTCAGTTTGTGGAACGCTAATATTTGAATATTGTTATTTTTCTTT
```

peut être remplacée par la nouvelle séquence consensus suivante :

```
TATTTTTTTATTGATAAAAAATTATATTGAATTAYACCATGAATAAAATAAAATAAAATATATTGRTTGGCAACTAA
GTAATTRCGGATTTTTYTTTARAAAATCAAAGAYAATTTTTTCATGGAACTAAATAACTTTATTCYGTAAATGTGTT
GCYCATTTTGATCAATGAYCTTTTGCYATCTTTTCAGRCAGCATCATAATCCCACRITTCATAAAACTTSTGRTTTT
TATTAGCAAAWACTGAATCAGGTACGATTTGATATCATCATCGTTATTGAAATTTTTTACCATTTCRAGGAGTTTT
GTAAAGATCGAAACAAAAGTAATCAGATGGTGCAATRTCAGGAYTATATGGTRGATGTGGCAAAAACATCCCAC
CAAGCTCCAATAATTTTTTRCCGAGTGACCAAAGATGTGTGTRGCCTTGCAATTGTCABGATGGAATACAACASCTT
TTCGATTTGTCAATTCGGCYGYTTTTCTTCAACYGCATTGTTTAAATTTTCGTTAGTTGTTTAAATGTARACAAAYR
AATTGATCGTTTCGRITGGRTGGTAAGAGTTCAAATAGAYAATTYCTTTRTAATCCAYCAAACGATAACAAAA
CCTTYTTTTYGAYGAATACYAGCTTTTGTATGTTGTTGAGCTGRTTCACGTGGCCTGCTCCACCATCTTTCCGCT
TGATATTGTTGTAAACRAYCCATTTTTCATCGTCAGTTATYAGTCGTTTTAAAAATGRATCATTTTCATTACGTT
TCTTTAGCAAATYGCAGCTGTTAATGCGTTGCGTTAAATGCTTTTCTTTCAGTTTCRTRARRAAYCCATGTATCGA
GTTTTTGAACATAGCCAAGTTGTTTTAARTGGTTTTCAATGCATGTATGYGATACATGAAGCTTCTCTGCAATCT
CAYGAGTTGTACTGTGABGATYCGAAAATYGATTATTGCTTTGATYAGGTCGTCATCAAYTTCAATTAAGAAAT
CCGCAATTAAGTTGCAACCAATAATACTTTTTTTGAGATATGCTGYTTGGATAGTTATTCGTATTTAA
TCGACAATGTATGAGTCAATGTTATTGTCGCRGTWYGAYTAAAYTAGYCTAGACTAGACTATCTTTCGTAAATTGA
CCAATATTTTTTTTAAATAAATGTTAAATGTTAATAASTCGTTAACAAAGCTGTAATGAAAGTTTTTGTAAATG
AAAATCTTGTGTTGAAATATCCCAGAAATTTTCAGTTTGTGGAACGCTAATATTTGAATATTGTTATTTTTCTTT
```

Finalement, les 493 nucléotides inconnus correspondent en réalité à une séquence de 1039 nucléotides. Les SNP sont représentés au sein de la séquence par le biais de lettres dont la signification (nomenclature IUPAC) est donnée dans le tableau 15 suivant :

**Tableau 15 : Nomenclature internationale des nucléotides**

Lettre	Nucléotide
R	G ou A
Y	C ou T
M	A ou C
K	G ou T
S	G ou S
W	A ou T
B	C ou G ou T
D	A ou G ou T
H	A ou C ou T
V	A ou C ou G
N	A ou C ou G ou T

Il existe au sein de cette séquence 67 SNP pour 1277 paires de bases.

# CHAPITRE 4 : DISCUSSION

## A. Bilan des résultats et perspectives

### a. De l'intérêt des SNP dans la genèse de nouveaux allèles

A l'issue de notre étude, il s'avère qu'à l'instar des abeilles déjà étudiées par d'autres auteurs, les abeilles échantillonnées, issues du projet SeqApiPop, présentent une variabilité importante au locus *csd*. Celle-ci se traduit par une taille variable de la région à motif répété mais également par de nombreux SNP dans les régions flanquantes. Elle constitue une difficulté majeure pour l'étude de ces séquences et est susceptible d'engendrer un manque de significativité de nos résultats. En effet, bien que le nombre d'individus dans chacune de nos sous-populations soit relativement élevé et *a priori* suffisant, le nombre très élevé d'allèles dilue la portée de nos résultats. Ainsi, comme nous l'avons vu, il existe 73 allèles parmi nos 183 abeilles, dont certains (27 allèles) ne sont présents que chez un seul individu. A l'inverse, certains allèles sont présents chez des individus issus de populations et même de races différentes. Ainsi, lorsque l'on croise nos données de séquence avec les informations diverses inhérentes aux abeilles (race, population, caractère insulaire), aucun regroupement logique ne peut être opéré en raison de cette grande variabilité. Deux hypothèses peuvent être formulées pour expliquer de tels résultats. La première, qui est, à notre avis, la moins probable, est celle de la convergence évolutive. Cela signifierait que des mutations non-synonymes identiques sont apparues indépendamment chez des populations éloignées et ont été conservées. Cette hypothèse est émise par Hasselmann et al. (2008) mais à propos de mutations similaires chez des espèces différentes (*A. cerana*, *A. dorsata* et *A. mellifera*). Or, il s'agit ici de plusieurs populations d'une seule et unique espèce, qui, de surcroît, n'ont probablement pas été séparées depuis longtemps. Et ces mêmes auteurs, avec des séquences représentant, il est vrai, la totalité des 9 exons (ce qui n'est pas notre cas), parviennent sans difficulté à séparer, à l'aide d'un arbre phylogénétique, les individus en 3 clusters qui correspondent aux 3 espèces susmentionnées. La seconde hypothèse, que nous privilégions, est la présence d'une sélection positive forte associée à l'absence d'une importante dérive génétique, due à une forte sélection pour un nombre élevé d'allèles (sélection balancée).

Nos données confirment effectivement qu'il existe une sélection positive marquée au locus *csd*. En effet, 77 haplotypes nucléotidiques (introns non compris) donnent lieu à 73 haplotypes protéiques, ce qui signifie que les différences nucléotidiques observées se traduisent pour la quasi-totalité par des changements en acides aminés.

Lorsqu'une mutation de type SNP apparaît, plusieurs devenir sont possibles. Si c'est une position nucléotidique sous sélection positive, la mutation sera très probablement conservée. S'il s'agit maintenant d'une position nucléotidique sous sélection purifiante, elle va être éliminée car elle est délétère, ou tout du moins désavantageuse à des degrés divers. Si par contre il s'agit d'une position nucléotidique neutre, son devenir dépendra de la dérive génétique (fluctuation aléatoire des fréquences alléliques d'une génération à l'autre en raison de l'échantillonnage des gamètes ; l'amplitude de cette fluctuation est d'autant plus grande que la taille des populations est faible). Ainsi, par le simple fait du hasard, cette mutation peut disparaître d'une population A alors qu'elle va perdurer, se transmettre et se propager (voire se fixer) chez une population B. Si bien qu'elle deviendra en quelque sorte « caractéristique » de la population B. Et la multiplication de ces événements permettra, pour un gène donné, après de nombreuses générations, l'établissement d'un haplotype de SNP formant la signature d'une race ou d'une population, ce qui permet de regrouper les individus lui appartenant.

En ce qui concerne le gène *csd*, c'est le processus inverse qui est en place. Lorsqu'une mutation apparaît et qu'elle change la protéine, elle est très favorablement sélectionnée car le système encourage le maintien de nombreux allèles. En témoignent la présence de plusieurs SNP tri-alléliques dans nos séquences qui sont pourtant des phénomènes assez rares. Ainsi, une mutation apparue au cours de l'évolution va perdurer dans des populations pourtant séparées géographiquement depuis de longues années car la sélection balancée s'oppose à la perte d'allèle par dérive génétique. Il n'est donc finalement pas surprenant de retrouver des allèles identiques chez des populations différentes et il n'y a aucune raison que les séquences puissent être classées par population ou par race. C'est d'autant moins surprenant qu'il est rarement observé une structure de population dans les études ayant étudié des gènes sous sélection balancée (Muirhead, 2001 ; Schierup et al., 2000).

Toutefois, une interrogation persiste encore à ce stade. Nous avons vu que l'allongement de la région à motif répétée constituait une source de variabilité importante pour la genèse de nouveaux allèles. D'ailleurs, elle constituerait la première étape ayant conduit, dans l'évolution, à des allèles différents (Beye et al., 2013). Dans ce cas, pourquoi y a-t-il une seconde source de variabilité à travers les SNP des séquences flanquantes ?



Autrement dit, la question serait de savoir si l'ensemble du locus *csd* fait l'objet d'une sélection positive ou si celle-ci ne s'opère que sur la région à motif répété, les SNP étant sélectionnés uniquement par le phénomène d'auto-stop moléculaire. L'auto-stop est un phénomène de sélection de variants neutres due à leur association avec les variants d'un locus soumis à sélection. Il résulte simplement d'une liaison génétique entre les 2 locus en question. En première approche, nous avons retiré la région à motif répété, les introns ainsi que les *indels* de nos séquences et avons calculé le nombre d'haplotypes nucléotidiques en ne gardant que les SNP. Celui-ci était de 58. Après traduction, il restait 58 haplotypes protéiques ! Cela signifie que tout SNP entraîne un changement d'acide aminé, y compris les SNP tri-alléliques ! Ce qui semble être en défaveur d'un phénomène d'auto-stop. Pour répondre de manière plus approfondie à cette question, il serait intéressant d'étudier les SNP plus éloignés de la région à motif répété. Des réponses sont apportées par la bibliographie. De précédentes études (Hasselmann et al., 2008 ; Hasselmann et Beye, 2006, 2004) ont démontré l'existence d'un niveau de polymorphisme dix à seize fois supérieur dans la séquence génomique de la région d'intérêt par rapport à d'autres régions du gène ou au niveau moyen de polymorphisme de l'ensemble du génome. Mais le taux de mutations non-synonymes des exons autres que les exons 6 et 7 est plus faible que celui de ces derniers (Hasselmann et al., 2008) ce qui est plutôt en faveur d'un phénomène d'auto-stop. En outre, il est établi que l'avènement du gène *csd* a engendré une interférence fonctionnelle sur *fem*, avec notamment une accentuation (Hasselmann et al., 2010) de la sélection purifiante se traduisant par une diminution du ratio dN/dS par rapport aux genres d'abeilles où *csd* n'est pas apparu. Il existe également une interférence génétique due à la liaison physique entre les deux gènes (Hasselmann et al., 2010). Ainsi, la sélection balancée au locus *csd* entraîne une augmentation de la diversité nucléotidique (polymorphisme silencieux) de *fem*, qui est supérieure à la moyenne de l'ensemble du génome (Hasselmann et al., 2010). Le résultat est d'ailleurs similaire pour un locus neutre situé à la même distance de *csd* que *fem* (12 kb) mais de l'autre côté (Hasselmann et Beye, 2006).

## **b. De probables biais d'échantillonnages**

La deuxième source de difficulté pour l'analyse de nos résultats réside dans la présence probable d'un biais d'échantillonnage, en particulier pour les populations d'abeilles noires insulaires « OUE » et « UK ». Ces dernières sont issues de Conservatoires installés sur des îles de faible à très faible superficie, sur lesquelles le nombre de ruches reste assez faible. Or, l'obligation de ne prélever qu'une abeille par colonie a pu conduire à sélectionner des abeilles d'un même rucher voire de ruches côte à côte. Dès lors, il n'est pas surprenant d'observer une diversité allélique moyenne plus faible que pour les autres populations. Par ailleurs, la faible diversité génétique des abeilles de l'île d'Ouessant est également soulignée par Bertrand et al., (2013).

## **c. Des séquences support de travaux ultérieurs**

Les aspects positifs de cette étude sont nombreux. Tout d'abord, les travaux préliminaires ont permis de mettre en place un protocole d'amplification et de séquençage standardisé, qui se trouve validé par l'obtention d'une amplification de la région souhaitée chez 183 des 188 abeilles, soit 97% de l'échantillon initial. Les 3% restants présentaient probablement trop de polymorphisme au niveau des régions correspondant aux amorces. Ces 5 abeilles (UK1, UK10, ITA 9, BER 5 et ITSAP 53) n'appartenant à aucune population clairement identifiée, l'échec de leur amplification ne permet pas de suspecter une diversité plus importante dans une sous-espèce ou population donnée. Ce protocole pourra, au besoin, être réutilisé par quiconque souhaiterait étudier ce locus sur des mâles haploïdes. D'autre part, nous avons obtenu les séquences de 183 abeilles, permettant de définir 73 allèles protéiques dont 25 n'avaient jamais été identifiés auparavant. Ces séquences pourront servir ultérieurement à d'autres chercheurs pour des études diverses et variées sur le locus *csd*. D'autant qu'elles concernent des populations assez originales telles que les abeilles noires du Conservatoire de l'île d'Ouessant. Mais elles seront aussi, et surtout, utiles pour l'équipe de recherche INRA du projet SeqApiPop. En effet, la possibilité de se référencer à des séquences obtenues grâce à un séquençage classique est d'une aide précieuse pour la mise au point de l'assemblage et du séquençage nouvelle génération réalisé sur les mêmes abeilles. Enfin, les travaux de l'étude subsidiaire ont permis de reconstituer une séquence de référence pour une région jusqu'alors inconnue. Or, toute avancée en génétique commence par une connaissance précise des séquences de référence d'ADN génomique des espèces d'intérêt. En ce sens, notre étude fournit une contribution en vue de travaux ultérieurs.

#### **d. Etude du mécanisme d'allongement de la région hypervariable**

Cette particularité qu'est le locus *csd* est, bien que passionnante, d'une extrême complexité. En conséquence, de nombreuses zones d'ombre subsistent à l'heure actuelle. L'une d'elle est le mécanisme moléculaire conduisant à l'allongement et/ou au raccourcissement de la région à motif répété. La présence d'un motif répété conduira naturellement un généticien chevronné à réaliser un parallèle avec les marqueurs microsatellites. Ces derniers s'allongent principalement par des erreurs de la polymérase et par des phénomènes de recombinaison au cours de la division cellulaire. Or, il se trouve que le taux de recombinaison est particulièrement élevé chez *Apis mellifera* (Beye et al., 1999). Dans le détail, il serait en moyenne environ 10 fois supérieur à celui observé chez d'autres eucaryotes (Beye et al., 2006) avec notamment 5,7 évènements de recombinaison par paire de chromosomes et par méiose contre seulement 1,6 dans d'autres taxons. Ce taux serait même 4 fois plus élevé (Beye et al. 1999) que le taux moyen « tout génome » dans les régions autour de la région SDL (qui contient *fem* et *csd*). Pourtant, il semble que le taux de recombinaison méiotique au sein de la région d'intérêt (Hasselmann et al., 2008 ; Hasselmann et Beye., 2006) chute drastiquement par rapport au reste du génome, voire serait nul. En outre, une première différence majeure avec les microsatellites est que le motif répété est parfois interrompu ce qui se traduit par une répétition imparfaite. Quoiqu'il en soit, il serait intéressant de se pencher sur ce mécanisme pour valider ou infirmer ces hypothèses.

## B. Conséquence pratique de l'homozygotie au locus *csd* chez une population consanguine

### a. Un couvain clairsemé

Toutes les considérations que l'on développe dans notre étude sur l'haplodiploïdie et sur le locus *csd* peuvent paraître bien éloignées des préoccupations d'un apiculteur. Pourtant, elles ont une implication pratique immédiate. Le système de détermination du sexe chez les abeilles rend les colonies particulièrement sensibles à la consanguinité (Zayed, 2009). En effet, la nécessaire hétérozygotie au locus *csd* implique que des colonies isolées, consanguines, ont une forte probabilité de voir leur reine fécondée par des mâles ayant les mêmes allèles au locus *csd*. D'autant que la dérive génétique atteint davantage les petites populations (Zayed, 2009). Mais aussi parce que les populations d'abeilles sauvages décroissent ce qui implique une perte de biodiversité et en particulier de diversité allélique au locus *csd*. Ainsi, la fréquence de production de mâles diploïdes est inversement proportionnelle au nombre d'allèles *csd* dans la population (voir figure 49).

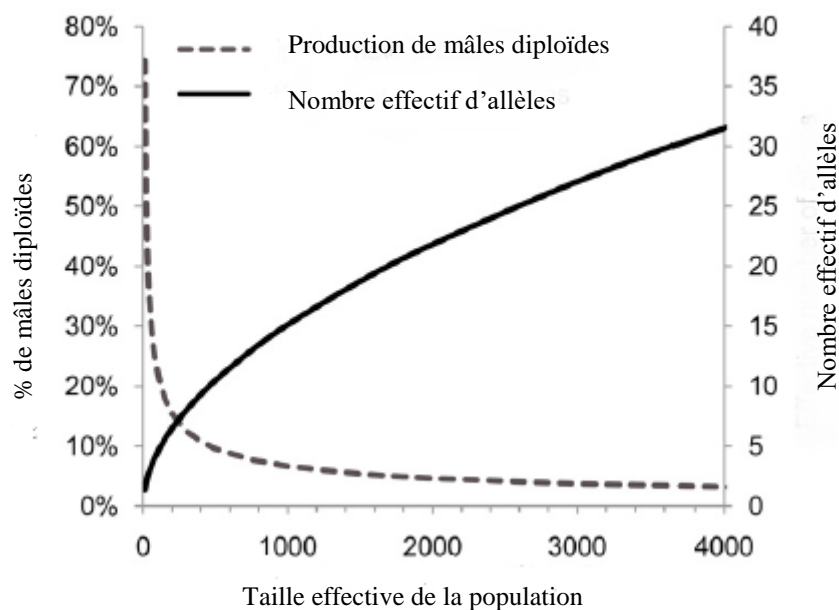


Figure 49 : Relation entre la production de mâles diploïdes, le nombre d'allèles dans la population et la taille de la population (d'après Zayed et al., 2009)

Il n'est pas si rare d'observer des ruchers isolés génétiquement, à cause de la fragmentation de l'habitat notamment (Hedrick et Gilpin, 1997 ; Whitlock et Barton, 1997). Et le risque est encore augmenté si l'apiculteur a peu de ruches et qu'il entreprend de remplacer des colonies ou d'augmenter son cheptel par des essaims artificiels répétés de la même lignée, en général la plus productive. La conséquence pratique pour l'apiculteur est la présence inexplicquée d'un couvain clairsemé de trous qui sont en fait les alvéoles nettoyées au sein desquelles des mâles diploïdes ont été successivement pondus, tués puis retirés (voir photographie 21).



**Photographie 21 : Exemple de couvain clairsemé (source : Bee Fun [en ligne]. Disponible sur : <http://beefun-cdc.blogspot.fr/2015/04/1ere-visite-2015-rucher-56.html> (consulté le 14/04/2016)).**

Lorsque la reine détecte ces alvéoles vides, elle y pond de nouveau, de telle sorte que le couvain présente finalement des formes immatures d'âges différents les uns à côté des autres. La colonie se retrouve ainsi peuplée, en proportions, de nombreux mâles haploïdes et de peu de femelles ce qui provoque une perte de vigueur, une diminution des ressources, un ralentissement de l'activité et, à terme, une disparition de la colonie. Ce problème peut pourtant être résolu assez simplement en opérant un remérage et en introduisant une reine fécondée du commerce, issue d'une autre population (Carvalho, 2001). Attention cependant à ne pas conclure trop vite à de la consanguinité au locus *csd* en présence de couvain clairsemé, en effet cet aspect du couvain signifie simplement qu'il existe une mortalité importante des formes immatures. On retrouvera un aspect similaire dans de nombreuses maladies du couvain. C'est d'ailleurs pour cette raison que les mortalités dues à la consanguinité sont probablement sous-diagnostiquées.

Car outre le fait que le mécanisme est méconnu voire ignoré par les apiculteurs, ces mortalités sont sans nul doute attribuées à tort à d'autres agents. En conséquence, il n'existe, à notre connaissance, aucune étude portant sur l'impact de la consanguinité sur les mortalités au sein des ruchers. En termes de perspectives, il serait très enrichissant de mener une telle étude. Récemment, une étude française (Darrouzet et al., 2015) a démontré que de nombreux frelons asiatiques mâles étaient diploïdes, signe d'une consanguinité au locus *csd* élevée, ce qui est cohérent avec le mode d'introduction accidentel de quelques frelons seulement. Cette consanguinité pourrait d'ailleurs être, à long terme, un frein considérable à la poursuite de l'invasion de *Vespa velutina* en Europe.

### **b. Un test rapide pour allèle *csd***

L'existence de mâles diploïdes supprimés par les ouvrières a été découverte dès 1963 par Woyke (Woyke, 1963), soit bien avant la compréhension moléculaire du locus *csd*. Ce dernier a élevé des reines issues de croisements consanguins pendant plusieurs générations. Ces reines ont pondu leurs œufs dans des cellules à ouvrières, donc il s'agissait à priori d'œufs fécondés destinés à devenir des femelles. En regardant le sexe des larves âgées de 3 à 6 heures à l'aide d'un microscope, il s'est aperçu qu'il existait aussi des mâles. Et que ces mêmes mâles ne naissaient jamais car ils étaient mangés par les ouvrières peu après l'éclosion (Woyke, 1963b), environ 6h après, alors qu'ils étaient en réalité viables. En utilisant des marqueurs génétiques, Woyke a réussi à montrer que ces mâles étaient effectivement diploïdes (Woyke, 1965). On peut alors se demander comment les ouvrières arrivent à reconnaître les larves qu'elles doivent manger de celles qu'elles doivent nourrir. Il semblerait que les larves de mâles diploïdes excrètent à la surface de leurs corps des phéromones, appelées « phéromones de cannibalisme », formant un signal de destruction (Woyke, 1967). Cet étrange processus se justifie d'un point de vue évolutif, cela permet à la colonie d'éviter d'investir des ressources dans la création d'individus ni aptes à travailler, ni à se reproduire.

Ceci met en exergue un lien direct entre la diversité génétique d'une population d'abeilles au sein d'un rucher et les caractères appréciés et sélectionnés par l'apiculteur : production, ponte, pérennité de la colonie au cours du temps. Ainsi, dans le cadre d'un « programme » de sélection opéré par l'apiculteur, la connaissance des allèles au locus *csd* de tout ou partie des reines du rucher, permettrait de sélectionner positivement les allèles rares. Dans cette optique, une équipe néo-zélandaise (Hyink et al., 2013) a développé 2 tests PCR utilisables en routine. Ceci étant, dans une population panmictique, la fréquence des mâles diploïdes reste très faible. Elle a été estimée proche de 0.05%.

## C. Haplodiploïdie et insectes sociaux

### a. La théorie de la sélection de parentèle

En prenant encore un peu plus de recul, il est intéressant de se demander quel est l'intérêt d'un mécanisme tel que l'haplodiploïdie pour la prospérité d'une espèce telle qu'*Apis mellifera*, et d'évaluer cet intérêt à la lumière de la vie en colonie, caractéristique de l'abeille domestique.

Parmi les nombreuses espèces d'insectes, une faible part seulement vit en colonie. Ces espèces sont dites « eusociales ». Le degré d'eusocialité le plus élevé se trouve notamment chez les hyménoptères, ordre dans lequel on retrouve guêpes, abeilles, bourdons et fourmis. Elles présentent des caractéristiques communes : les individus non adultes sont élevés en commun dans un nid, plusieurs générations vivent ensemble et la fonction de reproduction est réservée à certains individus. Pourtant, la théorie darwinienne suppose que les caractères sélectionnés sont ceux donnant un avantage reproductif (fitness). En première approche, l'émergence et la persistance d'êtres stériles, dévoués corps et âmes à leur communauté allait à l'encontre de ce principe, et Darwin dut reconnaître qu'il existait une faille dans sa théorie. En réalité ce n'est pas incompatible : la théorie de la sélection de parentèle (Hamilton 1963, 1964), encore appelée théorie de la dynamique familiale, permet d'expliquer le comportement d'altruisme dans la reproduction. Cette théorie affirme que les individus augmentent leur aptitude reproductrice globale en adoptant des comportements qui augmentent l'aptitude reproductrice des individus qui leur sont génétiquement apparentés. On appelle acte d'altruisme un acte ayant pour effet de diminuer le succès reproductif de son auteur tout en augmentant celui du bénéficiaire.

En fait, il existe deux manières pour un individu de disséminer son patrimoine génétique, soit en se reproduisant lui-même par filiation directe, soit en inhibant ou limitant sa propre reproduction et en se mettant au service de la reproduction d'individus de la même famille avec des gènes très proches. C'est la seconde option qui est à l'œuvre chez *A. mellifera*. Ainsi, les ouvrières femelles ne se reproduisent pas et élèvent les larves-sœurs issues de leur mère, la reine. Comme nous allons le voir, dans le cadre de l'haplo-diploïdie, ce processus de reproduction se trouve entièrement validé.

## b. Asymétries génétiques associées à l'haplodiploïdie

La reine diploïde transmet la moitié de son patrimoine génétique à tous ses descendants. La reine et chacune de ses filles (de ses fils) ont donc 50% de gènes en commun. Le mâle haploïde transmet lui son unique jeu de chromosomes à tous ses descendants. En omettant un instant la polyandrie, les ouvrières ont donc toutes reçu les mêmes gènes de leur père.

A l'étage d'en dessous, prenons deux ouvrières issues de la même reine et du même père. Chacune a hérité de 50% des gènes maternels. Mais les gènes transmis par la mère ne représentent que 50% de leur génome, d'où, en espérance, 25% d'identité génétique entre les sœurs via la mère. Par contre, les 50% de leur génome issus du père sont identiques. Par conséquent, 2 ouvrières auront une identité moyenne (ou un pourcentage moyen de gènes en commun) de  $0,5+0,25=0,75$ .

Prenons maintenant un mâle et sa sœur ouvrière, issus de la même reine donc. Les deux ont reçu 50% des gènes de leur mère. Mais, quand les gènes de la mère représentent la totalité des gènes chez mâle, ils ne représentent que la moitié de ceux de sa sœur (qui, elle, a reçu la moitié de ses gènes de son père). Le pourcentage moyen de gènes en commun entre un mâle haploïde et sa sœur ouvrière n'est donc que de 25%.

En outre, dans l'hypothèse où l'ouvrière voudrait se reproduire, elle aurait toujours une proximité génétique plus élevée avec une pleine-sœur (75%) qu'avec sa descendance (50%). Finalement, le succès reproductif global, c'est-à-dire l'efficacité de transmission de leurs propres gènes, est moins bon pour les ouvrières en procréant elles-mêmes qu'en élevant des pleines sœurs futures reines. L'altruisme dont elles font preuve est donc tout relatif.

Ces informations sont illustrées sur la figure 50.

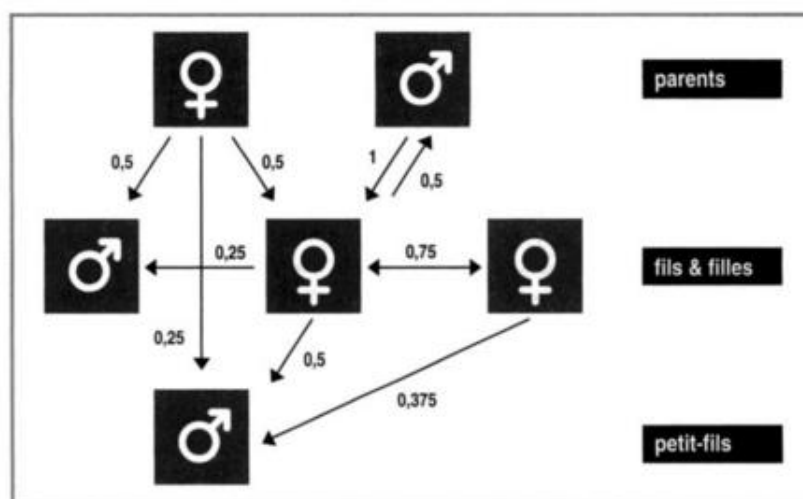


Figure 50 : Asymétries génétiques associées à l'haplodiploïdie (d'après Aron et Passera, 2009).



Nous venons de voir que l'haplodiploïdie est invoquée comme l'une des raisons du développement de l'eusocialité chez les hyménoptères. Il y a néanmoins des nuances à apporter. Tout d'abord, il existe des espèces haplodiploïdes qui vivent de façon solitaire et, inversement, des espèces avec un degré élevé d'eusocialité qui sont diploïdes, l'exemple le plus marquant étant celui des termites (*Isoptera*) chez qui il existe une répartition aléatoire des individus mâles et femelles au sein des différentes castes (Abe et al., 2000). Ensuite, l'intérêt de l'eusocialité ne se résume pas simplement à un meilleur succès reproductif et à un aspect purement génétique. Des considérations écologiques sont à prendre en compte. La vie sociale en colonie permet ainsi de partager des informations sur les ressources alimentaires, de mettre en place un système de défense collectif plus efficace contre les intrus ou les parasites, etc.

Enfin, le système de polyandrie (plusieurs mâles fécondent la reine), qui est la norme chez les abeilles, réduit inexorablement la parenté génétique « moyenne » entre les ouvrières, à tel point qu'elle devient, pour une partie des sœurs, égale voire inférieure à celle qu'une ouvrière aurait avec sa descendance. Elle peut être déterminée par l'équation  $r = 1/4 + 1/2k$  (Aron et Passera, 2009) où  $k$  représente le nombre de pères, c'est-à-dire le nombre de mâles ayant fécondé la reine. Pour autant cela n'empêche pas que l'eusocialité soit conservée.

A la lumière de notre étude, le système de polyandrie apparaît finalement comme une formidable soupape de sécurité pour lutter contre l'homozygotie au locus *csd*. De manière générale, la polyandrie est un système considéré comme source de variabilité génétique (Boomsma et al., 2005 ; Jennions et Petrie, 2000). Imaginons qu'une reine soit fécondée par un unique mâle possédant un de ses deux allèles au locus *csd*. En moyenne, la moitié des individus diploïdes seraient des mâles, soit une fin assurée pour la ruche. Tandis qu'avec une dizaine de mâles différents, la réunion d'allèles identiques pour un des mâles est largement compensée par les possibilités d'hétérozygotie offertes par les autres mâles... sauf dans le cas d'une population très consanguine où tous les mâles apportent un allèle identique. D'où l'importance, pour un vétérinaire-conseil en apiculture, d'encourager les apiculteurs au maintien d'une variabilité élevée et à la reproduction de colonies d'origines diverses, quitte à perdre un peu de productivité. Celle-ci sera largement compensée par la pérennité des colonies dans le temps. Finalement, en génétique comme dans la vie, "sans variété, point de beauté" (Voltaire, Lettre à Thiriot - 6 Décembre 1738).

# CONCLUSION

---

Comme nous l'avons vu tout au long de cette thèse, les abeilles sont un composant essentiel de notre écosystème terrestre. Elles constituent l'un des facteurs qui rend la vie humaine possible, ou, à tout le moins, agréable. C'est pourquoi leur préservation et leur conservation sont indispensables, que cela soit pour des raisons écologiques, économiques ou anthropomorphiques. Inévitablement, cela passera par un changement profond de notre agriculture et plus généralement de notre mode de vie. Car les abeilles ne supporteront probablement pas l'explosion démographique qui s'annonce et l'agriculture intensive à base de monocultures généralisées qui l'accompagneront sur tous les continents. Ni même d'ailleurs les flux incessants de marchandises à travers le globe et les parasites ou prédateurs qui les suivent. Leur salut passera également par une connaissance fine et précise de leur biologie, de leurs besoins et des causes de leur déclin. Et cette connaissance ira nécessairement jusqu'au génome. Génome de l'abeille mais aussi de ses prédateurs. Car on ne peut lutter efficacement contre un ennemi que lorsqu'on le connaît.

Dans un habitat fragmenté, la faible diversité génétique et l'homozygotie au locus de détermination du sexe qui en résulte sont une cause avérée de déclin. Et même si son impact relatif n'a jamais été quantifié, il est probable qu'il augmente inexorablement à mesure que le déclin des abeilles sauvages se poursuivra. La maîtrise de la génétique de leur cheptel pourrait permettre aux apiculteurs d'éviter cet écueil. Mais pas seulement.

La génétique est une formidable source d'espérance pour qui veut sauver les abeilles : sélection de la résistance au varroa, sélection du comportement hygiénique, etc. Et les avancées les plus significatives sont probablement à venir. En effet, le monde académique est de plus en plus concerné par cette problématique et les études sur l'abeille, parfois internationales, se multiplient.

Ces découvertes ne bénéficieront toutefois aux abeilles qu'à condition que les filières apicoles se professionnalisent et œuvrent pour leur destin commun. Avec d'un côté un pôle génétique centralisé qui piloterait un programme de sélection incluant un contrôle de performance, la maîtrise de la reproduction et de la variabilité, et la production de données. Et de l'autre côté un pôle sanitaire rigoureux et expert des pathologies de l'abeille, au sein duquel les vétérinaires ont le devoir de s'impliquer car ils sont les seuls garants de la santé des animaux et de la qualité des denrées alimentaires dont le miel fait partie. Ainsi, à mon modeste niveau, je m'efforcerai d'œuvrer en ce sens et de transmettre aux apiculteurs que je serai amené à côtoyer les connaissances diverses acquises au cours de la réalisation de ce travail. Car, comme le disait Socrate, « le savoir est la seule matière qui s'accroît à mesure qu'elle se partage ».



**AGREMENT SCIENTIFIQUE**

**En vue de l'obtention du permis d'imprimer de la thèse de doctorat vétérinaire**

Je soussigné, DUCOS Alain, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse de **CATAYS Guillaume** intitulée « **Contribution à la caractérisation de la diversité génétique de l'abeille domestique *Apis mellifera* en France : cas du locus *csd* de détermination du sexe.** » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.



Fait à Toulouse, le 6 octobre 2016  
Professeur DUCOS Alain  
Enseignant chercheur  
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse



Vu :  
La Directrice de l'Ecole Nationale  
Vétérinaire de Toulouse  
Isabelle CHMITELIN



Vu :  
Le Président du jury :  
Professeur Patrick CALVAS

Vu et autorisation de l'impression :  
Président de l'Université  
Paul Sabatier  
Monsieur Jean-Pierre VINEL

Le Président de l'Université Paul Sabatier  
par délégation,  
La Vice-Présidente de la CFVU

Régine ANDRE-OBRECHT

M. CATAYS Guillaume  
a été admis(e) sur concours en : 2011  
a obtenu son diplôme d'études fondamentales vétérinaires le : 25/06/2015  
a validé son année d'approfondissement le : 23/06/2016  
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.



# BIBLIOGRAPHIE

---

ABE T, BIGNELL DE, et HIGASHI M (2000). *Termites : evolution, sociality, symbioses, ecology* [en ligne]. Springer Science & Business Media.

ABROL DP (2006). Defensive behaviour of *Apis cerana* F. against predatory wasps. *J Apic Sci.* 2006. **Vol. 50**, n° 2, pp. 39.

ABROL DP (2012). Value of Bee Pollination. In : *Pollination Biology*. Springer. pp. 185–222.

ADAM B et LENGVARI GF (1950). Beekeeping at Buckfast Abbey. *Bee World*. **Vol. 31**, n° 12, pp. 89–91.

ADAM B (1980). *A la recherche des meilleures races d'abeilles*.

ADAM B (1987). *Beekeeping at Buckfast Abbey*. Northern Bee Books.

ADELEKE OE, COKER ME et OKE OB (2010). Detection of a gentamicin-resistant burn wound strain of *Pseudomonas aeruginosa* but sensitive to honey and *Garcinia kola* (Heckel) seed extract. *Annals of Burns and Fire Disasters*. **Vol. 23**, n° 2, pp. 102.

ADL M, GENÇER H, FIRATLI Ç et BAHREINI R (2007). Morphometric characterization of Iranian (*Apis mellifera meda*), Central Anatolian (*Apis mellifera anatoliaca*) and Caucasian (*Apis mellifera caucasica*) honey bee populations. *Journal of Apicultural Research*. **Vol. 46**, n° 4, pp. 225-231.

AGUILAR R, ASHWORTH L, GALETTO L et AIZEN MA (2006). Plant reproductive susceptibility to habitat fragmentation : review and synthesis through a meta-analysis. *Ecology Letters*. **Vol. 9**, n° 8, pp. 968–980.

AIZEN M, GARIBALDI LA, CUNNINGHAM SA et KLEIN AM (2009). How much does agriculture depend on pollinators ? Lessons from long-term trends in crop production. *Annals of Botany*.

ALAUX C, DUCLOZ F, CRAUSER D et LE CONTE Y (2010). Diet effects on honeybee immunocompetence. *Biology Letters*. **Vol. 6**, pp. 562-565.

ALBURAKI M, MOULIN S, LEGOUT H, ALBURAKI A et GARNERY L (2011). Mitochondrial structure of Eastern honeybee populations from Syria, Lebanon and Iraq. *Apidologie*. **Vol. 42**, n° 5, pp. 628–641.

ALEXANDER BA et MICHENER CD (1995). Phylogenetic studies of the Families of Short-Tongued Bees. *The University of Kansas Science Bulletin*. **Vol. 55**, n° 11, pp. 377-424.

ALEXANDER BA (1991). Phylogenetic analysis of the genus *Apis* (Hymenoptera: Apidae). *Annals of the Entomological Society of America*. **Vol. 84**, n° 2, pp. 137–149.

ALEXANDER BA (1992). An exploratory analysis of cladistic relationships within the superfamily Apoidea, with special reference to sphecoid wasps (Hymenoptera). *Journal of Hymenoptera Research*. **Vol. 1**, n° 1, pp. 25-62.

- ALLEN DM (1956). The behaviour of honeybees preparing to swarm. *The British Journal of Animal Behaviour*. **Vol. 4**, n° 1, pp. 14–22.
- ALLEN DM (1958). Drone Brood in Honey Bee Colonies. *Journal of Economic Entomology*. **Vol. 51**, n° 1, pp. 46-48.
- ALPATOV WW (1929). Biometrical studies on variation and races of the honey bee (*Apis mellifera* L.). *The Quarterly Review of Biology*. **Vol. 4**, n° 1, pp. 1–58.
- ALVAREZ-SUAREZ JM, GASPARRINI M, FORBES-HERNÁNDEZ TY, MAZZONI L et GIAMPIERI F (2014). The Composition and Biological Activity of Honey : A Focus on Manuka Honey. *Foods*. **Vol. 3**, n° 3, pp. 420-432.
- AL-WAILI N, SALOM K et AL-GHAMDI AA (2011). Honey for wound healing, ulcers, and burns : data supporting its use in clinical practice. *The scientific world journal*. **Vol. 11**, pp. 766–787.
- AMERICA, National Research Council (US) (2007). Committee on the Status of Pollinators in North et (US), National Academies Press. *Status of pollinators in North America*. Natl Academy Pr.
- ARATHI HS, BURNS I et SPIVAK M (2000). Ethology of hygienic behaviour in the honey bee *Apis mellifera* L. (Hymenoptera : Apidae) : behavioural repertoire of hygienic bees. *Ethology*. **Vol. 106**, n° 4, pp. 365–379.
- ARBUCKLE T, SCHRÖDER S, STEINHAGE V et WITTMANN D (2001). Biodiversity informatics in action : identification and monitoring of bee species using ABIS. In : *Proc. 15th Int. Symp. Informatics for Environmental Protection*. pp. 425–430.
- ARCA M (2012). *Caractérisation génétique et étude comportementale d'une espèce envahissante en France : Vespa velutina Lepeletier (Hymenoptera, Vespidae)*. Paris 6.
- ARECHAVALETA-VELASCO ME, ALCALA-ESCAMILLA K, ROBLES-RIOS C, TSURUDA JM et HUNT GJ (2012). Fine-scale linkage mapping reveals a small set of candidate genes influencing honey bee grooming behavior in response to *Varroa* mites. *PLoS One*. **Vol. 7**, n° 11, pp. e47269.
- ARIAS MC et SHEPPARD WS (1996). Molecular Phylogenetics of Honey Bee Subspecies (*Apis mellifera*L.) Inferred from Mitochondrial DNA Sequence. *Molecular phylogenetics and evolution*. **Vol. 5**, n° 3, pp. 557–566.
- ARNOLD JW (1964). Blood circulation in insect wings. *Memoirs of the Entomological Society of Canada*. **Vol. 96**, n° S38, pp. 5–60.
- ARON S et PASSERA L (2009). *Les sociétés animales : évolution de la coopération et organisation sociale*. De Boeck Supérieur.
- ASHBY R, FORÊT S, SEARLE I et MALESZKA R (2016). MicroRNAs in honey bee caste determination. *Scientific reports*. **Vol. 6**.

- ATTIA YA, AL-HANOUN A, TAG EL-DIN AE, BOVERA F et SHEWIKI YE (2011). Effect of bee pollen levels on productive, reproductive and blood traits of NZW rabbits. *Journal of animal physiology and animal nutrition*. **Vol. 95**, n° 3, pp. 294–303.
- AUPINEL P, FORTINI D, DECOURTYE A et DEVILLERS J (2011). Effets des insecticides sur le développement des glandes hypopharyngiennes chez l'abeille domestique adulte après une exposition au stade larvaire. In : *4ème Séminaire d'Ecotoxicologie. 2011-11-07/2011-11-09, Saint-Lager, FRA*. INRA.
- AVISE JC, ARNOLD J, BALL RM, BERMINGHAM E, LAMB T, NEIGEL JE, REEB CA et SAUNDERS NC (1987). Intraspecific phylogeography : the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual review of ecology and systematics*. pp. 489–522.
- AVITABILE A, MORSE RA et BOCH R (1975). Swarming Honey Bees Guided by Pheromones. *Annals of the Entomological Society of America*. **Vol. 68**, n° 6, pp. 1079-1082.
- AYABE T, HOSHIBA H et ONO M (2004). Cytological evidence for triploid males and females in the bumblebee, *Bombus terrestris*. *Chromosome research*. **Vol. 12**, n° 3, pp. 215–223.
- AZEREDO L, AZEREDO MAA, DE SOUZA SR et DUTRA VML (2003). Protein contents and physicochemical properties in honey samples of *Apis mellifera* of different floral origins. *Food Chemistry*. **Vol. 80**, n° 2, pp. 249-254.
- BACKHAUS W (1993). Color vision and color choice behavior of the honey bee. *Apidologie*. **Vol. 24**, pp. 309–309.
- BAER B, EUBEL H, TAYLOR NL, O'TOOLE N et MILLAR AH (2009). Insights into female sperm storage from the spermathecal fluid proteome of the honeybee *Apis mellifera*. *Genome Biology*. **Vol. 10**, n° 6, pp.
- BAER B et SCHMID-HEMPEL P (2005). Sperm influences female hibernation success, survival and fitness in the bumble-bee *Bombus terrestris*. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*. **Vol. 272**, n° 1560, pp. 319–323.
- BAILEY L (1959). An improved method for the isolation of *Streptococcus pluton*, and observations on its distribution and ecology. *J. Insect Pathol.* **Vol. 1**, pp. 80–85.
- BAILEY L (1961). European foulbrood. *American Bee Journal*. **Vol. 101**, pp. 89–92.
- BAILEY L (1983). *Melissococcus pluton*, the cause of European foulbrood of honey bees (*Apis* spp.). *Journal of applied bacteriology*. **Vol. 55**, n° 1, pp. 65–69.
- BAKANLIĞI TT et BODENHEIMER FS (1942). *Studies on the honey bee and beekeeping in Turkey*.
- BAKER HG et HURD Jr PD (1968). Intrafloral Ecology. *Annual Review of Entomology*. **Vol. 13**, n° 1, pp. 385-414.
- BAR-COHEN R, ALPERN G et BAR-ANAN R (1978). Progeny testing and selecting Italian queens for brood area and honey production. *Apidologie*. **Vol. 9**, n° 2, pp. 95–100.



BARTH FG (1985). *Insects and flowers. The biology of a partnership*. George Allen & Unwin.

BARTOMEUS I, PARK MG, GIBBS J, DANFORTH BN, LAKSO AN et WINFREE R (2013). Biodiversity ensures plant-pollinator phenological synchrony against climate change. *Ecology Letters*. **Vol. 16**, n° 11, pp. 1331-1338.

BARTOMEUS I, POTTS SG, STEFFAN-DEWENTER I, VAISSIÈRE BE, WOYCIECHOWSKI M, KREWENKA KM, TSCHEULIN T, ROBERTS SPM, SZENTGYÖRGYI H, WESTPHAL C et BOMMARCO R (2014). Contribution of insect pollinators to crop yield and quality varies with agricultural intensification. *PeerJ*. **Vol. 2**, pp. e328.

BARTOMEUS I et WINFREE R (2013). Pollinator declines: reconciling scales and implications for ecosystem services. *F1000Research*. **Vol. 2**.

BASHKARAN K, ZUNAINA E, BAKIAH S, SULAIMAN SA, SIRAJUDEEN KNS et NAIK V (2011). Anti-inflammatory and antioxidant effects of Tualang honey in alkali injury on the eyes of rabbits: experimental animal study. *BMC complementary and alternative medicine*. **Vol. 11**, n° 1, pp. 1.

BATCHELDER T (2002). A novel mechanism of liver enhancement from a Traditional bee product.(Medical Anthropology). *Townsend Letter for Doctors and Patients*. pp. 46–49.

BAUDRY E, SOLIGNAC M, GARNERY L, GRIES M, CORNUET J et KOENIGER N (1998). Relatedness among honeybees (*Apis mellifera*) of a drone congregation. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*. **Vol. 265**, n° 1409, pp. 2009–2014.

BAUER DM, WING IS (2010). Economic consequences of pollinator declines : a synthesis. *Agricultural and Resource Economics Review*. **Vol. 39**, n° 3, pp. 368–383.

BAYLAC M, GARNERY L, THARAVY D, PEDRAZA-ACOSTA J, RORTAIS A et ARNOLD G (2008). ApiClass, an automatic online wing morphometric expert system for honey bee worker identification.

BECK ML, DAVIES S, MOORE IT, SCHOENLE LA, KERMAN K, VERNASCO BJ et SEWALL KB (2016). Beeswax corticosterone implants produce long-term elevation of plasma corticosterone and influence condition. *General and Comparative Endocrinology*. **Vol. 233**, pp. 109–114.

BEEKMAN M, CALIS JNM, OLDROYD BP et RATNIEKS FLW (2002). When do honey bee guards reject their former nestmates after swarming? *Insectes sociaux*. **Vol. 49**, n° 1, pp. 56–61.

BEHRENS D, HUANG Q, GESSNER C, ROSENKRANZ P, FREY E, LOCKE B, MORITZ RFA et KRAUS FB (2011). Three QTL in the honey bee *Apis mellifera* L. suppress reproduction of the parasitic mite *Varroa destructor*. *Ecology and evolution*. **Vol. 1**, n° 4, pp. 451–458.

BELLOY L, IMDORF A, FRIES I, FORSGREN E, BERTHOUD H, KUHN R et CHARRIÈRE JD (2007). Spatial distribution of *Melissococcus plutonius* in adult honey bees collected from apiaries and colonies with and without symptoms of European foulbrood. *Apidologie*. **Vol. 38**, n° 2, pp. 136–140.

- BELOSTOTSKIĀ NI, KAS' IANENKO VI, DUBTSOVA EA (2008). Influence of honey, royal jelly and propolis on accelerating acetate healing of experimental gastric ulcers in rats. *Experimental & clinical gastroenterology*, **Vol. 6**, p. 46-50.
- BENDALI F, MEZIANI F, FRANCO S et HENDRIKX P (2014). Bilan de la surveillance des maladies et troubles des abeilles sur l'année 2013. *Bulletin Epidémiologique Santé Animale Alimentation*. n° 64, pp. 72-77.
- BENJAMIN A et MCCALLUM B (2009). *A world without bees*. Random House.
- BERND H (1979). Thermoregulation of African and European honeybees during foraging, attack, and hive exits and returns. *Journal of Experimental Biology*. **Vol. 80**, n° 1, pp. 217–229.
- BERTRAND B (2013). *Analyse de la diversité moléculaire de populations d'abeilles de la lignée ouest-méditerranéenne (Apis mellifera mellifera) dans le but de la conservation*. Université Paris Sud-Paris XI.
- BEVK D, KRALJ J et ČOKL A (2012). Coumaphos affects food transfer between workers of honeybee *Apis mellifera*. *Apidologie*. **Vol. 43**, n° 4, pp. 465–470.
- BEYE M, GATTERMEIER I, HASSELMANN M, GEMPE T, SCHIOETT M, BAINES JF, SCHLIPALIUS D, MOUGEL F, EMORE C, RUEPPELL O, SIRVIO A, GUZMAN-NOVOA E, HUNT G, SOLIGNAC M et PAGE RE (2006). Exceptionally high levels of recombination across the honey bee genome. *Genome Research*. **Vol. 16**, n° 11, pp. 1339-1344.
- BEYE M, HASSELMANN M, FONDRK MK, PAGE RE et OMHOLT SW (2003). The gene *csd* is the primary signal for sexual development in the honeybee and encodes an SR-type protein. *Cell*. **Vol. 114**, n° 4, pp. 419–429.
- BEYE M, HUNT GJ, PAGE RE, FONDRK MK, GROHMANN L et MORITZ RFA (1999). Unusually high recombination rate detected in the sex locus region of the honey bee (*Apis mellifera*). *Genetics*. **Vol. 153**, n° 4, pp. 1701–1708.
- BEYE M, SEELMANN C, GEMPE T, HASSELMANN M, VEKEMANS X, FONDRK MK et PAGE RE (2013). Gradual Molecular Evolution of a Sex Determination Switch through Incomplete Penetrance of Femaleness. *Current Biology*. **Vol. 23**, n° 24, pp. 2559-2564.
- BIENEFELD K et PIRCHNER F (1990). Heritabilities for several colony traits in the honeybee (*Apis mellifera carnica*). *Apidologie*. **Vol. 21**, n° 3, pp. 175-183.
- BIENEFELD K, EHRHARDT K et REINHARDT F (2007). Genetic evaluation in the honey bee considering queen and worker effects—a BLUP-animal model approach. *Apidologie*. **Vol. 38**, n° 1, pp. 77–85.
- BIENEFELD K, EHRHARDT K et REINHARDT F (2008). Bee breeding around the world : Noticeable success in honey bee selection after the introduction of genetic evaluation using BLUP. *American bee journal*.

- BIESMEIJER JC, ROBERTS SPM, REEMER M, OHLEMÜLLER R, EDWARDS M, PEETERS T, SCHAFFERS AP, POTTS SG, KLEUKERS R et THOMAS CD (2006). Parallel declines in pollinators and insect-pollinated plants in Britain and the Netherlands. *Science*. **Vol. 313**, n° 5785, pp. 351–354.
- BIEWER M, SCHLESINGER F et HASSELMANN M (2015). The evolutionary dynamics of major regulators for sexual development among Hymenoptera species. *Frontiers in Genetics* **Vol. 6**.
- BIEWER M, LECHNER S et HASSELMANN M (2016). Similar but not the same : insights into the evolutionary history of paralogous sex-determining genes of the dwarf honey bee *Apis florea*. *Heredity*. **Vol. 116**, n° 1, pp. 12-22.
- BIGIO G, TOUFALIA HA, HUGHES WOH et RATNIEKS FLW (2014). The effect of one generation of controlled mating on the expression of hygienic behaviour in honey bees. *Journal of Apicultural Research*. **Vol. 53**, n° 5, pp. 563-568.
- BILLIARD R (1900). *Notes sur l'abeille et sur l'apiculture dans l'antiquité*. Le Bigot.
- BINAZZI A et SCHEURER S (2009). *Atlas of the honeydew producing conifer aphids of Europe*. Aracne.
- BLAIR SE, COKCETIN NN, HARRY EJ et CARTER DA (2009). The unusual antibacterial activity of medical-grade *Leptospermum* honey: antibacterial spectrum, resistance and transcriptome analysis. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*. **Vol. 28**, n° 10, pp. 1199–1208.
- BLANCHARD P, SCHURR F, CELLE O, COUGOULE N, DRAJNUDEL P, THIÉRY R, FAUCON JP et RIBIÈRE M (2008). First detection of Israeli acute paralysis virus (IAPV) in France, a dicistrovirus affecting honeybees (*Apis mellifera*). *Journal of invertebrate pathology*. **Vol. 99**, n° 3, pp. 348–350.
- BLOT J (2007). Le piégeage des fondatrices. *Bull. Tech. Apic.* 2007. **Vol. 34**, n° 4, pp. 201–204.
- BLUM MS (1992). Honey bee pheromones. *The hive and the honey bee*. pp. 373–400.
- BOECKING O et SPIVAK M (1999). Behavioral defenses of honey bees against *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie*. **Vol. 30**, pp. 141–158.
- BOGDANOV S (2009). External Applications of Honey. *ResearchGate*.
- BOND WJ (1994). Do mutualisms matter? Assessing the impact of pollinator and disperser disruption on plant extinction. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*. **Vol. 344**, n° 1307, pp. 83–90.
- BOOKSTEIN FL (1997). *Morphometric tools for landmark data: geometry and biology*. Cambridge University Press.
- BOOMSMA JJ, BAER B et HEINZE J (2005). The evolution of male traits in social insects. *Annu. Rev. Entomol.* **Vol. 50**, pp. 395–420.
- BOUGEOIS L et GOURBET L (2008). Apparition et radiation des Angiospermes au Crétacé.

- BREED MD, WELCH CK et CRUZ R (1994). Kin discrimination within honey bee (*Apis mellifera*) colonies : an analysis of the evidence. *Behavioural Processes*. **Vol. 33**, n° 1, pp. 25–39.
- BREED MD (1998). Recognition pheromones of the honey bee. *Bioscience*. **Vol. 48**, n° 6, pp. 463–470.
- BRITTAI C, WILLIAMS N, KREMEN C et KLEIN AM (2013). Synergistic effects of non-*Apis* bees and honey bees for pollination services. *Proceedings of the Royal Society of London B : Biological Sciences*. **Vol. 280**, n° 1754, pp. 2012-2767.
- BRODSCHNEIDER R et CRAILSHEIM K (2010). Nutrition and health in honey bees. *Apidologie*. **Vol. 41**, n° 3, pp. 278–294.
- BROTHERS D (1999). Phylogeny and evolution of wasps, ants and bees (Hymenoptera, Chrysidoidea, Vespoidea and Apoidea). *Zoologica Scripta*. N° 28, pp. 233-249.
- BRUDZYNSKI K et LANNIGAN R (2012). Mechanism of honey bacteriostatic action against MRSA and VRE involves hydroxyl radicals generated from honey's hydrogen peroxide.
- BRUNEAU (2011). Le frelon asiatique, déjà là. *ActuApi*. **Vol. 55**, pp. 1–6.
- BÜCHLER R, BERG S, KEZIC N, PECHHACKER H, VAN PRAAGH J, BUBALO D, RITTER W et BIENEFELD K (2002). Survival test without treatment against varroaosis : the island project in Croatia. *Apidologie (France)*.
- BÜCHLER R, ANDONOV S, BIENEFELD K, COSTA C, HATJINA F, KEZIC N, KRYGER P, SPIVAK M, UZUNOV A et WILDE J (2013). Standard methods for rearing and selection of *Apis mellifera* queens. *Journal of Apicultural Research*. **Vol. 52**, n° 1.
- BÜCHLER R, BERG S et LE CONTE Y (2010). Breeding for resistance to *Varroa destructor* in Europe. *Apidologie*. **Vol. 41**, n° 3, pp. 393–408.
- BUCZINSKI S et BÉLANGER AM (2004). Conduite à tenir face à une péricardite chez un bovin. *Le Point vétérinaire : revue d'enseignement post-universitaire et de formation permanente*. **Vol. 35**, n° 251, pp. 36.
- BULL JJ (1983). *Evolution of sex determining mechanisms*. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc.
- BUTCHART SHM, WALPOLE M, COLLEN B, VAN STRIEN A, SCHARLEMANN JPW, ALMOND REA, BAILLIE JEM, BOMHARD B, BROWN C et BRUNO J (2010). Global biodiversity : indicators of recent declines. *Science*. **Vol. 328**, n° 5982, pp. 1164–1168.
- BUTLER CG, CALLOW RK et JOHNSTON NC (1962). The isolation and synthesis of queen substance, 9-oxodec-trans-2-enoic acid, a honeybee pheromone. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*. **Vol. 155**, n° 960, pp. 417–432.
- BUTLER CG (1957). The process of queen supersedure in colonies of honeybees (*Apis mellifera* Linn.). *Insectes sociaux*. **Vol. 4**, n° 3, pp. 211–223.

- CALDERONE NW, (1998). Proximate mechanisms of age polyethism in the honey bee, *Apis mellifera* L. *Apidologie*. **Vol. 29**, n° 1-2, pp. 127-158.
- CAMERON RC, DUNCAN EJ et DEARDEN PK, (2013). Biased gene expression in early honeybee larval development. *BMC genomics*. **Vol. 14**, n° 1, pp. 903.
- CAO LF, ZHENG HQ, PIRK CWW, HU FL et XU ZW, (2016). High Royal Jelly-Producing Honeybees (*Apis mellifera ligustica*)(Hymenoptera: Apidae) in China. *Journal of economic entomology*. **Vol. 109**, n° 2, pp. 510–514.
- CARIVEAU DP, NAYAK GK, BARTOMEUS I, ZIENTEK J, ASCHER JS, GIBBS J et WINFREE R, (2016). The Allometry of Bee Proboscis Length and Its Uses in Ecology. *PloS one*. **Vol. 11**, n° 3, pp. e0151482.
- CARIVEAU DP, WILLIAMS NM, BENJAMIN FE et WINFREE R (2013). Response diversity to land use occurs but does not consistently stabilise ecosystem services provided by native pollinators. *Ecology letters*. **Vol. 16**, n° 7, pp. 903–911.
- CARRECK NL, WILLIAMS IH et LITTLE DJ (1997). The movement of honey bee colonies for crop pollination and honey production by beekeepers in Great Britain. *Bee World*. **Vol. 78**, n° 2, pp. 67–77.
- CARVALHEIRO LG, KUNIN WE, KEIL P, AGUIRRE-GUTIÉRREZ J, ELLIS WN, FOX R, GROOM Q, HENNEKENS S, VAN LANDUYT W, MAES D, VAN DE MEUTTER F, MICHEZ D, RASMONT P, ODE B, POTTS SG, REEMER M, ROBERTS SPM, SCHAMINÉE J, WALLISDEVRIES MF et BIESMEIJER JC (2013). Species richness declines and biotic homogenisation have slowed down for NW-European pollinators and plants. *Ecology Letters*. **Vol. 16**, n° 7, pp. 870-878.
- CARVALHO GA (2001). The number of sex alleles (CSD) in a bee population and its practical importance (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Hymenoptera Research*. **Vol. 10**, n° 1, pp. 10–15.
- CASSIER P et LENSKY Y (1995). Ultrastructure of the wax gland complex and secretion of beeswax in the worker honey bee *Apis mellifera* L. *Apidologie*. **Vol. 26**, pp. 17–17.
- CASTEEL DB (1912). *The behavior of the honey bee in pollen collection*. Library of Alexandria.
- CHANG X, WANG J, YANG S, CHEN S et SONG Y (2011). Antioxidative, antibrowning and antibacterial activities of sixteen floral honeys. *Food & Function*. **Vol. 2**, n° 9, pp. 541.
- CHAUZAT MP, LAURENT M, RIVIERE MP, SAUGEON C, HENDRIKX P et RIBIRE-CHABERT M (2014). EPILOBEE : A pan-European epidemiological study on honey bee colony losses 2012-2013. *Sophia Antipolis, France: European Union Reference Laboratory for Honeybee Health (EURL)*.
- CHAUZAT MP (2009). Une nouvelle menace pour les abeilles : l'introduction du frelon asiatique *vespa velutina* en France. *Bulletin Epidémiologique AFSSA*. N° 32, pp. 8–11.
- CHEN S, SU S et LIN X (2002). An introduction to high-yielding royal jelly production methods in China. *Bee World*. **Vol. 83**, n° 2, pp. 69–77.

- CHEN YP et SIEDE R (2007). Honey bee viruses. *Advances in virus research*. **Vol. 70**, pp. 33–80.
- CHISEL JT (2015). Honey Bees' Impact on the US Economy.
- CHOI SH, CHO SK, KANG SS, BAE CS, BAI YH, LEE SH et PAK SC (2003). Effect of apitherapy in piglets with preweaning diarrhea. *The American journal of Chinese medicine*. **Vol. 31**, n° 2, pp. 321–326.
- CLÉMENT H et CHESNAIS F (2009). *L'abeille : sentinelle de l'environnement*. Alternatives.
- CLEMENT SL, HELLIER BC, ELBERSON LR, STASKA RT et EVANS MA (2007). Flies (Diptera: Muscidae: Calliphoridae) are efficient pollinators of *Allium ampeloprasum* L.(Alliaceae) in field cages. *Journal of Economic Entomology*. **Vol. 100**, n° 1, pp. 131–135.
- COBEY S, SHEPPARD WS et TARPY DR (2012). Status of breeding practices and genetic diversity in domestic US honey bees. *Honey Bee Colony Health: Challenges and Sustainable Solutions*. CRC, Boca Raton, FL. 2012. pp. 39–49.
- COBEY SW, TARPY DR et WOYKE J (2013). Standard methods for instrumental insemination of *Apis mellifera* queens. *Journal of Apicultural Research*. **Vol. 52**, n° 4, pp. 1–18.
- COBEY SW (2007). Comparison studies of instrumentally inseminated and naturally mated honey bee queens and factors affecting their performance. *Apidologie*. **Vol. 38**, n° 4, pp. 390–410.
- COELHO MS, SILVA JHV, OLIVEIRA ERA, AMÂNCIO ALL, SILVA ND et LIMA RMB (2010). Propolis and its use in production animals. *Arch. Anim. Sci*. **Vol. 59**, pp. 95–112.
- COLIN ME, BONMATIN JM, MOINEAU I, GAIMON C, BRUN S et VERMANDERE JP (2004). A method to quantify and analyze the foraging activity of honey bees: relevance to the sublethal effects induced by systemic insecticides. *Archives of environmental contamination and toxicology*. **Vol. 47**, n° 3, pp. 387–395.
- COLLINS AM et PETTIS JS (2013). Correlation of queen size and spermathecal contents and effects of miticide exposure during development. *Apidologie*. **Vol. 44**, n° 3, pp. 351–356.
- COMBS JR GF (1972). The engorgement of swarming worker honeybees. *Journal of Apicultural Research*. **Vol. 11**, n° 3, pp. 121–128.
- CONTE YL et HEFETZ A (2008). Primer Pheromones in Social Hymenoptera. *Annual Review of Entomology*. **Vol. 53**, n° 1, pp. 523-542.
- COOK AJ (1880). The tongue of the honey bee. *The American Naturalist*. **Vol. 14**, n° 4, pp. 271–280.
- COOK JM (1993). Sex determination in the Hymenoptera: a review of models and evidence. *Heredity*. octobre 1993. **Vol. 71**, n° 4, pp. 421-435.

- COOPER RA, MOLAN PC et HARDING KG (2002). The sensitivity to honey of Gram-positive cocci of clinical significance isolated from wounds. *Journal of Applied microbiology*. **Vol. 93**, n° 5, pp. 857–863.
- CORBY-HARRIS V, MEADOR CAD, SNYDER LA, SCHWAN MR, MAES P, JONES B M, WALTON A et ANDERSON KE (2016). Transcriptional, translational, and physiological signatures of undernourished honey bees (*Apis mellifera*) suggest a role for hormonal factors in hypopharyngeal gland degradation. *Journal of insect physiology*. **Vol. 85**, pp. 65–75.
- CORNUET JM (1982). Etude théorique sur la sélection du caractère « production de miel » chez l'abeille. I. Modèle génétique et statistique. *Apidologie*. **Vol. 13**, n° 1, pp. 39–65.
- CORNUET JM, GARNERY L et SOLIGNAC M (1991). Putative origin and function of the intergenic region between COI and COII of *Apis mellifera* L. mitochondrial DNA. *Genetics*. **Vol. 128**, n° 2, pp. 393–403.
- CORNUET JM, FRESNAYE J et TASSENCOURT L (1975). Discrimination et classification de populations d'abeilles à partir de caractères biométriques. *Apidologie*. **Vol. 6**, n° 2, pp. 145–187.
- COSTANZA R, DE GROOT R, SUTTON P, VAN DER PLOEG S, ANDERSON SJ, KUBISZEWSKI I, FARBER S et TURNER RK (2014). Changes in the global value of ecosystem services. *Global Environmental Change*. **Vol. 26**, pp. 152–158.
- COUQUET Y, DESMOULIÈRE A et RIGAL ML (2013). Les propriétés antibactériennes et cicatrisantes du miel. *Actualités pharmaceutiques*. **Vol. 52**, n° 531, pp. 22–25.
- COUTO A, LAPEYRE B, THIÉRY D et SANDOZ JC (2016). Olfactory pathway of the hornet *Vespa velutina* : New insights into the evolution of the hymenopteran antennal lobe : The Hornet Olfactory Pathway. *Journal of Comparative Neurology*. **Vol. 524**, n° 11, pp. 2335–2359.
- COX MD et MYERSCOUGH MR (2003). A flexible model of foraging by a honey bee colony : the effects of individual behaviour on foraging success. *Journal of theoretical biology*. **Vol. 223**, n° 2, pp. 179–197.
- COX-FOSTER DL, CONLAN S, HOLMES EC, PALACIOS G, EVANS JD, MORAN NA, QUAN PL, BRIESE T, HORNIG M et GEISER DM (2007). A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science*. **Vol. 318**, n° 5848, pp. 283–287.
- CRANE E (1980). *A book of honey*. Oxford University Press.
- CREPET WL, NIXON KC et GANDOLFO MA (2004). Fossil evidence and phylogeny : the age of major angiosperm clades based on mesofossil and macrofossil evidence from Cretaceous deposits. *American Journal of Botany*. **Vol. 91**, n° 10, pp. 1666–1682.
- CROZIER RH, CROZIER YC et MACKINLAY AG (1989). The CO-I and CO-II region of honeybee mitochondrial DNA : evidence for variation in insect mitochondrial evolutionary rates. *Molecular Biology and Evolution*. **Vol. 6**, n° 4, pp. 399–411.
- CROZIER RH et PAGE RE (1985). On being the right size : male contributions and multiple mating in social Hymenoptera. *Behavioral ecology and sociobiology*. **Vol. 18**, n° 2, pp. 105–115.

CROZIER RH et FJERDINGSTAD EJ (2001). Polyandry in social Hymenoptera—disunity in diversity ? *Annales Zoologici Fennici. Finnish Zoological and Botanical Publishing Board*, pp. 267-285.

CROZIER RH et PAMILO P (1997). Evolution of social insect colonies. *Annals of the Entomological Society of America*. **Vol. 90**, no 6, p. 861-862.

D'AGUILAR J (2006). *Histoire de l'entomologie*. Delachaux et Niestlé Paris, France.

DADE HA (2009). *Anatomy and dissection of the honeybee*. International Bee Research Association.

DAINAT B, EVANS JD, CHEN YP, GAUTHIER L et NEUMANN P (2012). Dead or Alive : Deformed Wing Virus and *Varroa destructor* Reduce the Life Span of Winter Honeybees. *Applied and Environmental Microbiology*. **Vol. 78**, n° 4, pp. 981-987.

DANFORTH BN, FANG J et SIPES S (2006a). Analysis of family-level relationships in bees (Hymenoptera: Apiformes) using 28S and two previously unexplored nuclear genes : CAD and RNA polymerase II. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. **Vol. 39**, n° 2, pp. 358-372.

DANFORTH BN, SIPES S, FANG J et BRADY SG (2006b). The history of early bee diversification based on five genes plus morphology. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **Vol. 103**, n° 41, pp. 15118–15123.

DANFORTH BN et POINAR GO (2011). Morphology, classification, and antiquity of *Melittosphex burmensis* (Apoidea: Melittosphecidae) and implications for early bee evolution. *Journal of Paleontology*. **Vol. 85**, n° 5, pp. 882–891.

DANKA RG, RINDERER TE, SPIVAK M et KEFUSS J (2013). Comments on: « *Varroa destructor*, research avenues towards sustainable control ». *Journal of Apicultural Research*. **Vol. 52**, n° 2, pp. 69–71.

DARROUZET E, GÉVAR J, GUIGNARD Q et ARON S (2015). Production of Early Diploid Males by European Colonies of the Invasive Hornet *Vespa velutina nigrithorax*. *PLOS ONE*. **Vol. 10**, n° 9, pp. e0136680.

DE ALMEIDA EB, CARDOSO JC, DE LIMA AK, DE OLIVEIRA NL, DE PONTES-FILHO NT, LIMA SO, SOUZA ICL et DE ALBUQUERQUE-JÚNIOR RLC (2013). The incorporation of Brazilian propolis into collagen-based dressing films improves dermal burn healing. *Journal of ethnopharmacology*. **Vol. 147**, n° 2, pp. 419–425.

DE JONG D, MORSE RA, GUTENMANN WH et LISK DJ (1977). Selenium in pollen gathered by bees foraging on fly ash-grown plants. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*. **Vol. 18**, n° 4, pp. 442–444.

DE LA RÚA P, JAFFÉ R, DALL'OLIO R, MUÑOZ I et SERRANO J (2009). Biodiversity, conservation and current threats to European honeybees. *Apidologie*. **Vol. 40**, n° 3, pp. 263–284.

DE RÉAUMUR RAF, (1740). *Mémoires pour servir à l'histoire des insectes*.

DE RUIJTER A et KAAS JP (1983). The anatomy of the *Varroa* mite. *Varroa jacobsoni Oud Affecting Honey Bees : Present Status and Needs*. AA Balkema, Rotterdam. pp. 45–47.



- DE SOUZA DA, WANG Y, KAFTANOGLU O, DE JONG D, AMDAM GV, GONÇALVES LS et FRANCOY TM (2015). Morphometric Identification of Queens, Workers and Intermediates in In Vitro Reared Honey Bees (*Apis mellifera*). *PloS one*. **Vol. 10**, n° 4, pp. e0123663.
- DEBEVEC AH, CARDINAL S et DANFORTH BN (2012). Identifying the sister group to the bees: a molecular phylogeny of Aculeata with an emphasis on the superfamily Apoidea. *Zoologica Scripta*. **Vol. 41**, n° 5, pp. 527–535.
- DECOURTYE A (2006). Jachères à couvert floral diversifié en zone de grandes cultures : évaluation des intérêts apicoles et paysagers-Rapport final. *Acta: Réseau thématique Jachères florales*.
- DECOURTYE A, DEVILLERS J, AUPINEL P, BRUN F, BAGNIS C, FOURRIER J et GAUTHIER M (2011). Honeybee tracking with microchips: a new methodology to measure the effects of pesticides. *Ecotoxicology*. **Vol. 20**, n° 2, pp. 429–437.
- DECOURTYE A, DEVILLERS J, CLUZEAU S, CHARRETON M et PHAM-DELÈGUE MH (2004). Effects of imidacloprid and deltamethrin on associative learning in honeybees under semi-field and laboratory conditions. *Ecotoxicology and environmental safety*. **Vol. 57**, n° 3, pp. 410–419.
- DEDEJ S et DELAPLANE KS (2003). Honey bee (Hymenoptera: Apidae) pollination of rabbiteye blueberry *Vaccinium ashei* var. 'Climax' is pollinator density-dependent. *Journal of Economic Entomology*. **Vol. 96**, n° 4, pp. 1215–1220.
- DEDEKIND A (1901). *Altägyptisches Bienenwesen im Lichte der modernen Welt-Bienenwirthschaft*. Mayer & Müller.
- DEGRANDI-HOFFMAN G, WATKINS JC, COLLINS AM, LOPER GM, MARTIN JH, ARIAS MC et SHEPPARD WS (1998). Queen developmental time as a factor in the Africanization of European honey bee (Hymenoptera). *Annals of the Entomological Society of America*. **Vol. 91**, n° 1.
- DEGUZMAN LI, RINDERER TE et FRAKE AM (2007). Growth of *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) Populations in Russian Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Colonies. *Annals of the Entomological Society of America*. **Vol. 100**, n° 2, pp. 187-195.
- DELANEY DA, KELLER JJ, CAREN JR et TARPY DR (2011). The physical, insemination, and reproductive quality of honey bee queens (*Apis mellifera* L.). *Apidologie*. **Vol. 42**, n° 1, pp. 1-13.
- DEMICHELIS S, MANIMO A et PORPORATO M (2013). Trovato il primo nido di *Vespa velutina* a Vallecrosia (IM). *Comunicato Stampa. Università Degli Studi di Torino, Turin*. **Vol. 202013**.
- DÉONNA W (1956). *Revue belge d'archéologie et d'histoire de l'art*. tome XXVI . Académie Royale d'archéologie de Belgique .
- DESNEUX N, DECOURTYE A et DELPUECH JM (2007). The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annu. Rev. Entomol.* **Vol. 52**, pp. 81–106.

- DESWAL H, SINGH Y, GROVER HS et BHARDWAJ A (2016). Healing Effect of Propolis in Medicine and Dentistry : A review. *Innovare Journal of Ayurvedic Sciences*. pp. 1–4.
- DI PASQUALE G (2014). *Influence de l'alimentation pollinique sur la santé de l'abeille domestique, Apis mellifera L.* Université d'Avignon.
- DIETEMANN V, ELLIS JD et NEUMANN P (2013a). The COLOSS BEEBOOK Volume I, Standard methods for Apis mellifera research : Introduction. *Journal of Apicultural Research*. **Vol. 52**, n° 4, pp. 1-4.
- DIETEMANN V, ELLIS JD et NEUMANN P (2013b). The COLOSS BEEBOOK Volume II, Standard methods for Apis mellifera pest and pathogen research : Introduction. *Journal of Apicultural Research*. **Vol. 52**, n° 4, pp. 1-4.
- DINIZ-FILHO J, HEPBURN HR, RADLOFF S et FUCHS S (2000). Spatial analysis of morphological variation in African honeybees (*Apis mellifera L.*) on a continental scale. *Apidologie*. **Vol. 31**, n° 2, pp. 191–204.
- DODWAD V et KUKREJA BJ (2011). Propolis mouthwash : A new beginning. *Journal of Indian Society of Periodontology*. **Vol. 15**, n° 2, pp. 121.
- DORMANN CF, SCHWEIGER O, ARENS P, AUGENSTEIN I, AVIRON ST, BAILEY D, BAUDRY J, BILLETER R, BUGTER B et BUKACEK R (2008). Prediction uncertainty of environmental change effects on temperate European biodiversity. *Ecology letters*. **Vol. 11**, n° 3, pp. 235–244.
- DOUBLET V, LABARUSSIAS M, MIRANDA JR, MORITZ RFA et PAXTON RJ (2015). Bees under stress : sublethal doses of a neonicotinoid pesticide and pathogens interact to elevate honey bee mortality across the life cycle. *Environmental Microbiology*. **Vol. 17**, n° 4, pp. 969–983.
- DRAUSCHKE M, STEINHAGE V, DE LA VEGA AP, MÜLLER S, FRANCOY TM et WITTMANN D (2007). Reliable Biometrical Analysis in Biodiversity Information Systems. *PRIS*. pp. 27–36.
- DRELLER C et KIRCHNER WH (1993). Hearing in honeybees : localization of the auditory sense organ. *Journal of Comparative Physiology A*. **Vol. 173**, n° 3, pp. 275–279.
- DUFFIELD RM, SIMON-JORDAN C, RIDDICK EW et WHEELER JW (1990). Exocrine secretions of bees X. 3, 7-Dimethyldeca-2, 6-dien-1, 10-diol : A sex-specific compound from *Nomada annulata* (Hymenoptera: Anthophoridae). *Journal of chemical ecology*. **Vol. 16**, n° 4, pp. 1069–1076.
- DZIERZON J (1845). Gutachten über die von Herrn Direktor Stöhr im ersten und zweiten Kapitel des General-Gutachtens aufgestellten Fragen. *Eichstädter Bienenzeitung*. **Vol. 1**, n° 109-113, pp. 119–121.
- EHRHARDT K, REINSCH N, BÜCHLER R, GARRIDO C et BIENEFELD K (2007). Genetic parameters for Varroa resistance in the honeybee. *40th Apimondia International Apicultural Congress*. pp. 9–14.

- ELANGO N, HUNT BG, GOODISMAN MAD et SOOJIN VY (2009). DNA methylation is widespread and associated with differential gene expression in castes of the honeybee, *Apis mellifera*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **Vol. 106**, n° 27, pp. 11206–11211.
- ELLIS JD et MUNN PA (2005). The worldwide health status of honey bees. *Bee world*. **Vol. 86**, n° 4, pp. 88–101.
- ELSIK CG, WORLEY KC, BENNETT AK, BEYE M, CAMARA F, CHILDERS CP, DE GRAAF DC, DEBYSER G, DENG J, DEVREESE B (2014). Finding the missing honey bee genes : lessons learned from a genome upgrade. *Bmc Genomics*. **Vol. 15**, n° 1, pp. 1.
- ENGEL MS, HINOJOSA-DIAZ IA et RASNITSYN AP (2009). A honey bee from the Miocene of Nevada and the Biogeography of *Apis*. *Proceedings of the California academy of Sciences*. **Vol. 60**, n° 3, pp. 23-38.
- ENGEL MS (1999). The taxonomy of recent and fossil honey bees. *Journal of Hymenoptera research*. **Vol. 8**, n° 2, pp. 165-196.
- ENGEL MS (2000). A new interpretation of the oldest fossil bee (Hymenoptera: Apidae). *American Museum Novitates*. pp. 1–11.
- ENGEL MS (2001). A monograph of the Baltic amber bees and evolution of the Apoidea (Hymenoptera). *Bulletin of the American Museum of natural History*. pp. 1–192.
- ENGEL MS (2005). Family-group names for bees (Hymenoptera: Apoidea). *American Museum Novitates*. pp. 1–33.
- ESCH HE, ZHANG S, SRINIVASAN MV et TAUTZ J (2001). Honeybee dances communicate distances measured by optic flow. *Nature*. **Vol. 411**, n° 6837, pp. 581–583.
- ESCH HE (1976). Body temperature and flight performance of honey bees in a servo-mechanically controlled wind tunnel. *Journal of comparative physiology*. **Vol. 109**, n° 3, pp. 265-277.
- ESTOUP A, SOLIGNAC M, HARRY M et CORNUET JM (1993). Characterization of (GT)<sub>n</sub> and (CT)<sub>n</sub> microsatellites in two insect species : *Apis mellifera* and *Bombus terrestris*. *Nucleic Acids Research*. **Vol. 21**, n° 6, pp. 1427–1431.
- ESTOUP A, SOLIGNAC M et CORNUET JM (1994). Precise assessment of the number of patriline and of genetic relatedness in honeybee colonies. *Proceedings of the Royal Society of London B : Biological Sciences*. **Vol. 258**, n° 1351, pp. 1–7.
- ESTOUP A, GARNERY L, SOLIGNAC M et CORNUET JM (1995). Microsatellite variation in honey bee (*Apis mellifera* L.) populations : hierarchical genetic structure and test of the infinite allele and stepwise mutation models. *Genetics*. **Vol. 140**, n° 2, pp. 679–695.
- EVANS JD (2013). The i5K Initiative : advancing arthropod genomics for knowledge, human health, agriculture, and the environment. *Journal of Heredity*. **Vol. 104**, n° 5, pp. 595–600.

- EWNETU Y, LEMMA W et BIRHANE N (2013). Antibacterial effects of *Apis mellifera* and stingless bees honeys on susceptible and resistant strains of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae* in Gondar, Northwest Ethiopia. *BMC complementary and alternative medicine*. **Vol. 13**, n° 1, pp. 1.
- FAHRBACH SE et ROBINSON GE (1995). Behavioral development in the honey bee : toward the study of.
- FAUCON JP, MATHIEU L, RIBIERE M, MARTEL AC, DRAJNUDEL P, ZEGGANE S, AURIERES C et AUBERT MFA (2002). Honey bee winter mortality in France in 1999 and 2000. *Bee world*. **Vol. 83**, n° 1, pp. 14–23.
- FAUCON JP (2006). Mortalités hivernales 2005-2006. *Abeille Française (212)*. pp. 485–488.
- FEFFERMAN NH et STARKS PT (2006). A modeling approach to swarming in honey bees (*Apis mellifera*). *Insectes sociaux*. **Vol. 53**, n° 1, pp. 37–45.
- FELDLAUFER MF, HERBERT EW, SVOBODA JA, THOMPSON MJ et LUSBY WR (1985). Makisterone A. *Insect Biochemistry*. **Vol. 15**, n° 5, pp. 597-600.
- FERNANDES P, FERREIRA S, FONTE A, FERREIRA WESSEL D et CARDOSO S (2016). Antioxidant Properties of Bee Products of Plant-Origin Part 2. Propolis and Pollen.
- FERRARI TE et TAUTZ J (2015). Severe Honey Bee (*Apis mellifera*) Losses Correlate with Geomagnetic and Proton Disturbances in Earth's Atmosphere. *Journal of Astrobiology & Outreach*.
- FISCHER G, HÜBNER SO, VARGAS GD et VIDOR T (2008). Imunomodulação pela própolis. *Arquivos do Instituto Biológico*. **Vol. 75**, n° 2, pp. 247–253.
- FLURI P et FRICK R. (2005). L'apiculture en Suisse : état et perspectives. *Revue suisse d'agriculture*. **Vol. 37**, n° 2, pp. 81–86.
- FORD DM, HEPBURN HR, MOSELEY FB et RIGBY RJ (1981). Displacement sensors in the honeybee pollen basket. *Journal of Insect Physiology*. **Vol. 27**, n° 5, pp. 339–346.
- FORSGREN E (2010). European foulbrood in honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology*. **Vol. 103**, pp. S5-S9.
- FRANÇA FOS, BENVENUTI LA, FAN HW, DOS SANTOS DR, HAIN SH, PICCHIMARTINS FR, CARDOSO JLC, KAMIGUTI AS, THEAKSTON RDG et WARRELL DA (1994). Severe and fatal mass attacks by 'killer' bees (*Africanized honey bees—Apis mellifera scutellata*) in Brazil : clinicopathological studies with measurement of serum venom concentrations. *QJM*. **Vol. 87**, n° 5, pp. 269–282.
- FRANCEAGRIMER (2012). *Audit Économique De La Filière Apicole Française*. FranceAgriMer.
- FRANCIS BR, BLANTON WE, LITTLEFIELD JL et NUNAMAKER RA (1989). Hydrocarbons of the Cuticle and Hemolymph of the Adult Honey Bee (Hymenoptera: Apidae). *Annals of the Entomological Society of America*. **Vol. 82**, n° 4, pp. 486-494.

- FRANCK P, GARNERY L, CELEBRANO G, SOLIGNAC M et CORNUET J-M (2000). Hybrid origins of honeybees from Italy (*Apis mellifera ligustica*) and Sicily (*A. m. sicula*). *Molecular Ecology*. **Vol. 9**, n° 7, pp. 907-921.
- FRANCK P, GARNERY L, LOISEAU A, OLDROYD BP, HEPBURN HR, SOLIGNAC M et CORNUET J-M (2001). Genetic diversity of the honeybee in Africa : microsatellite and mitochondrial data. *Heredity*. **Vol. 86**, n° 4, pp. 420-430.
- FRANCK P, GARNERY L, SOLIGNAC M et CORNUET J-M (2000). Molecular confirmation of a fourth lineage in honeybees from the Near East. *Apidologie*. **Vol. 31**, n° 2, pp. 167–180.
- FRANCOY TM, PRADO PRR, GONÇALVES LS, COSTA LDF et DE JONG D (2006). Morphometric differences in a single wing cell can discriminate *Apis mellifera* racial types. *Apidologie*. **Vol. 37**, n° 1, pp. 91-97.
- FRANCOY TM, WITTMANN D, DRAUSCHKE M, MÜLLER S, STEINHAGE V, BEZERRA-LAURE MAF, DE JONG D et GONÇALVES LS (2008). Identification of Africanized honey bees through wing morphometrics : two fast and efficient procedures. *Apidologie*. **Vol. 39**, n° 5, pp. 488–494.
- FRANCOY TM, WITTMANN D, STEINHAGE V, DRAUSCHKE M, MÜLLER S, CUNHA DR, NASCIMENTO AM, FIGUEIREDO VLC, SIMÕES ZLP et DE JONG D (2009). Morphometric and genetic changes in a population of *Apis mellifera* after 34 years of Africanization. *Genet. Mol. Res.* **Vol. 8**, n° 2, pp. 709–717.
- FRANKIE GW, VINSON SB, NEWSTROM LE, BARTHELL JF, HABER WA et FRANKIE JK (1990). Plant phenology, pollination ecology, pollinator behaviour and conservation of pollinators in Neotropical dry forest. *Reproductive ecology of tropical forest plants*. **Vol. 7**, pp. 37–47.
- FRASER HM (1951). *Beekeeping in antiquity*.
- FRIES I, HANSEN H, IMDORF A et ROSENKRANZ P (2003). Swarming in honey bees (*Apis mellifera*) and *Varroa destructor* population development in Sweden. *Apidologie*. **Vol. 34**, n° 4, pp. 389–397.
- FRIES I, IMDORF A et ROSENKRANZ P (2006). Survival of mite infested (*Varroa destructor*) honey bee (*Apis mellifera*) colonies in a Nordic climate. *Apidologie*. **Vol. 37**, n° 5, pp. 564.
- FRISCH K.von (1967). *The dance language and orientation of bees* Cambridge. Mass.
- GALIZIA CG et MENZEL R (2001). The role of glomeruli in the neural representation of odours : results from optical recording studies. *Journal of Insect Physiology*. **Vol. 47**, n° 2, pp. 115–130.
- GALLAI N, SALLES J-M, SETTELE J et VAISSIÈRE BE (2009). Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecological economics*. **Vol. 68**, n° 3, pp. 810–821.

- GARIBALDI LA, STEFFAN-DEWENTER I, WINFREE R, AIZEN MA, BOMMARCO R, CUNNINGHAM SA, KREMEN C, CARVALHEIRO LG, HARDER LD et AFIK O (2013). Wild pollinators enhance fruit set of crops regardless of honey bee abundance. *Science*. **Vol. 339**, n° 6127, pp. 1608–1611.
- GARNERY L, CORNUET J-M et SOLIGNAC M (1992). Evolutionary history of the honey bee *Apis mellifera* inferred from mitochondrial DNA analysis. *Molecular Ecology*. **Vol. 1**, n° 3, pp. 145-154.
- GARNERY L, SOLIGNAC M, CELEBRANO G et CORNUET J-M (1993). A simple test using restricted PCR-amplified mitochondrial DNA to study the genetic structure of *Apis mellifera* L. *Experientia*. **Vol. 49**, n° 11, pp. 1016-1021.
- GARNERY L, FRANCK P, BAUDRY E, VAUTRIN D, CORNUET J-M et SOLIGNAC M (1998a). Genetic diversity of the west European honey bee (*Apis mellifera mellifera* and *A. m. iberica*) I. Mitochondrial DNA. *Genetics Selection Evolution*. **Vol. 30**, n° 1, pp. 31-47.
- GARNERY L, FRANCK P, BAUDRY E, VAUTRIN D, CORNUET J-M et SOLIGNAC M (1998b). Genetic diversity of the west European honey bee (*Apis mellifera mellifera* and *A. m. iberica*) II. Microsatellite loci. *Genetics Selection Evolution*. **Vol. 30**, n° 1, pp. 1.
- GARNERY L (2004). Analyse de la biodiversité du cheptel français de l'abeille domestique.
- GEMPE T, HASSELMANN M, SCHIØTT M, HAUSE G, OTTE M et BEYE M (2009). Sex Determination in Honeybees : Two Separate Mechanisms Induce and Maintain the Female Pathway. *PLoS Biology*. **Vol. 7**, n° 10, pp. e1000222.
- GENERSCH E, FORSGREN E, PENTIKÄINEN J, ASHIRALIEVA A, RAUCH S, KILWINSKI J et FRIES I (2006). Reclassification of *Paenibacillus larvae* subsp. *pulvifaciens* and *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* as *Paenibacillus larvae* without subspecies differentiation. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **Vol. 56**, n° 3, pp. 501–511.
- GENERSCH E et OTTEN C (2003). The use of repetitive element PCR fingerprinting (rep-PCR) for genetic subtyping of German field isolates of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*. *Apidologie*. **Vol. 34**, n° 3, pp. 195–206.
- GENERSCH E (2006). *Paenibacillus larvae* and American foulbrood in honeybees. *Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift*. **Vol. 120**, n° 1-2, pp. 26–33.
- GERSTER F (2012). Plan de développement durable de l'apiculture. Ministère de l'agriculture, de l'agroalimentaire et de la forêt.
- GETZ WM et SMITH KB (1983). Genetic kin recognition : honey bees discriminate between full and half sisters.
- GHANEM MM, MOHAMED ADA et RAMADAN MY (2009). Clinical, biochemical and histopathological study on parasitic gastroenteritis associated with caprine coccidiosis: comparative effect of Toltrazuril and Propolis. *Lucrări Științifice-Medicină Veterinară, Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară« Ion Ionescu de la Brad » Iași*. **Vol. 52**, n° 11 (1), pp. 565–580.

- GHAZOUL J (2005). Buzziness as usual ? Questioning the global pollination crisis. *Trends in ecology & evolution*. **Vol. 20**, n° 7, pp. 367–373.
- GHELDOLF N, WANG XH et ENGESETH NJ (2003). Buckwheat honey increases serum antioxidant capacity in humans. *Journal of agricultural and food chemistry*. **Vol. 51**, n° 5, pp. 1500–1505.
- GONÇALVES LS, STORT AC et DE JONG D (1991). Beekeeping in Brazil. *The « African » Honey Bee*. Boulder Co: Westview. pp. 359–372.
- GONCALVES LS (1974). Comments on the aggressiveness of the Africanized bees in-Brazil. 2. *American bee journal*. 1974.
- GONÇALVES LS (2004). The big challenge : Development of beekeeping with Africanized honey bees in Northeast Brazil. In : *Proceeding of the 8th IBRA International Conference on Tropical Bees and VI Encontro sobre Abelhas, Ribeirão Preto, SP, Brasil*. pp. 241–246.
- GOODMAN L (2003). *Form and function in the honey bee*. International bee research association.
- GOODWIN S, MCPHERSON JD et MCCOMBIE WR (2016). Coming of age : ten years of next-generation sequencing technologies. *Nature Reviews Genetics*. **Vol. 17**, n° 6, pp. 333–351.
- GOUDIE F, ALLSOPP MH, BEEKMAN M, LIM J et OLDROYD BP (2012). Heritability of worker ovariole number in the Cape honey bee *Apis mellifera capensis*. *Insectes sociaux*. **Vol. 59**, n° 3, pp. 351–359.
- GOUJON M, MCWILLIAM H, LI W, VALENTIN F, SQUIZZATO S, PAERN J et LOPEZ R (2010). A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL–EBI. *Nucleic acids research*. **Vol. 38**, n° suppl 2, pp. W695–W699.
- GOULD JL, HENEREY M et MACLEOD MC (1970). Communication of Direction by the Honey Bee. *Science*. **Vol. 169**, n° 3945, pp. 544–554.
- GOULD JL (1976). The Dance-Language Controversy. *The Quarterly Review of Biology*. **Vol. 51**, n° 2, pp. 211–244.
- GOULSON D, LYE GC et DARVILL B (2008). Decline and conservation of bumble bees. *Annu. Rev. Entomol.* **Vol. 53**, pp. 191–208.
- GOULSON D, NICHOLLS E, BOTÍAS C et ROTHERAY EL (2015). Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science*. **Vol. 347**, n° 6229, pp. 1255–1257.
- GRAVELEY BR (2000). Sorting out the complexity of SR protein functions. *Rna*. **Vol. 6**, n° 9, pp. 1197–1211.
- GRIBAKIN FG (1969). Cellular basis of colour vision in the honey bee. *Nature*. **Vol. 223**, pp. 639–641.
- GRIMALDI D et ENGEL MS (2005). *Evolution of the Insects*. Cambridge University Press.

- GRIMALDI D (1999). The co-radiations of pollinating insects and angiosperms in the Cretaceous. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. pp. 373–406.
- GROH C, TAUTZ J et RÖSSLER W (2004). Synaptic organization in the adult honey bee brain is influenced by brood-temperature control during pupal development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **Vol. 101**, n° 12, pp. 4268-4273.
- GROSSO-SILVA JM et MAIA M (2012). *Vespa velutina* Lepeletier, 1836 (Hymenoptera, Vespidae), new species for Portugal. *Arquivos entomol6gicos*. n° 6, pp. 53–54.
- GROZINGER CM, RICHARDS J et MATTILA HR (2014). From molecules to societies : mechanisms regulating swarming behavior in honey bees (*Apis* spp.). *Apidologie*. **Vol. 45**, n° 3, pp. 327–346.
- GRÜTER C et FARINA WM (2009). The honeybee waggle dance : can we follow the steps ? *Trends in Ecology & Evolution*. **Vol. 24**, n° 5, pp. 242–247.
- GUO X, SU S, SKOGERBOE G, DAI S, LI W, LI Z, LIU F, NI R, GUO Y et CHEN S (2013). Recipe for a busy bee : microRNAs in Honey Bee caste determination. *PLoS One*. **Vol. 8**, n° 12, pp. e81661.
- HADDAD N, BATAINH AM, MIGDADI OS, SAINI D, KRISHNAMURTHY V, PARAMESWARAN S et ALHAMURI Z (2015). Next generation sequencing of *Apis mellifera syriaca* identifies genes for *Varroa* resistance and beneficial bee keeping traits. *Insect Sci*.
- HADLEY NF (1982). Cuticle ultrastructure with respect to the lipid waterproofing barrier. *Journal of Experimental Zoology*. **Vol. 222**, n° 3, pp. 239–248.
- HALL HG et SMITH DR (1991). Distinguishing African and European honeybee matrilineages using amplified mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **Vol. 88**, n° 10, pp. 4548–4552.
- HAMILTON WD (1963). The evolution of altruistic behavior. *The American Naturalist*. **Vol. 97**, n° 896, pp. 354–356.
- HAMILTON WD (1964). The genetical evolution of social behaviour. II. *Journal of theoretical biology*. **Vol. 7**, n° 1, pp. 17–52.
- HANSEN H et BRØDSGAARD CJ (1995). Field trials with induced infection of *Bacillus* larvae. *Proceedings of the XXIV International Apiculture Congress of Apimondia, Lausanne*. pp. 166–171.
- HANSEN H et BRØDSGAARD CJ (1999). American foulbrood : a review of its biology, diagnosis and control. *Bee World*. **Vol. 80**, n° 1, pp. 5-23.
- HARBO JR et HARRIS JW (1999). Heritability in honey bees (Hymenoptera: Apidae) of characteristics associated with resistance to *Varroa jacobsoni* (Mesostigmata: Varroidae). *Journal of Economic Entomology*. **Vol. 92**, n° 2, pp. 261–265.
- HARBO JR et HARRIS JW (2005). Suppressed mite reproduction explained by the behaviour of adult bees. *Journal of Apicultural Research*. **Vol. 44**, n° 1, pp. 21–23.



HARIRAM V et BHARATHWAAJ R (2015). Extraction and Optimization of biodiesel yield from wax esters of *Apis mellifera* (Honey Bee). *International Journal of ChemTech Research*. **Vol. 8**, n° 9, pp. 433–437.

HARRISON JM (1987). Roles of individual honeybee workers and drones in colonial thermogenesis. *Journal of Experimental Biology*. **Vol. 129**, n° 1, pp. 53-61.

HARTFELDER K, GUIDUGLI-LAZZARINI KR, CERVONI MS, SANTOS DE et HUMANN FC (2015). Chapter One - Old Threads Make New Tapestry—Rewiring of Signalling Pathways Underlies Caste Phenotypic Plasticity in the Honey Bee, *Apis mellifera* L. *Advances in Insect Physiology*. Academic Press. pp. 1-36. Genomics, Physiology and Behaviour of Social Insects.

HARTMANN F (1926). *L'agriculture dans l'ancienne Egypte*.

HASEMAN L (1961). How long can spores of American foulbrood live. *Am. Bee J.* **Vol. 101**, pp. 298–299.

HASSELMANN M et BEYE M (2006). Pronounced Differences of Recombination Activity at the Sex Determination Locus of the Honeybee, a Locus Under Strong Balancing Selection. *Genetics*. **Vol. 174**, n° 3, pp. 1469-1480.

HASSELMANN M, LECHNER S, SCHULTE C et BEYE M (2010). Origin of a function by tandem gene duplication limits the evolutionary capability of its sister copy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **Vol. 107**, n° 30, pp. 13378-13383.

HASSELMANN M et BEYE M (2004). Signatures of selection among sex-determining alleles of the honey bee. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **Vol. 101**, n° 14, pp. 4888–4893.

HASSELMANN M, GEMPE T, SCHIØTT M, NUNES-SILVA CG, OTTE M et BEYE M (2008). Evidence for the evolutionary nascence of a novel sex determination pathway in honeybees. *Nature*. **Vol. 454**, n° 7203, pp. 519-522.

HASSELMANN M, VEKEMANS X, PFLUGFELDER J, KOENIGER N, KOENIGER G, TINGEK S et BEYE M (2008). Evidence for Convergent Nucleotide Evolution and High Allelic Turnover Rates at the complementary sex determiner Gene of Western and Asian Honeybees. *Molecular Biology and Evolution*. **Vol. 25**, n° 4, pp. 696-708.

HASTINGS ML et KRAINER AR (2001). Pre-mRNA splicing in the new millennium. *Current opinion in cell biology*. 2001. **Vol. 13**, n° 3, pp. 302–309.

HATJINA F, BIENKOWSKA M, CHARISTOS L, CHLEBO R, COSTA C, DRAŽIĆ MM, FILIPI J, GREGORC A, IVANOVA EN et KEZIĆ N (2014). A review of methods used in some European countries for assessing the quality of honey bee queens through their physical characters and the performance of their colonies. *Journal of Apicultural Research*. **Vol. 53**, n° 3, pp. 337–363.

HAUSER H et LENSKY Y (1994). The effect of the age of the honey bee (*Apis mellifera* L) queen on worker population, swarming and honey yields in a subtropical climate. *Apidologie*. **Vol. 25**, n° 6, pp. 566–578.

- HAYDAK MH (1970). Honey Bee Nutrition. *Annual Review of Entomology*. **Vol. 15**, n° 1, pp. 143-156.
- HEDRICK PW et GILPIN ME (1997). Genetic effective size of a metapopulation. *Metapopulation biology*. pp. 165–181.
- HEIMPEL GE et DE BOER JG (2008). Sex determination in the Hymenoptera. *Annu. Rev. Entomol.* **Vol. 53**, pp. 209–230.
- HEIN L (2009). The economic value of the pollination service, a review across scales. *Open Ecology Journal*. **Vol. 2**, pp. 74–82.
- HEINZEN EL, MELLO-PEIXOTO ECT, JARDIM JG, GARCIA RC, OLIVEIRA NTE et ORSI RO (2012). Extract of propolis in the control of helminthiasis in calves. *Acta Vet. Brasil.* **Vol. 6**, n° 1, pp. 40–44.
- HENDRICKX F, MAELFAIT J-P, VAN WINGERDEN W, SCHWEIGER O, SPEELMANS M, AVIRON S, AUGENSTEIN I, BILLETTER R, BAILEY D et BUKACEK R (2007). How landscape structure, land-use intensity and habitat diversity affect components of total arthropod diversity in agricultural landscapes. *Journal of Applied Ecology*. **Vol. 44**, n° 2, pp. 340–351.
- HENDRIKX P, SAUSSAC M, MEZIANI F, WENDLING S, FRANCO S et CHAUZAT MP (2015). Résabeilles : résultats de deux campagnes de surveillance programmée de la mortalité des abeilles en France. *Bull. Epid. Santé Anim. Alim.* **Vol. 70**, pp. 19–23.
- HENRY M, BEGUIN M, REQUIER F, ROLLIN O, ODOUX JF, AUPINEL P, APTEL J, TCHAMITCHIAN S et DECOURTYE A (2012). A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. *Science*. **Vol. 336**, n° 6079, pp. 348–350.
- HEPBURN HR, BERNARD RTF, DAVIDSON BC, MULLER WJ, LLOYD P, KURSTJENS SP et VINCENT SL (1991). Synthesis and secretion of beeswax in honeybees. *Apidologie*. **Vol. 22**, n° 1, pp. 21–36.
- HERON C, NEMCEK N, BONFIELD KM, DIXON D et OTTAWAY BS (1994). The chemistry of Neolithic beeswax. *Naturwissenschaften*. **Vol. 81**, n° 6, pp. 266–269.
- HEYNDRICKX M, VANDEMEULEBROECKE K, HOSTE B, JANSSEN P, KERSTERS K, DE VOS P, LOGAN NA, ALI N et BERKELEY RCW (1996). Reclassification of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *pulvifaciens* (Nakamura 1984) Ash et al. 1994, a later subjective synonym of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *larvae* (White 1906) Ash et al. 1994, as a subspecies of *P. larvae*, with emended descriptions of *P. larvae* as *P. larvae* subsp. *larvae* and *P. larvae* subsp. *pulvifaciens*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **Vol. 46**, n° 1, pp. 270–279.
- HODGES D (1954). The Progressive Packing of the Pollen Load as Revealed by Colour Patterns in 'Mixed' Loads. *Bee World*. **Vol. 35**, n° 2, pp. 31-32.
- HÖLLDOBLER B et WILSON EO (2009). *The superorganism : the beauty, elegance, and strangeness of insect societies*. WW Norton & Company.

- HOLMAN L, TRONTTI K et HELANTERÄ H (2016). Queen pheromones modulate DNA methyltransferase activity in bee and ant workers. *Biology Letters*. **Vol. 12**, n° 1, pp. 20151038.
- HOLZMANN C, VALLON J et JOURDAN P (2012). *Résultats de l'enquête COLOSS 2012*. ITSAP-Institut de l'abeille.
- HOOVER SER, KEELING CI, WINSTON ML et SLESSOR KN (2003). The effect of queen pheromones on worker honey bee ovary development. *Naturwissenschaften*. **Vol. 90**, n° 10, pp. 477-480.
- HOULE E (2004). *Les méthodes physiques en lutte intégrée*. Centre de Référence en agriculture et agroalimentaire. Québec, Canada.
- HRASSNIGG N et CRAILSHEIM K (2005). Differences in drone and worker physiology in honeybees. *Apidologie*. **Vol. 36**, n° 2, pp. 255-277.
- HUSEIN MQ et HADDAD SG (2006). A new approach to enhance reproductive performance in sheep using royal jelly in comparison with equine chorionic gonadotropin. *Animal reproduction science*. **Vol. 93**, n° 1, pp. 24–33.
- HYINK O, LAAS F et DEARDEN PK (2013). Genetic tests for alleles of complementary-sex-determiner to support honeybee breeding programmes. *Apidologie*. **Vol. 44**, n° 3, pp. 306-313.
- I'ANSON PRICE R et GRÜTER G (2015). Why, when and where did honey bee dance communication evolve ? *Frontiers in Ecology and Evolution*. **Vol. 3**, pp. 125.
- IFANTIDIS MD (1983). Ontogenesis of the mite *Varroa jacobsoni* in worker and drone honeybee brood cells. *Journal of Apicultural Research*. **Vol. 22**, n° 3, pp. 200–206.
- JAFFE R, DIETEMANN V, ALLSOPP MH, COSTA C, CREWE RM, DALL'OLIO R, DE LA RUA P, EL-NIWEIRI M, MOGBEL AA, FRIES I et KEZIC N (2010). Estimating the density of honeybee colonies across their natural range to fill the gap in pollinator decline censuses. *Conservation biology*. **Vol. 24**, n° 2, pp. 583–593.
- JEAN-PROST P (1987). Apiculture : connaitre l'abeille, conduire le rucher.
- JENNIONS MD et PETRIE M (2000). Why do females mate multiply? A review of the genetic benefits. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*. **Vol. 75**, n° 1, pp. 21–64.
- JENSEN AB, PALMER KA, BOOMSMA JJ et PEDERSEN BV (2005). Varying degrees of *Apis mellifera ligustica* introgression in protected populations of the black honeybee, *Apis mellifera mellifera*, in northwest Europe. *Molecular Ecology*. **Vol. 14**, n° 1, pp. 93–106.
- JENSEN AB, PALMER KA, CHALINE N, RAINE NE, TOFILSKI A, MARTIN SJ, PEDERSEN BV, BOOMSMA JJ et RATNIEKS FLW (2005). Quantifying honey bee mating range and isolation in semi-isolated valleys by DNA microsatellite paternity analysis. *Conservation Genetics*. **Vol. 6**, n° 4, pp. 527–537.

- JEVTIC G, ANDJELKOVIC B, LUGIC Z, RADOVIC J et DINIC B (2012). Heritability of production characteristics of regional populations of honey bees from Serbia. *Genetica*. **Vol. 44**, n° 1, pp. 47–54.
- JOHNSON RM, ELLIS MD, MULLIN CA et FRAZIER M (2010). Pesticides and honey bee toxicity–USA. *Apidologie*. **Vol. 41**, n° 3, pp. 312–331.
- KAMAKURA M, MITANI N, FUKUDA T et FUKUSHIMA M (2001). Antifatigue Effect of Fresh Royal Jelly in Mice. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*. **Vol. 47**, n° 6, pp. 394–401.
- KAMAKURA M (2011). Royalactin induces queen differentiation in honeybees. *Nature*. **Vol. 473**, n° 7348, pp. 478–483.
- KAMLER M, NESVORNA M, STARA J, ERBAN T et HUBERT J (2016). Comparison of tau-fluvalinate, acrinathrin, and amitraz effects on susceptible and resistant populations of *Varroa destructor* in a vial test. *Experimental and Applied Acarology*. **Vol. 69**, n° 1, pp. 1–9.
- KATO Y, UMEDA N, MAEDA A, MATSUMOTO D, KITAMOTO N et KIKUZAKI H (2012). Identification of a novel glycoside, leptosin, as a chemical marker of manuka honey. *Journal of agricultural and food chemistry*. **Vol. 60**, n° 13, pp. 3418–3423.
- KAUHAUSEN-KELLER D et KELLER R (1994). Morphometrical control of pure race breeding in the honeybee (*Apis mellifera* L). *Apidologie*. **Vol. 25**, pp. 133–133.
- KAY BK, WILLIAMSON MP et SUDOL M (2000). The importance of being proline : the interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains. *The FASEB journal*. **Vol. 14**, n° 2, pp. 231–241.
- KEARNS CA, INOUE DW et WASER NM (1998). Endangered mutualisms : the conservation of plant-pollinator interactions. *Annual review of ecology and systematics*. pp. 83–112.
- KEFUSS J, VANPOUCKE J, BOLT M et KEFUSS C (2009). Practical *Varroa* resistance selection for beekeepers. *Abstracts 41st Apimondia congress*. pp. 15–20.
- KEFUSS J, VANPOUCKE J, DUCOS DE LAHITTE J et RITTER W (2004). *Varroa* tolerance in France of intermissa bees from Tunisia and their naturally mated descendants : 1993-2004. *American Bee Journal*.
- KEN T, HEPBURN HR, RADLOFF SE, YUSHENG Y, YIQIU L, DANYIN Z et NEUMANN P (2005). Heat-balling wasps by honeybees. *Naturwissenschaften*. **Vol. 92**, n° 10, pp. 492–495.
- KENCE M, OSKAY D, GIRAY T et KENCE A (2013). Honey bee colonies from different races show variation in defenses against the *varroa* mite in a ‘common garden’. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. **Vol. 149**, n° 1, pp. 36–43.
- KENNEDY CM, LONSDORF E, NEEL MC, WILLIAMS NM, RICKETTS TH, WINFREE R, BOMMARCO R, BRITAIN C, BURLEY A et CARIVEAU D (2013). A global quantitative synthesis of local and landscape effects on wild bee pollinators in agroecosystems. *Ecology letters*. **Vol. 16**, n° 5, pp. 584–599.

KERR WE, DEL RIO S de L et BARRIONUEVO MD (1982). The southern limits of the distribution of the Africanized honeybee in South America. *American Bee Journal*.

KERR WE (1967). The history of the introduction of African bees to Brazil. *South African Bee Journal*. **Vol. 39**, n° 2, pp. 3–5.

KERR WE, BLUM MS, PISANI JF et STORT AC (1974). Correlation between amounts of 2-heptanone and iso-amyl acetate in honeybees and their aggressive behaviour. *Journal of Apicultural Research*. **Vol. 13**, n° 3, pp. 173–176.

KERR WE (1997). Sex determination in honey bees (Apinae and Meliponinae) and its consequences. *Brazilian Journal of Genetics*. **Vol. 20**, n° 4.

KEVAN PG, GRECO CF et BELAOUSSOFF S (1997). Log-normality of biodiversity and abundance in diagnosis and measuring of ecosystemic health : pesticide stress on pollinators on blueberry heaths. *Journal of Applied Ecology*. pp. 1122–1136.

KHOO Y-T, HALIM AS, SINGH KB et MOHAMAD N-A (2010). Wound contraction effects and antibacterial properties of Tualang honey on full-thickness burn wounds in rats in comparison to hydrofibre. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. **Vol. 10**, n° 1, pp. 1.

KIM SA et GILLESPIE JM (2010). Adoption of Russian Varroa-resistant honey bees among United States beekeepers. *농업경영 정책연구*. **Vol. 37**, n° 4, pp. 643–662.

KIRBY WF (1802). *Monographia Apum Angliae*. privately published. Ipswich.

KIRCHNER WH et ARNOLD G (2001). Intracolony kin discrimination in honeybees : do bees dance with their supersisters? *Animal behaviour*. **Vol. 61**, n° 3, pp. 597–600.

KIRCHNER WH, DRELLER C et TOWNE WF (1991). Hearing in honeybees : operant conditioning and spontaneous reactions to airborne sound. *Journal of Comparative Physiology A*. **Vol. 168**, n° 1, pp. 85–89.

KLANGMUANG P et SOTHORNVIT R (2016). Combination of beeswax and nanoclay on barriers, sorption isotherm and mechanical properties of hydroxypropyl methylcellulose-based composite films. *LWT - Food Science and Technology*. **Vol. 65**, pp. 222–227.

KLEIJN D, BAQUERO RA, CLOUGH Y, DIAZ M, ESTEBAN J, FERNÁNDEZ F, GABRIEL D, HERZOG F, HOLZSCHUH A et JÖHL R (2006). Mixed biodiversity benefits of agri-environment schemes in five European countries. *Ecology letters*. **Vol. 9**, n° 3, pp. 243–254.

KLEIJN D et RAEMAKERS I (2008). A retrospective analysis of pollen host plant use by stable and declining bumble bee species. *Ecology*. **Vol. 89**, n° 7, pp. 1811–1823.

KLEIJN D et SUTHERLAND WJ (2003). How effective are European agri-environment schemes in conserving and promoting biodiversity? *Journal of applied ecology*. **Vol. 40**, n° 6, pp. 947–969.

- KLEIJN D, WINFREE R, BARTOMEUS I, CARVALHEIRO LG, HENRY M, ISAACS R, KLEIN A-M, KREMEN C, M'GONIGLE LK et RADER R (2015). Delivery of crop pollination services is an insufficient argument for wild pollinator conservation. *Nature communications*. **Vol. 6**.
- KLEIN A-M, VAISSIERE BE, CANE JH, STEFFAN-DEWENTER I, CUNNINGHAM SA, KREMEN C et TSCHARNTKE T (2007). Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. **Vol. 274**, n° 1608, pp. 303-313.
- KOBOLDT DC, STEINBERG KM, LARSON DE, WILSON RK et MARDIS ER (2013). The next-generation sequencing revolution and its impact on genomics. *Cell*. **Vol. 155**, n° 1, pp. 27–38.
- KOCA A et KANDEMIR I (2013). Comparison of two morphometric methods for discriminating honey bee (*Apis mellifera* L.) populations in Turkey. *Turkish Journal of Zoology*. **Vol. 37**, n° 2, pp. 205–210.
- KOCH H et WEISSER P (1997). Exposure of honey bees during pesticide application under field conditions. *Apidologie*. **Vol. 28**, pp. 439–448.
- KOCH V, NISSEN I, SCHMITT BD et BEYE M (2014). Independent Evolutionary Origin of fem Paralogous Genes and Complementary Sex Determination in Hymenopteran Insects. *PLoS ONE*. **Vol. 9**, n° 4, pp. e91883.
- KOCHER SD, RICHARD FJ, TARPY DR et GROZINGER CM (2008). Genomic analysis of post-mating changes in the honey bee queen (*Apis mellifera*). *BMC Genomics*. **Vol. 9**, pp. 232.
- KOMOSINSKA-VASSEV K, OLCZYK P, KAŹMIERCZAK J, MENCNER L et OLCZYK K (2015). Bee pollen: Chemical composition and therapeutic application. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. **Vol. 2015**.
- KRAUS B et PAGE RE (1995). Effect of *Varroa jacobsoni* (Mesostigmata : Varroidae) on feral *Apis mellifera* (Hymenoptera : Apidae) in California. *Environmental Entomology*. **Vol. 24**, n° 6, pp. 1473–1480.
- KREMEN C, WILLIAMS NM et THORP RW (2002). Crop pollination from native bees at risk from agricultural intensification. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **Vol. 99**, n° 26, pp. 16812–16816.
- KRIEGER MJB, ROSS KG, CHANG CWY et KELLER L (1999). Frequency and origin of triploidy in the fire ant *Solenopsis invicta*. *Heredity*. **Vol. 82**, n° 2, pp. 142–150.
- KRITSKY G (2016). Beekeeping from Antiquity Through the Middle Ages. *Annual Review of Entomology*. **Vol. 62**, n° 1.
- KRUPKE CH, HUNT GJ, EITZER BD, ANDINO G et GIVEN K (2012). Multiple routes of pesticide exposure for honey bees living near agricultural fields. *PLoS one*. **Vol. 7**, n° 1, pp. e29268.

- KUCHARSKI R, FORET S et MALESZKA R (2015). EGFR gene methylation is not involved in Royalactin controlled phenotypic polymorphism in honey bees. *Scientific reports* [en ligne]. **Vol. 5**.
- KUCHARSKI R, MALESZKA J, FORET S et MALESZKA R (2008). Nutritional control of reproductive status in honeybees via DNA methylation. *Science*. **Vol. 319**, n° 5871, pp. 1827–1830.
- KUENY G (1950). Scènes apicoles dans l'ancienne Egypte. *Journal of Near Eastern Studies*. **Vol. 9**, n° 2, pp. 84–93.
- KUMAR S, STECHER G et TAMURA K (2016). MEGA7 : Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular biology and evolution*.
- KUPCZYŃSKI R, ADAMSKI M, FALTA D et ROMAN A (2012). The efficiency of propolis in post-colostral dairy calves. *Arch Tierzucht*. **Vol. 55**, pp. 315–324.
- KUPCZYNSKI R, PIASECKI T, BEDNARSKI M, SPITALNIAK K et BUDNY-WALCZAK A (2016). Application of herbs and propolis in rabbits with chronic diarrhea. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*. **Vol. 40**, n° 3, pp. 344–351.
- KUŚ PM, CONGIU F, TEPER D, SROKA Z, JERKOVIĆ I et TUBEROSO CIG (2014). Antioxidant activity, color characteristics, total phenol content and general HPLC fingerprints of six Polish unifloral honey types. *LWT-Food Science and Technology*. **Vol. 55**, n° 1, pp. 124–130.
- KWAKMAN PHS, VAN DEN AKKER JPC, GÜÇLÜ A, ASLAMI H, BINNEKADE JM, DE BOER L, BOSZHARD L, PAULUS F, MIDDELHOEK P et TE VELDE AA (2008). Medical-grade honey kills antibiotic-resistant bacteria in vitro and eradicates skin colonization. *Clinical Infectious Diseases*. **Vol. 46**, n° 11, pp. 1677–1682.
- LACHER V (1964). Elektrophysiologische untersuchungen an einzelnen rezeptoren für geruch, kohlendioxid, luftfeuchtigkeit und temperatur auf den antennen der arbeitsbiene und der drohne (*Apis mellifica* L.). *Zeitschrift für vergleichende Physiologie*. **Vol. 48**, n° 6, pp. 587–623.
- LACUBE J et CLÉMENT H (2015). Etude statistique 2014 du cours du miel au détail. *Abeilles et Fleurs*. N° 771.
- LAIDLAW HH (1987). Instrumental insemination of honeybee queens : its origin and development. *Bee World*. **Vol. 68**, n° 1, pp. 17–36.
- LAIDLAW HH, PAGE RE et HARRY H (1997). *Queen rearing and bee breeding*.
- LANGENBERGER MW et DAVIS AR (2002). Temporal changes in floral nectar production, reabsorption, and composition associated with dichogamy in annual caraway (*Carum carvi*; Apiaceae). *American Journal of Botany*. **Vol. 89**, n° 10, pp. 1588–1598.
- LAPIDGE KL, OLDROYD BP et SPIVAK M (2002). Seven suggestive quantitative trait loci influence hygienic behavior of honey bees. *Naturwissenschaften*. **Vol. 89**, n° 12, pp. 565–568.

- LAROCA S, MICHENER CD et HOFMEISTER RM (1989). Long mouthparts among « short-tongued » bees and the fine structure of the labium in *Niltonia* (Hymenoptera, Colletidae). *Journal of the Kansas Entomological Society*. pp. 400–410.
- LARSEN TH, WILLIAMS NM et KREMEN C (2005). Extinction order and altered community structure rapidly disrupt ecosystem functioning. *Ecology letters*. **Vol. 8**, n° 5, pp. 538–547.
- LATREILLE P-A (1802). *Histoire naturelle générale et particulière des Crustacées et des Insectes*. Dufart. Paris.
- LAVIE P (1967). Influence de l'utilisation du piège à pollen sur le rendement en miel des colonies d'abeilles. *Ann Abeille*. **Vol. 10**, pp. 83–95.
- LAZARIDOU A, BILIADERIS CG, BACANDRITSOS N et SABATINI AG (2004). Composition, thermal and rheological behaviour of selected Greek honeys. *Journal of Food Engineering*. **Vol. 64**, n° 1, pp. 9–21.
- LE CONTE Y, HUANG ZY, ROUX M, ZENG ZJ, CHRISTIDÈS J-P et BAGNÈRES A-G (2015). *Varroa destructor* changes its cuticular hydrocarbons to mimic new hosts. *Biology letters*. **Vol. 11**, n° 6, pp. 20150233.
- LE CONTE Y et NAVAJAS M (2008). Climate change: impact on honey bee populations and diseases. *Revue Scientifique et Technique-Office International des Epizooties*. **Vol. 27**, n° 2, pp. 499–510.
- LE CONTE Y, BÉCARD J-M, COSTAGLIOLA G, DE VAUBLANC G, EL MAÂTAOUI M, CRAUSER D, PLETTNER E et SLESSOR KN (2006). Larval salivary glands are a source of primer and releaser pheromone in honey bee (*Apis mellifera* L.). *Naturwissenschaften*. **Vol. 93**, n° 5, pp. 237–241.
- LE CONTE Y, DE VAUBLANC G, CRAUSER D, JEANNE F, ROUSSELLE J-C et BÉCARD J-M (2007). Honey bee colonies that have survived *Varroa destructor*. *Apidologie*. **Vol. 38**, n° 6, pp. 566–572.
- LE CONTE Y et ELLIS MD (2008). Mortalités et dépopulations des colonies d'abeilles domestiques : le cas américain.
- LE CONTE Y, ELLIS M et RITTER W (2010). *Varroa* mites and honey bee health : can *Varroa* explain part of the colony losses ? *Apidologie*. **Vol. 41**, n° 3, pp. 353–363.
- LECHNER S, FERRETTI L, SCHONING C, KINUTHIA W, WILLEMSSEN D et HASSELMANN M (2014). Nucleotide Variability at Its Limit? Insights into the Number and Evolutionary Dynamics of the Sex-Determining Specificities of the Honey Bee *Apis mellifera*. *Molecular Biology and Evolution*. **Vol. 31**, n° 2, pp. 272–287.
- LECOCQ A, JENSEN AB, KRYGER P et NIEH JC (2016). Parasite infection accelerates age polyethism in young honey bees. *Scientific reports*. **Vol. 6**.
- LEFÉBURE E (1908). *Sphinx, livre XI*.



- LEIMAR O, HARTFELDER K, LAUBICHLER MD et PAGE RE (2012). Development and evolution of caste dimorphism in honeybees—a modeling approach. *Ecology and evolution*. **Vol. 2**, n° 12, pp. 3098–3109.
- LENSKY Y et SLABEZKI Y (1981). The inhibiting effect of the queen bee (*Apis mellifera* L.) foot-print pheromone on the construction of swarming queen cups. *Journal of Insect Physiology*. **Vol. 27**, n° 5, pp. 313–323.
- LENSKY Y et HOCHBERG R (1973). The effect of bee colony management on the incidence of swarming and honey yields. *Hassadeh*. **Vol. 54**, pp. 285–289.
- LHERMINER P et SOLIGNAC M (2000). L'espèce : définitions d'auteurs. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series III - Sciences de la Vie*. **Vol. 323**, n° 2, pp. 153-165.
- LIEBERT AE, JOHNSON RN, SWITZ GT et STARKS PT (2004). Triploid females and diploid males : underreported phenomena in *Polistes* wasps ? *Insectes Sociaux*. **Vol. 51**, n° 3, pp. 205–211.
- LIN H, OTIS GW et SCOTT-DUPREE C (1996). Comparative resistance in Buckfast and Canadian stocks of honey bees (*Apis mellifera* L.) to infestation by honey bee tracheal mites (*Acarapis woodi* (Rennie)). *Experimental & applied acarology*. **Vol. 20**, n° 2, pp. 87–101.
- LINDAUER M (1952). Ein beitrage zur frage der arbeitsteilung im bienenstaat. *Zeitschrift für vergleichende Physiologie*. **Vol. 34**, n° 4, pp. 299–345.
- LINDAUER M (1971). Communication among social bees.
- LINDSTRÖM A (2008). Distribution of *Paenibacillus* larvae spores among adult honey bees (*Apis mellifera*) and the relationship with clinical symptoms of American foulbrood. *Microbial ecology*. **Vol. 56**, n° 2, pp. 253–259.
- LINNÉ C (1758). *Systema naturae per regna tria naturae, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis*.
- LINSKENS HF et JORDE W (1997). Pollen as food and medicine-a review. *Economic Botany*. **Vol. 51**, n° 1, pp. 78–86.
- LIU Z-Y, WANG Z-L, WU X-B, YAN W-Y et ZENG Z-J (2011). *csd* alleles in the red dwarf honey bee (*Apis florea*, Hymenoptera: Apidae) show exceptionally high nucleotide diversity: High nucleotide diversity in *Apis florea csd* gene. *Insect Science*. **Vol. 18**, n° 6, pp. 645-651.
- LO N, GLOAG RS, ANDERSON DL et OLDROYD BP (2010). A molecular phylogeny of the genus *Apis* suggests that the Giant Honey Bee of the Philippines, *A. breviligula* Maa, and the Plains Honey Bee of southern India, *A. indica* Fabricius, are valid species. *Systematic Entomology*. **Vol. 35**, n° 2, pp. 226–233.
- LODESANI M, PELLACANI A, BERGOMI S, CARPANA E, RABITTI T et LASAGNI P (1992). Residue determination for some products used against *Varroa* infestation in bees. *Apidologie*. **Vol. 23**, n° 3, pp. 257–272.
- LOFTUS JC, SMITH ML et SEELEY TD (2016). How Honey Bee Colonies Survive in the Wild : Testing the Importance of Small Nests and Frequent Swarming. *PLOS ONE*. **Vol. 11**, n° 3, pp. e0150362.

- LONG JC et CACERES JF (2009). The SR protein family of splicing factors : master regulators of gene expression. *Biochemical Journal*. **Vol. 417**, n° 1, pp. 15–27.
- LÓPEZ S, GONZÁLEZ M et GOLDARAZENA A (2011). *Vespa velutina lepeletier*, 1836 (Hymenoptera : Vespidae) : first records in Iberian Peninsula. *EPPO Bulletin*. **Vol. 41**, n° 3, pp. 439–441.
- LOSEY JE et VAUGHAN M (2006). The economic value of ecological services provided by insects. *Bioscience*. **Vol. 56**, n° 4, pp. 311–323.
- LOTFY M (2006). Biological activity of bee propolis in health and disease. *Asian Pac J Cancer Prev*. **Vol. 7**, n° 1, pp. 22–31.
- LOUVEAUX J, ALBISETTI M, DELANGUE M et THEURKAUFF M (1966). Les modalités de l'adaptation des abeilles (*Apis mellifica* L.) au milieu naturel. *Ann. Abeille*. **Vol. 9**, n° 4, pp. 323–350.
- LUCAS A et HARRIS J (2012). *Ancient Egyptian Materials and Industries*. Courier Corporation. ISBN 978-0-486-14494-8.
- LUPAS A, VAN DYKE M et STOCK (1991). Predicting coiled coils from protein sequences. *Science*. **Vol. 252**, n° 5009, pp. 1162–1164.
- LYKO F, FORET S, KUCHARSKI R, WOLF S, FALCKENHAYN C et MALESZKA R (2010). The honey bee epigenomes : differential methylation of brain DNA in queens and workers. *PLoS Biol*. **Vol. 8**, n° 11, pp. e1000506.
- MA R, MUELLER UG et RANGEL J (2016). Assessing the role of  $\beta$ -ocimene in regulating foraging behavior of the honey bee, *Apis mellifera*. *Apidologie*. **Vol. 47**, n° 1, pp. 135–144.
- MACKENSEN O (1951). Viability and sex determination in the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Genetics*. **Vol. 36**, n° 5, pp. 500.
- MAGNUS RM, TRIPODI AD et SZALANSKI AL (2014). Mitochondrial DNA diversity of honey bees (*Apis mellifera*) from unmanaged colonies and swarms in the United States. *Biochemical genetics*. **Vol. 52**, n° 5-6, pp. 245–257.
- MAIENFISCH P, ANGST M, BRANDL F, FISCHER W, HOFER D, KAYSER H, KOBEL W, RINDLISBACHER A, SENN R et STEINEMANN A (2001). Chemistry and biology of thiamethoxam: a second generation neonicotinoid. *Pest management science*. **Vol. 57**, n° 10, pp. 906–913.
- MAISONNASSE A, LENOIR J-C, BESLAY D, CRAUSER D et LE CONTE Y (2010). E- $\beta$ -ocimene, a volatile brood pheromone involved in social regulation in the honey bee colony (*Apis mellifera*). *PLoS One*. **Vol. 5**, n° 10, pp. e13531.
- MALESZKA R (2008). Epigenetic integration of environmental and genomic signals in honey bees : the critical interplay of nutritional, brain and reproductive networks. *Epigenetics*. **Vol. 3**, n° 4, pp. 188–192.
- MARCEAU J, BOILY R et PERRON JMM (1989). Relation entre l'activité des colonies d'abeilles et leur productivité.

- MARTIN C, PROVOST E, BAGNÈRES A-G, ROUX M, CLÉMENT J-L et LE CONTE Y (2002). Potential mechanism for detection by *Apis mellifera* of the parasitic mite *Varroa destructor* inside sealed brood cells. *Physiological Entomology*. **Vol. 27**, n° 3, pp. 175–188.
- MARTIN H et LINDAUER M (1973). Der Einfluß des Erdmagnetfeldes auf die Schwereorientierung der Honigbiene (*Apis mellifica*). *Journal of comparative physiology*. **Vol. 122**, n° 2, pp. 145-187.
- MASCHWITZ U (1964). Gefahrenalarmstoffe und Gefahrenalarmierung bei sozialen Hymenopteren. *Zeitschrift für vergleichende Physiologie*. **Vol. 47**, n° 6, pp. 596–655.
- MATHEWS KA et BINNING AG (2002). Wound management using honey. *Compend. Con. Edu.* **Vol. 24**, n° 1, pp. 53–59.
- MATTILA HR, HARRIS JL et OTIS GW (2001). Timing of production of winter bees in honey bee (*Apis mellifera*) colonies. *Insectes Sociaux*. **Vol. 48**, n° 2, pp. 88–93.
- MATTILA HR et SEELEY TD (2007). Genetic diversity in honey bee colonies enhances productivity and fitness. *Science*. **Vol. 317**, n° 5836, pp. 362–364.
- MAURIZIO A (1953). *Weitere Untersuchungen an Pollenhöschen : Beitrag zur Erfassung der Pollentrachtverhältnisse in verschiedenen Gegenden der Schweiz*. HR Sauerländer.
- MAYER DF, BRITT RL et LUNDEN JD (1989). Evaluation of BeeScent as a honey bee attractant. *American bee journal (USA)*.
- MCCALL C et PRIMACK RB (1992). Influence of Flower Characteristics, Weather, Time of Day, and Season on Insect Visitation Rates in Three Plant Communities. *American Journal of Botany*. **Vol. 79**, n° 4, pp. 434-442.
- MCINDOO NE (1914). The scent-producing organ of the honey bee. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia*. pp. 542–555.
- MCKEE BA, GOODMAN DR et HORNITZKY AM (2004). The transmission of European foulbrood (*Melissococcus plutonius*) to artificially reared honey bee larvae (*Apis mellifera*). *Journal of apicultural research*. **Vol. 43**, n° 3, pp. 93–100.
- MCKEE B, DJORDJEVIC S, GOODMAN R et HORNITZKY M (2003). The detection of *Melissococcus pluton* in honey bees (*Apis mellifera*) and their products using a hemi-nested PCR. *Apidologie*. **Vol. 34**, n° 1, pp. 19–27.
- MCMULLAN JB et BROWN MJF (2009). A qualitative model of mortality in honey bee (*Apis mellifera*) colonies infested with tracheal mites (*Acarapis woodi*). *Experimental and Applied Acarology*. **Vol. 47**, n° 3, pp. 225–234.
- MEIXNER MD, SHEPPARD WS et POKLUKAR J (1993). Asymmetrical distribution of a mitochondrial DNA polymorphism between 2 introgressing honey bee subspecies. *Apidologie*. **Vol. 24**, pp. 147–147.
- MEIXNER MD, LETA MA, KOENIGER N et FUCHS S (2011). The honey bees of Ethiopia represent a new subspecies of *Apis mellifera*—*Apis mellifera simensis* n. ssp. *Apidologie*. **Vol. 42**, n° 3, pp. 425–437.

- MELO GAR et GONÇALVES RB (2005). Higher-level bee classifications (Hymenoptera, Apoidea, Apidae sensu lato). *Revista Brasileira de Zoologia*. **Vol. 22**, n° 1, pp. 153–159.
- MELO GAR (1999). Phylogenetic relationships and classification of the major lineages of Apoidea (Hymenoptera), with emphasis on crabronid wasps. *Natural History Museum, The University of Kansas*. N° 14, pp. 1-55.
- MENZEL R et SNYDER AW (1974). Polarised light detection in the bee, *Apis mellifera*. *Journal of comparative physiology*. **Vol. 88**, n° 3, pp. 247–270.
- MERZ R, GERIG L, WILLE H et LEUTHOLD R (1979). Problem der Kurz- und Langlebigkeit bei der Ein- und Auswinterung im Bienenvolk (*Apis mellifica* L.): eine Verhaltensstudie. *Revue suisse de zoologie*.
- MEUSEL MS et MORITZ RFA (1993). Transfer of paternal mitochondrial DNA during fertilization of honeybee (*Apis mellifera* L.) eggs. *Current genetics*. **Vol. 24**, n° 6, pp. 539–543.
- MICHENER CD (2000). *The bees of the world*. The Johns Hopkins University Press. Baltimore.
- MICHENER CD (2007). *The bees of the world*. 2. ed. Baltimore : Johns Hopkins Univ. Press. ISBN 978-0-8018-8573-0.
- MICHENER CD et GREENBERG L (1980). Ctenoplectridae and the origin of long-tongued bees. *Zoological Journal of the Linnean Society*. N° 69, pp. 183-203.
- MICHENER CD et GRIMALDI DA (1988a). A *Trigona* from Late Cretaceous Amber of New Jersey (Hymenoptera: Apidae: Meliponinae). *American Museum Novitates*. N° 2917, pp. 1-10.
- MICHENER CD et GRIMALDI DA (1988b). The oldest fossil bee : Apoid history, evolutionary stasis, and antiquity of social behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **Vol. 85**, n° 17, pp. 6424–6426.
- MICHENER CD et POINAR JR G (1996). The known bee fauna of the Dominican amber. *Journal of the Kansas Entomological Society*. pp. 353–361.
- MICHENER CD (1979). Biogeography of the bees. *Annals of the Missouri botanical Garden*. pp. 277–347.
- MICHENER CD (1944). Comparative external morphology, phylogeny, and classification of the bees (Hymenoptera). *Bulletin of the American Museum of Natural History*. N° 82, pp. 1-326.
- MICHENER CD (1981). Classification of the bee family Melittidae with a review of species of Meganomiinae. *Contribution of the American Entomological Institute*. N° 18, pp. 1-135.
- MICHEZ D (2007). La nouvelle classification des abeilles (Hymenoptera, Apoidea, Apiformes) ou la chute de l'abeille mellifère (*Apis mellifera* L.) de son piédestal.

- MIGUEL I, BAYLAC M, IRIONDO M, MANZANO C, GARNERY L et ESTONBA A (2010). Both geometric morphometric and microsatellite data consistently support the differentiation of the *Apis mellifera* M evolutionary branch. *Apidologie*.
- MOLAN PC (1992). The antibacterial activity of honey : 1. The nature of the antibacterial activity. *Bee world*. **Vol. 73**, n° 1, pp. 5–28.
- MONCEAU K, BONNARD O et THIÉRY D (2014). *Vespa velutina* : a new invasive predator of honeybees in Europe. *Journal of pest science*. **Vol. 87**, n° 1, pp. 1–16.
- MONCEAU K, MAHER N, BONNARD O et THIÉRY D (2013). Predation pressure dynamics study of the recently introduced honeybee killer *Vespa velutina* : learning from the enemy. *Apidologie*. **Vol. 44**, n° 2, pp. 209–221.
- MONDET F, ALAUX C, SEVERAC D, ROHMER M, MERCER AR et LE CONTE Y (2015). Antennae hold a key to *Varroa*-sensitive hygiene behaviour in honey bees. *Scientific reports*. **Vol. 5**, pp. 10454.
- MOORE PA, WILSON ME et SKINNER JA (2015). Honey Bee Queens : Evaluating the Most Important Colony Member.
- MORITZ C, DOWLING TE et BROWN WM (1987). Evolution of animal mitochondrial DNA : relevance for population biology and systematics. *Annual Review of Ecology and systematics*. pp. 269–292.
- MORITZ RFA (1988). Group relatedness and kin discrimination in honey bees *Apis mellifera* L. *Animal behaviour*. **Vol. 36**, n° 5, pp. 1334–1340.
- MORITZ RFA, KRAUS FB, KRYGER P et CREWE RM (2007). The size of wild honeybee populations (*Apis mellifera*) and its implications for the conservation of honeybees. *Journal of Insect Conservation*. **Vol. 11**, n° 4, pp. 391–397.
- MORITZ RFA, SOUTHWICK EE et HARBO JR (1987). Genetic analysis of defensive behaviour of honeybee colonies (*Apis mellifera* L.) in a field test. *Apidologie*. **Vol. 18**, n° 1, pp. 27–42.
- MORITZ RFA (1991). The limitations of biometric control on pure race breeding in *Apis mellifera*. *Journal of Apicultural Research*. **Vol. 30**, n° 2, pp. 54–59.
- MORRISSEY BJ, HELGASON T, POPPINGA L, FÜNFHAUS A, GENERSCH E et BUDGE GE (2015). Biogeography of *Paenibacillus* larvae, the causative agent of American foulbrood, using a new multilocus sequence typing scheme. *Environmental microbiology*. **Vol. 17**, n° 4, pp. 1414–1424.
- MORSE RA, STRANG GE et NOWAKOWSKI J (1967). Fall Death Rates of Drone Honey Bees. *Journal of Economic Entomology*. **Vol. 60**, n° 5, pp. 1198–1202.
- MUIRHEAD CA (2001). Consequences of population structure on genes under balancing selection. *Evolution*. **Vol. 55**, n° 8, pp. 1532–1541.
- MULLIN CA, FRAZIER M, FRAZIER JL, ASHCRAFT S, SIMONDS R et PETTIS JS (2010). High levels of miticides and agrochemicals in North American apiaries: implications for honey bee health. *PLoS one*. **Vol. 5**, n° 3, pp. e9754.

- NAGAI T et INOUE R (2004). Preparation and the functional properties of water extract and alkaline extract of royal jelly. *Food chemistry*. **Vol. 84**, n° 2, pp. 181–186.
- NAUG D (2009). Nutritional stress due to habitat loss may explain recent honeybee colony collapses. *Biological Conservation*. **Vol. 142**, n° 10, pp. 2369–2372.
- NAUMANN K, WINSTON ML, SLESSOR KN, PRESTWICH GD et WEBSTER FX (1991). Production and transmission of honey bee queen (*Apis mellifera* L.) mandibular gland pheromone. *Behavioral Ecology and Sociobiology*. **Vol. 29**, n° 5, pp. 321–332.
- NAVAJAS M, MIGEON A, ALAUX C, MARTIN-MAGNIETTE M-L, ROBINSON GE, EVANS JD, CROS-ARTEIL S, CRAUSER D et LE CONTE Y (2008). Differential gene expression of the honey bee *Apis mellifera* associated with *Varroa destructor* infection. *BMC genomics*. **Vol. 9**, n° 1, pp. 1.
- NELSON DL et SMIRL C (1977). The effect of queen-related problems and swarming on brood and honey production of honey bee colonies in Manitoba. *Manit. Entom.* **Vol. 11**, pp. 45–49.
- NEMTSEV SV, ZUEVA OY, KHISMATULLIN MR, ALBULOV AI et VARLAMOV VP (2004). Isolation of chitin and chitosan from honeybees. *Applied Biochemistry and Microbiology*. **Vol. 40**, n° 1, pp. 39–43.
- NETTLETON B (2016). Comparing Bee Abundance and Diversity in Candidate Biomass Crops. *Research in the Capitol*.
- NEUMANN P et CARRECK NL (2010). Honey bee colony losses. *Journal of Apicultural Research*. **Vol. 49**, n° 1, pp. 1–6.
- NGUYEN BK, VAN DER ZEE R, VEJSNAES F, WILKINS S, LE CONTE Y et RITTER W (2010). COLOSS Working Group 1 : monitoring and diagnosis. *Journal of Apicultural Research*. **Vol. 49**, n° 1, pp. 97–99.
- NICOLAIDIS NJ (1955). Facts about beekeeping in Greece. *Bee World*. **Vol. 36**, n° 8, pp. 141–149.
- NICOLLET B (2014). *Développer et maintenir des ruchers en apiculture naturelle*. Héricy : Puits Fleuri. ISBN 978-2-86739-508-6.
- NICOLSON SW et NEPI M (2005). Dilute nectar in dry atmospheres : nectar secretion patterns in *Aloe castanea* (Asphodelaceae). *International Journal of Plant Sciences*. **Vol. 166**, n° 2, pp. 227–233.
- NISBET HO, NISBET C, YARIM M, GULER A et OZAK A (2010). Effects of three types of honey on cutaneous wound healing. *Wounds: a compendium of clinical research and practice*. **Vol. 22**, n° 11, pp. 275–283.
- NISSEN I, MULLER M et BEYE M (2012). The Am-tra2 Gene Is an Essential Regulator of Female Splice Regulation at Two Levels of the Sex Determination Hierarchy of the Honeybee. *Genetics*. **Vol. 192**, n° 3, pp. 1015-1026.

- OELSCHLAEGEL S, PIEPER L, STAUFENBIEL R, GRUNER M, ZEIPPERT L, PIEPER B, KOELLING-SPEER I et SPEER K (2012). Floral markers of cornflower (*Centaurea cyanus*) honey and its peroxide antibacterial activity for an alternative treatment of digital dermatitis. *Journal of agricultural and food chemistry*. **Vol. 60**, n° 47, pp. 11811–11820.
- OHASHI K, SASAKI M, SASAGAWA H, NAKAMURA J, NATORI S et KUBO T (2000). Functional Flexibility of the Honey Bee Hypopharyngeal Gland in a Dequeened Colony. *Zoological Science*. **Vol. 17**, n° 8, pp. 1089-1094.
- OHASHI K, SAWATA M, TAKEUCHI H, NATORI S et KUBO T (1996). Molecular Cloning of cDNA and Analysis of Expression of the Gene for  $\alpha$ -Glucosidase from the Hypopharyngeal Gland of the Honeybee *Apis mellifera* L. *Biochemical and biophysical research communications*. **Vol. 221**, n° 2, pp. 380–385.
- OISHI K, SAWA M, HATAKEYAMA M et KAGEYAMA Y (1993). Genetics and biology of the sawfly, *Athalia rosae* (Hymenoptera). *Genetica*. **Vol. 88**, n° 2-3, pp. 119–127.
- OLDROYD BP, CORNUET J-M, ROWE D, RINDERER TE et CROZIER RH (1995). Racial admixture of *Apis mellifera* in Tasmania, Australia : similarities and differences with natural hybrid zones in Europe. *Heredity*. **Vol. 74**, n° 3, pp. 315-325.
- OLDROYD BP (2007). What's killing American honey bees? *PLoS biology*. **Vol. 5**, n° 6.
- OLEKSA A et TOFILSKI A (2015). Wing geometric morphometrics and microsatellite analysis provide similar discrimination of honey bee subspecies. *Apidologie*. **Vol. 46**, n° 1, pp. 49-60.
- OLOFSSON TC et VÁSQUEZ A (2008). Detection and identification of a novel lactic acid bacterial flora within the honey stomach of the honeybee *Apis mellifera*. *Current microbiology*. **Vol. 57**, n° 4, pp. 356–363.
- OLSZEWSKI K (2007). Winter-hardiness of Buckfast bees under specific weather conditions of areas with alternating influences of maritime and continental climate. *J. Apic. Sci*. **Vol. 1**, pp. 27–36.
- OLSZEWSKI K (2009). Assessment of production traits in the Buckfast bee. *J. Apic. Sci*, 53 (2), 79. **Vol. 90**.
- ORSI R de O, FERNANDES A, BANKOVA V et SFORCIN JM (2012). The effects of Brazilian and Bulgarian propolis in vitro against *Salmonella Typhi* and their synergism with antibiotics acting on the ribosome. *Natural product research*. **Vol. 26**, n° 5, pp. 430–437.
- OSBORNE KE et OLDROYD BP (1999). Possible causes of reproductive dominance during emergency queen rearing by honeybees. *Animal Behaviour*. **Vol. 58**, n° 2, pp. 267–272.
- ÖSTERLUND E (1983). Brother Adam and His Buckfast Bee. *Amer. Bee J*. **Vol. 123**, n° 2, pp. 85–88.
- O'TOOLE C (1993). Diversity of native bees and agroecosystems. *Hymenoptera and biodiversity*. CAB International.

- ÖZDİL F, YILDIZ MA et HALL HG (2009). Molecular characterization of Turkish honey bee populations (*Apis mellifera*) inferred from mitochondrial DNA RFLP and sequence results. *Apidologie*. **Vol. 40**, n° 5, pp. 570–576.
- PAGE RE et ERICKSON EH (1984). Selective Rearing of Queens by Worker Honey Bees : Kin or Nestmate Recognition. *Annals of the Entomological Society of America*. **Vol. 77**, n° 5, pp. 578-580.
- PAGE RE et PENG CYS (2001). Aging and development in social insects with emphasis on the honey bee, *Apis mellifera* L. *Experimental gerontology*. **Vol. 36**, n° 4, pp. 695–711.
- PAGE RE et METCALF RA (1982). Multiple mating, sperm utilization, and social evolution. *American Naturalist*. pp. 263–281.
- PAIN J et RUTTNER F (1963). Biologie : les extraits de glandes mandibulaires des reines d'abeilles attirent les mâles, lors du vol nuptial. *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'academie des sciences*. **Vol. 256**, n° 2, pp. 512.
- PANKIW T (2004). Cued in : honey bee pheromones as information flow and collective decision-making. *Apidologie*. **Vol. 35**, n° 2, pp. 217–226.
- PANKIW T, WINSTON ML et ROBINSON GE (1998). Queen mandibular gland pheromone influences worker honey bee (*Apis mellifera* L.) foraging ontogeny and juvenile hormone titers. *Journal of insect physiology*. **Vol. 44**, n° 7, pp. 685–692.
- PAPACHRISTOFOROU A, RORTAIS A, BOUGA M, ARNOLD G et GARNERY L (2013). Genetic characterization of the cyprian honey bee (*Apis mellifera* cypria) based on microsatellites and mitochondrial DNA polymorphisms. *Journal of Apicultural Science*. **Vol. 57**, n° 2, pp. 127–134.
- PAROLIA A, THOMAS MS, KUNDABALA M et MOHAN M (2010). Propolis and its potential uses in oral health. *International Journal of Medicine and Medical Science*. **Vol. 2**, n° 7, pp. 210–215.
- PAVEL CI, MĂRGHITAŞ LA, BOBIŞ O, DEZMIREAN DS, ŞAPCALIU A, RADOI I et MĂDAŞ MN (2011). Biological Activities of Royal Jelly - Review. *Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies*. **Vol. 44**, n° 2, pp. 108-118.
- PELLMYR O (1992). Evolution of insect pollination and angiosperm diversification. *Trends in Ecology & Evolution*. **Vol. 7**, n° 2, pp. 46–49.
- PENG Y, D'ANTUONO M et MANNING R (2012). Effects of pollen and artificial diets on the hypopharyngeal glands of newly hatched bees (*Apis mellifera* L.). *Journal of Apicultural Research*. **Vol. 51**, n° 1, pp. 53–62.
- PÉREZ Y, OYÁRZABAL A, MAS R, MOLINA V et JIMÉNEZ S (2012). Protective effect of D-002, a mixture of beeswax alcohols, against indomethacin-induced gastric ulcers and mechanism of action. *Journal of Natural Medicines*. **Vol. 67**, n° 1, pp. 182-189.
- PÉREZ-SATO J-A, CHÂLINE N, MARTIN SJ, HUGHES WOH et RATNIEKS FLW (2009). Multi-level selection for hygienic behaviour in honeybees. *Heredity*. **Vol. 102**, n° 6, pp. 609–615.



- PERRELET A (1970). The fine structure of the retina of the honey bee drone. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie*. **Vol. 108**, n° 4, pp. 530-562.
- PERRIER C, STRANGE J, LANGELLA O, SHEPPARD WS et GARNERY L (2003). Diversité génétique, introgressions mitochondriales et nucléaires dans une population d'abeilles des Landes de Gascogne. *Actes Bureau Ressources Génétiques*. **Vol. 4**, pp. 79-100.
- PERRY CJ, SØVIK E, MYERSCOUGH MR et BARRON AB (2015). Rapid behavioral maturation accelerates failure of stressed honey bee colonies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **Vol. 112**, n° 11, pp. 3427-3432.
- PERRY WL, LODGE DM et FEDER JL (2002). Importance of hybridization between indigenous and nonindigenous freshwater species : an overlooked threat to North American biodiversity. *Systematic Biology*. **Vol. 51**, n° 2, pp. 255-275.
- PETTIGREW TJ (1834). *A history of Egyptian mummies : And an account of the worship and embalming of the sacred animals by the Egyptians : With remarks on the funeral ceremonies of different nations, and observations on the mummies of the Canary Islands, of the ancient Peruvians, Burman priests, etc.* Longman, Rees, Orme, Brown, Green, and Longman.
- PICKETT JA, WILLIAMS IH, MARTIN AP et SMITH MC (1980). Nasonov pheromone of the honey bee, *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Chemical Ecology*. **Vol. 6**, n° 2, pp. 425-434.
- PIEK T (1964). Synthesis of wax in the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Journal of Insect Physiology*. **Vol. 10**, n° 4, pp. 563-572.
- PIMENTEL D, WILSON C, MCCULLUM C, HUANG R, DWEN P, FLACK J, TRAN Q, SALTMAN T et CLIFF B (1997). Economic and environmental benefits of biodiversity. *BioScience*. **Vol. 47**, n° 11, pp. 747-757.
- PINTO MA, HENRIQUES D, CHÁVEZ-GALARZA J, KRYGER P, GARNERY L, VAN DER ZEE R, DAHLE B, SOLAND-RECKEWEG G, DE LA RÚA P, DALL'OLIO R, CARRECK NL et JOHNSTON JS (2014). Genetic integrity of the Dark European honey bee (*Apis mellifera mellifera*) from protected populations : a genome-wide assessment using SNPs and mtDNA sequence data. *Journal of Apicultural Research*. **Vol. 53**, n° 2, pp. 269-278.
- PISA LW, AMARAL-ROGERS V, BELZUNCES LP, BONMATIN J-M, DOWNS CA, GOULSON D, KREUTZWEISER DP, KRUPKE C, LIESS M et MCFIELD M (2015). Effects of neonicotinoids and fipronil on non-target invertebrates. *Environmental Science and Pollution Research*. **Vol. 22**, n° 1, pp. 68-102.
- POINAR GO et DANFORTH BN (2006). A Fossil Bee from Early Cretaceous Burmese Amber. *Science*. **Vol. 314**, n° 5799, pp. 614-614.
- POKLUKAR J et KEZIC N (1994). Estimation of heritability of some characteristics of hind legs and wings of honeybee workers (*Apis mellifera carnica* Polm) using the half-sibs method. *Apidologie*. **Vol. 25**, pp. 3-3.
- POOLE HK (1970). The Wall Structure of the Honey Bee Spermatheca with Comments about Its Function. *Annals of the Entomological Society of America*. **Vol. 63**, n° 6, pp. 1625-1628.

- POPPINGA L et GENERSCH E (2015). Molecular pathogenesis of American Foulbrood : how *Paenibacillus* larvae kills honey bee larvae. *Current Opinion in Insect Science*. **Vol. 10**, pp. 29-36.
- PORTER B et MOSS RLB (1972). *Topographical bibliography of ancient Egyptian hieroglyphic texts, reliefs, and paintings*. Clarendon Press.
- POTTS SG, BIESMEIJER JC, KREMEN C, NEUMANN P, SCHWEIGER O et KUNIN WE (2010). Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends in Ecology & Evolution*. **Vol. 25**, n° 6, pp. 345-353. DOI 10.1016/j.tree.2010.01.007.
- POTTS SG, ROBERTS SPM, DEAN R, MARRIS G, BROWN MA, JONES R, NEUMANN P et SETTELE J (2010). Declines of managed honey bees and beekeepers in Europe. *Journal of Apicultural Research*. **Vol. 49**, n° 1, pp. 15–22.
- PREECE K et BEEKMAN M (2014). Honeybee waggle dance error : adaption or constraint ? Unravelling the complex dance language of honeybees. *Animal Behaviour*. **Vol. 94**, pp. 19–26.
- PRENTER J, MACNEIL C, DICK JTA et DUNN AM (2004). Roles of parasites in animal invasions. *Trends in ecology & evolution*. **Vol. 19**, n° 7, pp. 385–390.
- PUERTA PUERTA F, PADILLA-ALVAREZ F, BUSTOS RUIZ M et FLORES SERRANO JM (1992). Bees, apiculture and the new world.
- PUTRA N, PRAWIRO E et AMIN M (2016). Thermal Properties of Beeswax/CuO Nano Phase-Change Material Used for Thermal Energy Storage. *International Journal of Technology*. **Vol. 7**, n° 2, pp. 244–253.
- QUISPE R, TRAPPSCHUH M, GAHR M et GOYMANN W (2015). Towards more physiological manipulations of hormones in field studies : comparing the release dynamics of three kinds of testosterone implants, silastic tubing, time-release pellets and beeswax. *General and comparative endocrinology*. **Vol. 212**, pp. 100–105.
- RADCHENKO VG et PESENKO YA (1994). Biology of bees. *Russian Academy of Sciences, Zoological Institute, St. Petersburg*. pp. 331.
- RADER R, BARTOMEUS I, GARIBALDI LA, GARRATT MPD, HOWLETT BG, WINFREE R, CUNNINGHAM SA, MAYFIELD MM, ARTHUR AD, ANDERSSON GKS, BOMMARCO R, BRITTAIN C, CARVALHEIRO LG, CHACOFF NP, ENTLING MH, FOULLY B, FREITAS BM, GEMMILL-HERREN B, GHAZOUL J, GRIFFIN SR, GROSS CL, HERBERTSSON L, HERZOG F, HIPÓLITO J, JAGGAR S, JAUKER F, KLEIN A-M, KLEIJN D, KRISHNAN S, LEMOS CQ, LINDSTRÖM SAM, MANDELIK Y, MONTEIRO VM, NELSON W, NILSSON L, PATTEMORE DE, PEREIRA N de O, PISANTY G, POTTS SG, REEMER M, RUNDLÖF M, SHEFFIELD CS, SCHEPER J, SCHÜEPP C, SMITH HG, STANLEY DA, STOUT JC, SZENTGYÖRGYI H, TAKI H, VERGARA CH, VIANA BF et WOYCIECHOWSKI M (2016). Non-bee insects are important contributors to global crop pollination. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **Vol. 113**, n° 1, pp. 146-151.

- RADER R, HOWLETT BG, CUNNINGHAM SA, WESTCOTT DA, NEWSTROM-LLOYD LE, WALKER MK, TEULON DAJ et EDWARDS W (2009). Alternative pollinator taxa are equally efficient but not as effective as the honeybee in a mass flowering crop. *Journal of Applied Ecology*. **Vol. 46**, n° 5, pp. 1080-1087.
- RADER R, REILLY J, BARTOMEUS I et WINFREE R (2013). Native bees buffer the negative impact of climate warming on honey bee pollination of watermelon crops. *Global Change Biology*. **Vol. 19**, n° 10, pp. 3103-3110.
- RADLOFF S et HEPBURN R (2000). Population structure and morphometric variance of the *Apis mellifera* scutellata group of honeybees in Africa. *Genetics and Molecular Biology*. **Vol. 23**, n° 2, pp. 305–316.
- RANGEL J et TARPY DR (2016). In-Hive Miticides and their Effect on Queen Supersedure and Colony Growth in the Honey Bee (*Apis mellifera*). *J Environ Anal Toxicol*. **Vol. 6**, n° 377, pp. 2161–525.
- RANGEL J, STRAUSS K, SEEDORF K, HJELMEN CE et JOHNSTON JS (2015). Endopolyploidy Changes with Age-Related Polyethism in the Honey Bee, *Apis mellifera*. *PLoS one*. **Vol. 10**, n° 4, pp. e0122208.
- RANSOME HM (2004). *The sacred bee in ancient times and folklore*. Courier Corporation.
- RATNIEKS FLW et CARRECK NL (2010). Clarity on Honey Bee Collapse? *Science*. **Vol. 327**, n° 5962, pp. 152-153.
- RATNIEKS FLW et KELLER, L (1998). Queen control of egg fertilization in the honey bee. *Behavioral Ecology and Sociobiology*. **Vol. 44**, n° 1, pp. 57–61.
- RAVEN PH et AXELROD DI (1974). Angiosperm biogeography and past continental movements. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. **Vol. 61**, n° 3, pp. 539–673.
- REMBOLD H, LACKNER B et GEISTBECK I (1974). The chemical basis of honeybee, *Apis mellifera*, caste formation. Partial purification of queen bee determinator from royal jelly. *Journal of Insect Physiology*. **Vol. 20**, n° 2, pp. 307-314.
- REMBOLD H, KREMER J-P et ULRICH GM (1980). Characterization of postembryonic developmental stages of the female castes of the honey bee, *apis mellifera* l. *Apidologie*. **Vol. 11**, n° 1, pp. 29-38.
- RHODES JW, SOMERVILLE DC et HARDEN S (2004). Queen honey bee introduction and early survival ? effects of queen age at introduction. *Apidologie*. **Vol. 35**, n° 4, pp. 383-388.
- RICE P, LONGDEN I et BLEASBY A (2000). EMBOSS : the European molecular biology open software suite. *Trends in genetics*. **Vol. 16**, n° 6, pp. 276–277.
- RICHARDS AJ (2001). Does low biodiversity resulting from modern agricultural practice affect crop pollination and yield? *Annals of Botany*. **Vol. 88**, n° 2, pp. 165–172.
- RICKETTS TH, REGETZ J, STEFFAN-DEWENTER I, CUNNINGHAM SA, KREMEN C, BOGDANSKI A, GEMMILL-HERREN B, GREENLEAF SS, KLEIN AM et MAYFIELD MM (2008). Landscape effects on crop pollination services : are there general patterns? *Ecology letters*. **Vol. 11**, n° 5, pp. 499–515.

- RILEY JR, GREGGERS U, SMITH AD, REYNOLDS DR et MENZEL R (2005). The flight paths of honeybees recruited by the waggle dance. *Nature*. **Vol. 435**, n° 7039, pp. 205–207.
- RINDERER TE, BUCO SM, RUBINK WL, DALY HV, STELZER JA, RIGGIO RM et BAPTISTA FC (1993). Morphometric identification of Africanized and European honey bees using large reference populations. *Apidologie*. **Vol. 24**, n° 6, pp. 569-585.
- RINDERER TE, HARRIS JW, HUNT GJ et DE GUZMAN LI (2010). Breeding for resistance to *Varroa destructor* in North America. *Apidologie*. **Vol. 41**, n° 3, pp. 409–424.
- RINDERER TE (2013). *Bee genetics and breeding*. Academic Press.
- ROBERTS WC (1961). Heterosis in the Honey Bee as Shown by Morphological Characters in Inbred and Hybrid Bees. *Annals of the Entomological Society of America*. **Vol. 54**, n° 6, pp. 878-882.
- ROBINSON GE (1985). Effects of a juvenile hormone analogue on honey bee foraging behaviour and alarm pheromone production. *Journal of Insect Physiology*. **Vol. 31**, n° 4, pp. 277-282.
- ROETSCHI A, BERTHOUD H, KUHN R et IMDORF A (2008). Infection rate based on quantitative real-time PCR of *Melissococcus plutonius*, the causal agent of European foulbrood, in honeybee colonies before and after apiary sanitation. *Apidologie*. **Vol. 39**, n° 3, pp. 362–371.
- ROFFET-SALQUE M, REGERT M, EVERSLED RP, OUTRAM AK, CRAMP LJE, DECAVALLAS O, DUNNE J, GERBAULT P, MILETO S et MIRABAUD S (2015). Widespread exploitation of the honeybee by early Neolithic farmers. *Nature*. **Vol. 527**, n° 7577, pp. 226–230.
- ROHRSEITZ K et TAUTZ J (1999). Honey bee dance communication : waggle run direction coded in antennal contacts ? *Journal of Comparative Physiology A*. **Vol. 184**, n° 4, pp. 463–470.
- ROIG-ALSINA A, MICHENER CD et SILVEIRA FA (1993). Studies of the phylogeny and classification of long-tongued bees (Hymenoptera: Apoidea). *The Univ. of Kansas science bulletin*. **Vol. 55**, n° 4/5.
- ROME Q, MULLER F, TOURET-ALBY A, DARROUZET E, PERRARD A et VILLEMANT C (2015). Caste differentiation and seasonal changes in *Vespa velutina* (Hym.: Vespidae) colonies in its introduced range. *Journal of Applied Entomology*. **Vol. 139**, n° 10, pp. 771-782.
- ROME Q, MULLER F, THÉRY T, ANDRIVOT J, HAUBOIS S, ROSENSTIEHL E et VILLEMANT C (2011). Impact sur l'entomofaune des pièges à bière ou à jus de cirier utilisés dans la lutte contre le frelon asiatique. *Proceedings of the Journée Scientifique Apicole–11 February*. pp. 18–20.
- RORTAIS A, ARNOLD G, ALBURAKI M, LEGOUT H et GARNERY L (2010). Review of the DraICOI-COII test for the conservation of the black honeybee (*Apis mellifera mellifera*). *Conservation Genetics Resources*. **Vol. 3**, n° 2, pp. 383-391.

- RORTAIS A, ARNOLD G, HALM M-P et TOUFFET-BRIENS F (2005). Modes of honeybees exposure to systemic insecticides: estimated amounts of contaminated pollen and nectar consumed by different categories of bees. *Apidologie*. **Vol. 36**, n° 1, pp. 71–83.
- RORTAIS A, VILLEMANT C, GARGOMINY O, ROME Q, HAXAIRE J, PAPACHRISTOFOROU A et ARNOLD G (2010). A new enemy of honeybees in Europe : The Asian hornet *Vespa velutina*. *Atlas of Biodiversity Risks—from Europe to globe, from stories to maps*. Sofia & Moscow: Pensoft. pp. 11.
- ROSENKRANZ P, AUMEIER P et ZIEGELMANN B (2010). Biology and control of *Varroa destructor*. *Journal of invertebrate pathology*. **Vol. 103**, pp. S96–S119.
- ROSSANT A (2011). *Le miel : un composé complexe aux propriétés surprenantes*.
- ROSSEL S et WEHNER R (1986). Polarization vision in bees. *Nature*. **Vol. 323**, n° 6084, pp. 128-131.
- ROUBIK DW et WOLDA H (2001). Do competing honey bees matter ? Dynamics and abundance of native bees before and after honey bee invasion. *Population Ecology*. **Vol. 43**, n° 1, pp. 53–62.
- ROUBIK DW (2002). Tropical agriculture : the value of bees to the coffee harvest. *Nature*. **Vol. 417**, n° 6890, pp. 708–708.
- ROY HE, ROY DB et ROQUES A (2011). Inventory of terrestrial alien arthropod predators and parasites established in Europe. *BioControl*. **Vol. 56**, n° 4, pp. 477–504.
- ROZEN JR JG et MCGINLEY RJ (1974). Phylogeny and systematics of Melittidae based on the mature larvae. *American Museum Novitates*. N° 2545, pp. 1-31.
- RUTTNER F (1956). The mating of the honeybee. *Bee World*. **Vol. 37**, n° 1, pp. 3–15.
- RUTTNER F (1977). Ein Bienenkorb von der Nordseeküste aus prahistorischer Zeit. *Allg Dtsch Imkerztg*.
- RUTTNER F, TASSENCOURT L et LOUVEAUX J (1978). Biometrical-statistical analysis of the geographic variability of *Apis mellifera* L. *Apidologie*. **Vol. 9**, n° 4, pp. 363–381.
- RUTTNER F (1988). *Biogeography and taxonomy of honeybees*. Berlin ; Heidelberg ; New York ; London ; Paris ; Tokyo : Springer. ISBN 3-540-17781-7.
- RUTTNER F (1991). Biometrical control of breeding. *Journal of Apicultural Research*. **Vol. 30**, n° 2, pp. 113–114.
- RUTTNER F, POUR ELMI M et FUCHS S (2000). Ecoclines in the Near East along 36 degrees N latitude in *Apis mellifera* L. [*Apis mellifera* meda; morphometry]. *Apidologie (France)*.
- RUTTNER F, MILNER E et DEWS JE (2004). *The Dark European Honey Bee*. WritersPrintShop.

- SABIR A (2016). The healing actions of propolis on direct pulp capping treatment : A review. *Journal of Dentomaxillofacial Science*. **Vol. 0**, n° 0, pp. 98.
- SAGILI RR et BURGETT DM (2011). *Evaluating honey bee colonies for pollination : a guide for commercial growers and beekeepers*. Oregon State University, Extension Service ; Washington State University Extension ; University of Idaho Extension ; US Dept. of Agriculture.
- SAMET N, LAURENT C, SUSARLA SM et SAMET-RUBINSTEEN N (2007). The effect of bee propolis on recurrent aphthous stomatitis : a pilot study. *Clinical oral investigations*. **Vol. 11**, n° 2, pp. 143–147.
- SAMMATARO D, GERSON U et NEEDHAM G (2000). Parasitic mites of honey bees : life history, implications, and impact. *Annual review of entomology*. **Vol. 45**, n° 1, pp. 519–548.
- SANCHEZ-BAYO F et GOKA K (2014). Pesticide residues and bees—a risk assessment. *PLoS One*. **Vol. 9**, n° 4, pp. e94482.
- SANTOS CG et HARTFELDER K (2015). Insights into the dynamics of hind leg development in honey bee (*Apis mellifera* L.) queen and worker larvae-A morphology/differential gene expression analysis. *Genetics and molecular biology*. **Vol. 38**, n° 3, pp. 263–277.
- SASAGAWA H, SASAKI M et OKADA I (1989). Hormonal control of the division of labor in adult honeybees (*Apis mellifera* L.). I. Effect of methoprene on corpora allata and hypopharyngeal gland, and its. ALPHA.-glucosidase activity. *Applied Entomology and Zoology*. **Vol. 24**, n° 1, pp. 66–77.
- SCANDURRA G, TRIPODI G et VERZERA A (2013). Impedance spectroscopy for rapid determination of honey floral origin. *Journal of Food Engineering*. **Vol. 119**, n° 4, pp. 738–743.
- SCBOONHOVEN LM, JERMY T et VAN LOON JJA (1998). Insect-plant biology : from physiology to evolution.
- SCHÄFER MO, GENERSCH E, FÜNFHAUS A, POPPINGA L, FORMELLA N, BETTIN B et KARGER A (2014). Rapid identification of differentially virulent genotypes of *Paenibacillus* larvae, the causative organism of American foulbrood of honey bees, by whole cell MALDI-TOF mass spectrometry. *Veterinary microbiology*. **Vol. 170**, n° 3, pp. 291–297.
- SCHENK A (1860). Verzeichniss der nassauischen Hymenoptera aculeata mit Hinzufügung der übrigen dem Verfasser bekannt gewordenen deutschen Arten. *Stettiner Entomologische Zeitung*. N° 21, pp. 132-157-419.
- SCHEPER J, REEMER M, VAN KATS R, OZINGA WA, VAN DER LINDEN GTJ, SCHAMINÉE JHJ, SIEPEL H et KLEIJN D (2014). Museum specimens reveal loss of pollen host plants as key factor driving wild bee decline in The Netherlands. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **Vol. 111**, n° 49, pp. 17552–17557.
- SCHIERUP MH, VEKEMANS X et CHARLESWORTH D (2000). The effect of subdivision on variation at multi-allelic loci under balancing selection. *Genetical research*. **Vol. 76**, n° 1, pp. 51–62.

- SCHLÜNS H, MORITZ RFA, NEUMANN P, KRYGER P et KOENIGER G (2005). Multiple nuptial flights, sperm transfer and the evolution of extreme polyandry in honeybee queens. *Animal Behaviour*. **Vol. 70**, n° 1, pp. 125–131.
- SCHMID-HEMPEL P (1994). Infection and colony variability in social insects. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B : Biological Sciences*. **Vol. 346**, n° 1317, pp. 313–321.
- SCHMID-HEMPEL P (1998). *Parasites in social insects*. Princeton University Press.
- SCHNEIDER CW, TAUTZ J, GRÜNEWALD B et FUCHS S (2012). RFID tracking of sublethal effects of two neonicotinoid insecticides on the foraging behavior of *Apis mellifera*. *PloS one*. **Vol. 7**, n° 1, pp. e30023.
- SCHÖNING C, GISDER S, GEISELHARDT S, KRETSCHMANN I, BIENEFELD K, HILKER M et GENERSCH E (2012). Evidence for damage-dependent hygienic behaviour towards *Varroa destructor*-parasitised brood in the western honey bee, *Apis mellifera*. *Journal of Experimental Biology*. **Vol. 215**, n° 2, pp. 264–271.
- SCHÖNITZER K et RENNER M (1980). Morphologie der antennenputzapparate bei Apoidea. *Apidologie*. **Vol. 11**, n° 2, pp. 113–130.
- SCHÖNITZER K et RENNER M (1984). The function of the antenna cleaner of the honeybee (*Apis mellifica*). *Apidologie*. **Vol. 15**, n° 1, pp. 23–32.
- SCHRICKER B (1965). Die Orientierung der Honigbiene in der Dämmerung. *Zeitschrift für vergleichende Physiologie*. **Vol. 49**, n° 5, pp. 420–458.
- SCHRÖDER S, DRESCHER W, STEINHAGE V et KASTENHOLZ B (1995). An automated method for the identification of bee species (Hymenoptera : Apoidea). *Proc. Intern. Symp. on Conserving Europe's Bees. Int. Bee Research Ass. & Linnean Society, London*. pp. 6–7.
- SCHÜRCH R, RATNIEKS FLW, SAMUELSON EEW et COUVILLON MJ (2016). Dancing to her own beat: honey bee foragers communicate via individually calibrated waggle dances. *Journal of Experimental Biology*. **Vol. 219**, n° 9, pp. 1287-1289.
- SCOTT SCHNEIDER S, DEGRANDI-HOFFMAN G et SMITH DR (2004). The African Honey Bee : Factors Contributing to a Successful Biological Invasion. *Annual Reviews in Entomology*. **Vol. 49**, n° 1, pp. 351–376.
- SEELEY TD et FELL RD (1981). Queen substance production in honey bee (*Apis mellifera*) colonies preparing to swarm (Hymenoptera : Apidae). *Journal of the Kansas Entomological Society*. pp. 192–196.
- SEELEY TD et TARPY DR (2007). Queen promiscuity lowers disease within honeybee colonies. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*. **Vol. 274**, n° 1606, pp. 67–72.
- SEELEY TD (2007). Honey bees of the Arnot Forest : a population of feral colonies persisting with *Varroa destructor* in the northeastern United States. *Apidologie*. **Vol. 38**, n° 1, pp. 19–29.

- SEELEY TD (2010). *Honeybee democracy*. Princeton University Press.
- SEELEY TD (2014). *Honeybee Ecology : A Study of Adaptation in Social Life*. Princeton University Press. ISBN 978-1-4008-5787-6.
- SEITZ N, TRAYNOR KS, STEINHAUER N, RENNICH K, WILSON ME, ELLIS JD, ROSE R, TARPY DR, SAGILI RR, CARON DM, DELAPLANE KS, RANGEL J, LEE K, BAYLIS K, WILKES JT, SKINNER JA, PETTIS JS et VANENGELSDORP D (2016). A national survey of managed honey bee 2014–2015 annual colony losses in the USA. *Journal of Apicultural Research*. pp. 1-12.
- SFORCIN JM (2007). Propolis and the immune system : a review. *Journal of ethnopharmacology*. **Vol. 113**, n° 1, pp. 1–14.
- SHEARER DA et BOCH R (1965). 2-Heptanone in the Mandibular Gland Secretion of the Honey-bee. *Nature*. **Vol. 206**, n° 4983, pp. 530-530.
- SHEPARD PJ et HERTEL KJ (2009). The SR protein family. *Genome biology*. **Vol. 10**, n° 10, pp. 1.
- SHEPPARD WS et MEIXNER M (2003). *Apis mellifera pomonella*, a new honey bee subspecies from Central Asia. *Apidologie*. **Vol. 34**, n° 4, pp. 367-375.
- SHEPPARD WS, RINDERER TE, MAZZOLI JA, STELZER JA et SHIMANUKI H (1991). Gene flow between African-and European-derived honey bee populations in Argentina. *Nature*. **Vol. 349**, n° 6312, pp. 782–784.
- SHEPPARD WS, ARIAS MC, GRECH A et MEIXNER MD (1997). *Apis mellifera ruttneri*, a new honey bee subspecies from Malta. *Apidologie*. **Vol. 28**, n° 5, pp. 287–293.
- SHEPPARD WS (1989a). A history of the introduction of honey bee races into the United-States. 1. *American Bee Journal*. **Vol. 129**, n° 9, pp. 617–619.
- SHEPPARD WS (1989b). A history of the introduction of honey bee races into the United States. II. *American bee journal (USA)*.
- SHUEL RW et DIXON SE (1960). The early establishment of dimorphism in the female honeybee, *Apis mellifera* L. *Insectes sociaux*. **Vol. 7**, n° 3, pp. 265–282.
- SIEVERS F, WILM A, DINEEN D, GIBSON TJ, KARPLUS K, LI W, LOPEZ R, MCWILLIAM H, REMMERT M et SÖDING J (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular systems biology*. **Vol. 7**, n° 1, pp. 539.
- SIGNOROTTI L, CERVO R et D’ETTORRE P (2015). Ontogeny of Nestmate Recognition in Social Hymenoptera. *Social Recognition in Invertebrates*. Springer International Publishing. pp. 165-191. ISBN 978-3-319-17598-0.
- SILICI S et KUTLUCA S (2005). Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. *Journal of Ethnopharmacology*. **Vol. 99**, n° 1, pp. 69–73.



- SIMPSON J, RIEDEL IBM et WILDING N (1968). Invertase in the hypopharyngeal glands of the honeybee. *Journal of Apicultural Research*. **Vol. 7**, n° 1, pp. 29–36.
- SIMPSON J (1959). Variation in the incidence of swarming among colonies of *Apis mellifera* throughout the summer. *Insectes sociaux*. **Vol. 6**, n° 1, pp. 85–99.
- SLADEN FWL (1902). *A Scent-producing Organ in the Abdomen of Apis Mellifica*. Entomologist's Monthly Magazine.
- SLIFER EH et SEKHON SS (1961). Fine structure of the sense organs on the antennal flagellum of the honey bee, *Apis mellifera* linnaeus. *Journal of Morphology*. **Vol. 109**, n° 3, pp. 351–381.
- SMITH DR et BROWN WM (1988). Polymorphisms in mitochondrial DNA of European and Africanized honeybees (*Apis mellifera*). *Experientia*. **Vol. 44**, n° 3, pp. 257–260.
- SNODGRASS RE (1984). *Anatomy of the honey bee*. Cornell University Press. ISBN 978-1120724182
- SOLAND-RECKEWEG G, HECKEL G, NEUMANN P, FLURI P et EXCOFFIER L (2009). Gene flow in admixed populations and implications for the conservation of the Western honeybee, *Apis mellifera*. *Journal of Insect Conservation*. **Vol. 13**, n° 3, pp. 317–328.
- SOLIGNAC M, CORNUET J-M, VAUTRIN D, LE CONTE Y, ANDERSON D, EVANS J, CROS-ARTEIL S et NAVAJAS M (2005). The invasive Korea and Japan types of *Varroa destructor*, ectoparasitic mites of the Western honeybee (*Apis mellifera*), are two partly isolated clones. *Proceedings of the Royal Society of London B : Biological Sciences*. **Vol. 272**, n° 1561, pp. 411–419.
- SOLTIS DE, SOLTIS PS, ENDRESS PK et CHASE MW (2005). *Phylogeny and evolution of angiosperms*. Sinauer Associates Incorporated.
- SOUTHWICK EE et MORITZ RFA (1987). Social control of air ventilation in colonies of honey bees, *Apis mellifera*. *Journal of insect physiology*. **Vol. 33**, n° 9, pp. 623–626.
- SPANNHOFF A, KIM YK, RAYNAL N, GHARIBYAN V, SU M-B, ZHOU YY, LI J, CASTELLANO S, SBARDELLA G et ISSA J-P (2011). Histone deacetylase inhibitor activity in royal jelly might facilitate caste switching in bees. *EMBO reports*. **Vol. 12**, n° 3, pp. 238–243.
- SPIVAK M et LE CONTE Y (2010). Special Issue on Bee Health. *Apidologie*. **Vol. 41**, n° 3, pp. 225–226.
- SPIVAK M et REUTER GS (2001). *Varroa destructor* infestation in untreated honey bee (Hymenoptera: Apidae) colonies selected for hygienic behavior. *Journal of Economic Entomology*. **Vol. 94**, n° 2, pp. 326–331.
- SPÖTTER A, GUPTA P, MAYER M, REINSCH N et BIENEFELD K (2016). Genome-Wide Association Study of a *Varroa*-Specific Defense Behavior in Honeybees (*Apis mellifera*). *Journal of Heredity*. **Vol. 107**, n° 3, pp. 220–227.
- SRINIVASAN MB (2000). Honeybee navigation : Nature and calibration of the 'odometer' (vol 287, pg 851, 2000). *Science*. **Vol. 287**, n° 5459, pp. 1756–1756.

- STEFFAN-DEWENTER I, MÜNZENBERG U, BÜRGER C, THIES C et TSCHARNTKE T (2002). Scale-dependent effects of landscape context on three pollinator guilds. *Ecology*. **Vol. 83**, n° 5, pp. 1421–1432.
- STOUT JC et MORALES CL (2009). Ecological impacts of invasive alien species on bees. *Apidologie*. **Vol. 40**, n° 3, pp. 388–409.
- SUMNER DA et BORISS H (2006). Bee-economics and the leap in pollination fees. *Agricultural and Resource Economics Update*. **Vol. 9**, n° 3, pp. 9–11.
- SUMPTER DJT et MARTIN SJ (2004). The dynamics of virus epidemics in Varroa-infested honey bee colonies. *Journal of Animal Ecology*. **Vol. 73**, n° 1, pp. 51–63.
- SUTTON M (2014). *Apis mellifera : Honey Bee*.
- SWAMMERDAM J, BOERHAAVE H et GAUBIUS HD (1738). *Biblia naturae*. Apud Isaacum Severinum, Baldinum Vander Aa, Petrum Vander Aa.
- TARDIEU V (2009). *L'étrange silence des abeilles : Enquête sur un déclin inquiétant*. Paris : Belin. ISBN 978-2-7011-4909-7.
- TARPY DR et FLETCHER DJC (1998). Effects of relatedness on queen competition within honey bee colonies. *Animal Behaviour*. **Vol. 55**, n° 3, pp. 537-543.
- TARPY DR, HATCH S et FLETCHER DJC (2000). The influence of queen age and quality during queen replacement in honeybee colonies. *Animal Behaviour*. **Vol. 59**, n° 1, pp. 97-101.
- TARPY DR, GILLEY DC et SEELEY TD (2004). Levels of selection in a social insect : a review of conflict and cooperation during honey bee (*Apis mellifera*) queen replacement. *Behavioral Ecology and Sociobiology*. **Vol. 55**, n° 6, pp. 513-523.
- TARPY DR, KELLER JJ, CAREN JR et DELANEY DA (2011). Experimentally induced variation in the physical reproductive potential and mating success in honey bee queens. *Insectes sociaux*. **Vol. 58**, n° 4, pp. 569–574.
- TARPY DR, SIMONE-FINSTROM M et LINKSVAYER TA (2015). Honey bee colonies regulate queen reproductive traits by controlling which queens survive to adulthood. *Insectes Sociaux*. **Vol. 63**, n° 1, pp. 169-174.
- TAUTZ J (2008). *The buzz about bees : biology of a superorganism*. Springer Science & Business Media.
- TECHER MA, CLÉMENCET J, TURPIN P, VOLBERT N, REYNAUD B et DELATTE H (2015). Genetic characterization of the honeybee (*Apis mellifera*) population of Rodrigues Island, based on microsatellite and mitochondrial DNA. *Apidologie*. **Vol. 46**, n° 4, pp. 445–454.
- THOMPSON HM et BROWN MA (2001). Is contact colony treatment with antibiotics an effective control for European foulbrood? *Bee World*. **Vol. 82**, n° 3, pp. 130–138.
- THOMSON CG (1872). *Skandinaviens Hymenoptera*. Berling. Lund.
- THOMSON DM (2006). Detecting the effects of introduced species : a case study of competition between *Apis* and *Bombus*. *Oikos*. **Vol. 114**, n° 3, pp. 407–418.

- THORP RW (2000). The collection of pollen by bees. *Pollen and pollination*. Springer. pp. 211–223.
- TILLEY C et OLDROYD BP (1997). Unequal subfamily proportions among honey bee queen and worker brood. *Animal Behaviour*. **Vol. 54**, n° 6, pp. 1483–1490.
- TOFILSKI A (2008). Using geometric morphometrics and standard morphometry to discriminate three honeybee subspecies. *Apidologie*. **Vol. 39**, n° 5, pp. 558-563.
- TOMASSONE R et FRESNAYE J (1971). Étude d'une méthode biométrique et statistique permettant la discrimination et la classification de populations d'abeilles (*Apis mellifica* L.). *Apidologie*. **Vol. 2**, n° 1, pp. 49–65.
- TOMIZAWA M et CASIDA JE (2005). Neonicotinoid insecticide toxicology : mechanisms of selective action. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **Vol. 45**, pp. 247–268.
- TORLAIS J (1958). Réaumur et l'histoire des abeilles. *Revue d'histoire des sciences et de leurs applications*. pp. 51–67.
- TOULLEC K (2008). *L'abeille noire, historique et sauvegarde*. Thèse de doctorat vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, 164 p.
- TSUJIUCHI S, SIVAN-LOUKIANOVA E, EBERL DF, KITAGAWA Y et KADOWAKI T (2007). Dynamic Range Compression in the Honey Bee Auditory System toward Waggle Dance Sounds. *PLOS ONE*. **Vol. 2**, n° 2, pp. e234.
- TYLIANAKIS JM, DIDHAM RK, BASCOMPTE J et WARDLE DA (2008). Global change and species interactions in terrestrial ecosystems. *Ecology letters*. **Vol. 11**, n° 12, pp. 1351–1363.
- UNDERWOOD RM, LEWIS MJ et HARE JF (2004). Reduced worker relatedness does not affect cooperation in honey bee colonies. *Canadian journal of zoology*. **Vol. 82**, n° 9, pp. 1542–1545.
- UNTERGASSER A, CUTCUTACHE I, KORESSAAR T, YE J, FAIRCLOTH BC, REMM M et ROZEN SG (2012). Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic acids research*. **Vol. 40**, n° 15, pp. e115–e115.
- VAN ENGELSDORP D, HAYES J, UNDERWOOD RM et PETTIS J (2008). A Survey of Honey Bee Colony Losses in the U.S., Fall 2007 to Spring 2008. *PLoS ONE*. **Vol. 3**, n° 12, pp. e4071.
- VAN ENGELSDORP D et MEIXNER MD (2010). A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. *Journal of Invertebrate Pathology*. **Vol. 103**, Supplement, pp. S80-S95.
- VERHULST EC, BEUKEBOOM LW et VAN DE ZANDE L (2010). Maternal control of haplodiploid sex determination in the wasp *Nasonia*. *Science*. **Vol. 328**, n° 5978, pp. 620–623.
- VETTER RS et VISSCHER PK (1997). Plasticity of annual cycle in *Vespula pensylvanica* shown by a third year polygynous nest and overwintering of queens inside nests. *Insectes sociaux*. **Vol. 44**, n° 4, pp. 353–364.

- VILLA S, VIGHI M, FINIZIO A et SERINI GB (2000). Risk assessment for honeybees from pesticide-exposed pollen. *Ecotoxicology*. **Vol. 9**, n° 4, pp. 287–297.
- VILLEMANT C, HAXAIRE J et STREITO J-C (2006). La découverte du Frelon asiatique *Vespa velutina*, en France. *Insectes*. **Vol. 143**, n° 4, pp. 3–7.
- VISSCHER PK (1986). Kinship discrimination in queen rearing by honey bees (*Apis mellifera*). *Behavioral ecology and sociobiology*. **Vol. 18**, n° 6, pp. 453–460.
- VISSCHER PK (1989). A Quantitative Study of Worker Reproduction in Honey Bee Colonies. *Behavioral Ecology and Sociobiology*. **Vol. 25**, n° 4, pp. 247-254.
- VISSCHER PK (1993). A Theoretical Analysis of Individual Interests and Intracolony Conflict During Swarming of Honey Bee Colonies. *Journal of Theoretical Biology*. **Vol. 165**, n° 2, pp. 191-212.
- VISSCHER PM, HILL WG et WRAY NR (2008). Heritability in the genomics era—concepts and misconceptions. *Nature Reviews Genetics*. **Vol. 9**, n° 4, pp. 255–266.
- VIUDA-MARTOS M, RUIZ-NAVAJAS Y, FERNÁNDEZ-LÓPEZ J et PÉREZ-ÁLVAREZ JA (2008). Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. *Journal of food science*. **Vol. 73**, n° 9, pp. R117–R124.
- WADDINGTON KD (1982). Honey bee foraging profitability and round dance correlates. *Journal of comparative physiology*. **Vol. 148**, n° 3, pp. 297–301.
- WADDINGTON KD et HERBST LH (1987). Body size and the functional length of the proboscis of honey bees. *Florida Entomologist*. pp. 124–128.
- WADDINGTON KD et KIRCHNER WH (1992). Acoustical and Behavioral Correlates of Profitability of Food Sources in Honey Bee Round Dances. *Ethology*. **Vol. 92**, n° 1, pp. 1-6.
- WANG J, LI S, WANG Q, XIN B et WANG H (2007). Trophic effect of bee pollen on small intestine in broiler chickens. *Journal of medicinal food*. **Vol. 10**, n° 2, pp. 276–280.
- WANG Y, AZEVEDO SV, HARTFELDER K et AMDAM GV (2013). Insulin-like peptides (AmILP1 and AmILP2) differentially affect female caste development in the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Journal of Experimental Biology*. **Vol. 216**, n° 23, pp. 4347-4357.
- WANG Z, LIU Z, WU X, YAN W et ZENG Z (2012). Polymorphism analysis of *csd* gene in six *Apis mellifera* subspecies. *Molecular Biology Reports*. **Vol. 39**, n° 3, pp. 3067-3071.
- WATERHOUSE AM, PROCTER JB, MARTIN DMA, CLAMP M et BARTON GJ (2009). Jalview Version 2—a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics*. **Vol. 25**, n° 9, pp. 1189–1191.
- WAY MJ (1963). Mutualism between ants and honeydew-producing Homoptera. *Annual review of entomology*. **Vol. 8**, n° 1, pp. 307–344.
- WEINSTOCK GM et AL. (2006). Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature*. **Vol. 443**, n° 7114, pp. 931.

- WENNER AM, WELLS PH et ROHLF FJ (1967). An Analysis of the Waggle Dance and Recruitment in Honey Bees. *Physiological Zoology*. **Vol. 40**, n° 4, pp. 317-344.
- WHITE JR JW (1978). Honey. In : *Advances in Food Research*. Academic Press. pp. 287-374.
- WHITEHORN PR, O'CONNOR S, WACKERS FL et GOULSON D (2012). Neonicotinoid pesticide reduces bumble bee colony growth and queen production. *Science*. **Vol. 336**, n° 6079, pp. 351–352.
- WHITFIELD CW, BEHURA SK, BERLOCHER SH, CLARK AG, JOHNSTON JS, SHEPPARD WS, SMITH DR, SUAREZ AV, WEAVER D et TSUTSUI ND (2006). Thrice Out of Africa : Ancient and Recent Expansions of the Honey Bee, *Apis mellifera*. *Science*. **Vol. 314**, n° 5799, pp. 642-645.
- WHITING PW (1943). Multiple alleles in complementary sex determination of *Habrobracon*. *Genetics*. **Vol. 28**, n° 5, pp. 365.
- WHITLOCK MC et BARTON NH (1997). The effective size of a subdivided population. *Genetics*. **Vol. 146**, n° 1, pp. 427–441.
- WIGGLESWORTH VB (1985). Sclerotin and lipid in the waterproofing of the insect cuticle. *Tissue and Cell*. **Vol. 17**, n° 2, pp. 227-248.
- WILKINS S, BROWN MA et CUTHBERTSON AGS (2007). The incidence of honey bee pests and diseases in England and Wales. *Pest management science*. **Vol. 63**, n° 11, pp. 1062–1068.
- WILLIAMSON MP (1994). The structure and function of proline-rich regions in proteins. *Biochemical journal*. **Vol. 297**, n° Pt 2, pp. 249.
- WINFREE R, AGUILAR R, VÁZQUEZ DP, LEBUHN G et AIZEN MA (2009). A meta-analysis of bees' responses to anthropogenic disturbance. *Ecology*. **Vol. 90**, n° 8, pp. 2068–2076.
- WINFREE R, GROSS BJ et KREMEN C (2011). Valuing pollination services to agriculture. *Ecological Economics*. **Vol. 71**, pp. 80–88.
- WINSTON ML (1980). Swarming, afterswarming, and reproductive rate of unmanaged honeybee colonies (*Apis mellifera*). *Insectes Sociaux*. **Vol. 27**, n° 4, pp. 391–398.
- WINSTON ML, DROPKIN JA et TAYLOR OR (1981). Demography and life history characteristics of two honey bee races (*Apis mellifera*). *Oecologia*. **Vol. 48**, n° 3, pp. 407–41.
- WINSTON ML, TAYLOR OR et OTIS GW (1983). Some Differences between Temperate European and Tropical African and South American Honeybees. *Bee World*. **Vol. 64**, n° 1, pp. 12-21.
- WINSTON ML (1991). *The biology of the honey bee*. Harvard University Press.

- WITTHÖFT W (1967). Absolute anzahl und verteilung der zellen im him der honigbiene. *Zeitschrift für Morphologie der Tiere*. **Vol. 61**, n° 1, pp. 160–184.
- WOODROW AW (1942). Susceptibility of honeybee larvae to individual inoculations with spores of *Bacillus larvae*. *Journal of Economic Entomology*. **Vol. 35**, n° 6, pp. 892–895.
- WOODWARD D (1993). Ligurian bees. *American bee journal (USA)*.
- WOYKE J et RUTTNER F (1958). An Anatomical Study of the Mating Process in the Honeybee. *Bee World*. **Vol. 39**, n° 1, pp. 3-18.
- WOYKE J (1963a). What happens to diploid drone larvae in a honeybee colony. *Journal of Apicultural Research*. **Vol. 2**, n° 2, pp. 73–75.
- WOYKE J (1963b). Drone larvae from fertilized eggs of the honeybee. *Journal of Apicultural research*. **Vol. 2**, n° 1, pp. 19–24.
- WOYKE J (1965). Genetic proof of the origin of drones from fertilized eggs of the honeybee. *Journal of Apicultural Research*. **Vol. 4**, n° 1, pp. 7–11.
- WU J, ZHU R, YAN S et YANG Y (2015). Erection pattern and section-wise wettability of honeybee glossal hairs in nectar feeding. *Journal of Experimental Biology*. **Vol. 218**, n° 5, pp. 664-667.
- YADAVA RPS et SMITH MV (1971). Aggressive Behaviour of *Apis mellifera* L. Workers towards Introduced Queens. I. Behavioural Mechanisms Involved in the Release of Worker Aggression. *Behaviour*. **Vol. 39**, n° 2/4, pp. 212-236.
- YAMAURA K, TOMONO A, SUWA E et UENO K (2013). Topical royal jelly alleviates symptoms of pruritus in a murine model of allergic contact dermatitis. *Pharmacognosy magazine*. **Vol. 9**, n° 33, pp. 9.
- YANG EC, CHUANG YC, CHEN YL et CHANG LH (2008). Abnormal foraging behavior induced by sublethal dosage of imidacloprid in the honey bee (Hymenoptera : Apidae). *Journal of economic entomology*. **Vol. 101**, n° 6, pp. 1743–1748.
- YOKOHARI F, TOMINAGA Y et TATEDA H (1982). Antennal hygroreceptors of the honey bee, *Apis mellifera* L. *Cell and tissue research*. **Vol. 226**, n° 1, pp. 63–73.
- ZACEPINS A, KVIESIS A, AHRENDT P, RICHTER U, TEKIN S et DURGUN M (2016). Beekeeping in the future ; Smart apiary management. *2016 17th International Carpathian Control Conference (ICCC)*. pp. 808-812.
- ZACEPINS A, KVIESIS A, STALIDZANS E, LIEPNIECE M et MEITALOVIS J (2016). Remote detection of the swarming of honey bee colonies by single-point temperature monitoring. *Biosystems Engineering*. **Vol. 148**, pp. 76-80.
- ZAYED A et PACKER L (2005). Complementary sex determination substantially increases extinction proneness of haplodiploid populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **Vol. 102**, n° 30, pp. 10742–10746.
- ZAYED A (2009). Bee genetics and conservation. *Apidologie*. **Vol. 40**, n° 3, pp. 237–262.

ZHAO J, WU J et YAN S (2015). Erection mechanism of glossal hairs during honeybee feeding. *Journal of Theoretical Biology*. **Vol. 386**, pp. 62–68.

# ANNEXES

---

## ➤ ANNEXE 1

<b>Acide glutamique</b>	Glu	E	<b>Leucine</b>	Leu	L
<b>Acide aspartique</b>	Asp	D	<b>Lysine</b>	Lys	K
<b>Alanine</b>	Ala	A	<b>Méthionine</b>	Met	M
<b>Arginine</b>	Arg	R	<b>Phénylalanine</b>	Phe	F
<b>Asparagine</b>	Asn	N	<b>Proline</b>	Pro	P
<b>Cystéine</b>	Cys	C	<b>Sérine</b>	Ser	S
<b>Glutamine</b>	Gln	Q	<b>Thréonine</b>	Thr	T
<b>Glycine</b>	Gly	G	<b>Tryptophane</b>	Trp	W
<b>Histidine</b>	His	H	<b>Tyrosine</b>	Tyr	Y
<b>Isoleucine</b>	Ile	I	<b>Valine</b>	Val	V

Annexe 1 : Les 20 acides aminés et leurs symboles internationaux



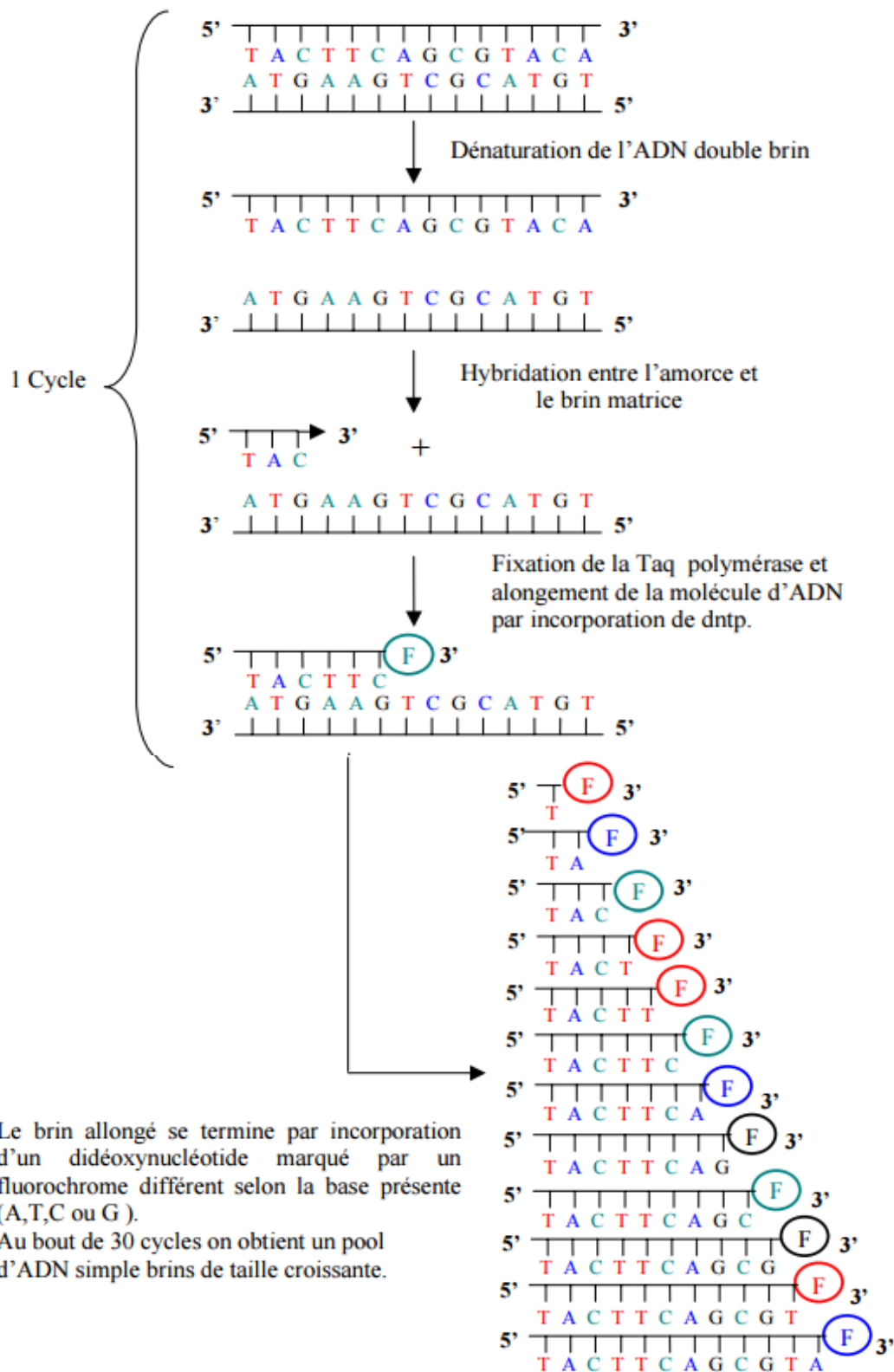
## ➤ ANNEXE 2

1 <sup>er</sup> nucléotide	2 <sup>ème</sup> nucléotide	U	C	A	G	3 <sup>ème</sup> nucléotide
U		Phénylalanine	Sérine	Tyrosine	Cystéine	U
		Phénylalanine	Sérine	Tyrosine	Cystéine	C
		Leucine	Sérine	STOP	STOP	A
		Leucine	Sérine	STOP	Tryptophane	G
C		Leucine	Proline	Histidine	Arginine	U
		Leucine	Proline	Histidine	Arginine	C
		Leucine	Proline	Glutamine	Arginine	A
		Leucine	Proline	Glutamine	Arginine	G
A		Isoleucine	Thréonine	Asparagine	Sérine	U
		Isoleucine	Thréonine	Asparagine	Sérine	C
		Isoleucine	Thréonine	Lysine	Arginine	A
		Méthionine	Thréonine	Lysine	Arginine	G
G		Valine	Alanine	Acide aspartique	Glycine	U
		Valine	Alanine	Acide aspartique	Glycine	C
		Valine	Alanine	Acide glutamique	Glycine	A
		Valine	Alanine	Acide glutamique	Glycine	G

Annexe 2 : Correspondance entre codons et acides aminés


## ➤ ANNEXE 3

### Etapes de la réaction de séquence



Annexe 3 : Représentation schématique de la réaction de Sanger (source : Institut Cochin [en ligne].  
Disponible sur : [http://www.institutcochin.fr/core\\_facilities/genome-sequencing-studies/activite-sequencage/files/principe-du-sequencage.pdf](http://www.institutcochin.fr/core_facilities/genome-sequencing-studies/activite-sequencage/files/principe-du-sequencage.pdf) (consulté le 28/06)).

## ➤ ANNEXE 4

	<b>MODE OPERATOIRE</b>	N° Ref : MOD-OP 011
	<b>PURIFICATION DE PRODUIT PCR : EXONUCLEASE I ET SHRIMP ALCALINE PHOSPHATASE AVANT SEQUENCAGE</b>	Date de création : 31/07/2015 Créateur : Katia Feye Date de modification : 25/08/2015 Modificateur : Nathalie Iannuccelli

### Domaine d'application / Objectifs

L'objectif de ce mode opératoire est de purifier les produits PCR avant la réaction de séquençage. L'exonucléase I détruit les fragments d'ADN simple brin, donc les amorces.

Et la SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase) enlève le 5'P des nucléotides libres, ce qui empêche leur utilisation lors de la réaction de séquence.

Enfin de réaliser la réaction de séquençage à partir de produit PCR.

### Consommables et réactifs nécessaires

#### [Liens hypertexte avec fichiers consommable et matériels](#)

Enzyme T-SAP tiroir 3	(100 unité/tube)	PROMEGA (M9910)	FRO049,
Enzyme Exonucléase I tiroir 3	(15 000 unité/tube)	OZYME (M0293L)	FRO049,
Kit AmpliTaq FS Big Dye Terminators diChloroRhodamine V3.1: 4337455		LifeTech	
Tampon 5x	(FRO009, étagère de la porte)		
Dye terminator v3.1	(FRO049, tiroir 3)		

### Documents rattachés

- Protocol original: <http://seqlab.giu.fi/PCRpurification.htm#ExoI%20-%20SAP%20protocol>
- MOD\_OP\_012\_Purification\_ddNTP\_Fluo
- MOD\_OP\_009\_Séquencage\_commun

### Hygiène sécurité

Blouse

Gants

## Contenu du Mode Opérateur

### 1 Purification produit Pcr :

pour 1 point Pcr :

1 à 12 µl de produit PCR (en fonction de l'intensité observée sur agarose)

+ 0.5µl de T-SAP à 1U/µl FRO049 tiroir ENZ III C3

+ 0.5µl d'Exo à 20U/µl FRO049 tiroir ENZ III E3

qsp 15 µl final

Programmes PCR : User = Seq Programme= exosap

- digestion 45 min à 37°C

- inactivation des enzymes 30 min à 80°C

Rq : Cette réaction doit être faite juste avant le séquençage, ces enzymes sont aussi capables d'abîmer votre beau produit PCR après un contact prolongé

### 2 Réaction de séquençage :

directement dans la plaque où a eu lieu la purification, ajouter :

+ 2µl de Tampon 5x

+ 1µl Dye terminator v3.1\*

+ 2 µl primer à 5µM

Soit ≈ 20µl final

\* Remarque : En fonction de la taille des produits d'amplification, on peut jouer sur le volume de Big Dye :

Si produit PCR inférieur ou égal à 800pb = 0.5µl

Si produit PCR supérieur à 800 pb = 1µl

Si produit PCR supérieur à 5000 pb = 2µl

Programmes PCR : User = Seq

Programme= seq


1 cycle : 95°C 5 min

25 cycles : 95°C 30sec

Tm°C 15sec

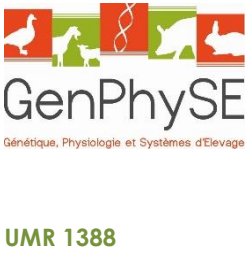
60°C 4min

Transvaser les échantillons dans la plaque commune 96 puits de la Plateforme Genomique (SERVCOM) et inscrire les échantillons dans la FR, suivant le MOD-OP 009 (Sequencage\_commun) ou faire une nouvelle purification pour éliminer l'excès de ddNTP fluos, cf MOD\_OP\_110 (Purification\_ddNTP\_Fluo), avant la migration sur séquenceur.

	<b>MODE OPERATOIRE</b>	N° Ref : MOD-OP 011
	<b>PURIFICATION DE PRODUIT PCR : EXONUCLEASE I ET SHRIMP ALCALINE PHOSPHATASE AVANT SEQUENCAGE</b>	Date de création : 31/07/2015 Créateur : Katia Feye Date de modification : 25/08/2015 Modificateur : Nathalie Iannuccelli

Annexe 4 : Purification de produit PCR : exonucléase I et Shrimp Alcaline Phosphatase avant séquençage (INRA GenPhyse)

## ➤ ANNEXE 5

 GenPhySE Génétique, Physiologie et Systèmes d'Élevage UMR 1388	<b>MODE OPERATOIRE</b>	N° Ref. : MOD-OP 010
	<b>Séquençage pour le run de service commun</b>	Date de création : 01/09/2004 Créateur : Nathalie Iannuccelli Date de modification : 25/08/2015 Modificateur : Katia Feve

### Domaine d'application / Objectifs

L'objectif de ce mode opératoire est de :

- Préparer la réaction de séquençage, à l'aide du kit Prism AmpliTaq FS Big Dye Terminators diChloroRhodamine **V3.1** (Life technologies) et qui sera ensuite traitée par la Plateforme génomique dans le cadre du service commun.
- Inscription sur la Feuille de Route (FR) de séquençage commun.
- Récupération des données

Séquenceur utilisé : ABI3730      48 capillaires      50cm      POP7

Longueur moyenne des séquences : 800pb

### Consommables et réactifs nécessaires

[Liens hypertexte avec fichiers consommable et matériels](#)

Kit Prism AmpliTaq FS Big Dye Terminators diChloroRhodamine **V3.1**:

	Tampon ABI <b>5X</b>	(Porte du Frigo PORC_FRO009)
III)	Dye Terminator MIX V3.1	(Congélateur Enzymes_FRO049_Tiroir ENZ
	H2OmQ	
	<i>Glycérol ou DMSO (optionel)</i>	

## Documents rattachés

- SEQ\_Purification\_Exo\_SAP (MOD\_OP\_106)
  - Service Commun Séquençage (PRO007)
  - Documentation technique du Fournisseur
  - Mode Opérateur de Data Tracker

## Hygiène sécurité

Gants

Blouse

### 1\_Préparation de la réaction de séquence

#### Réaction de séquence :

	Fragment PCR purifié	Plasmide	BAC ou cosmide
Matrice	10 à 90 ng	250ng (7-8kb maxi) 400-500ng (>8kb)	1µg
Amorce	5-10 pmol	5-10 pmol	20-40 pmol
Tampon 5X	2µl	2µl	-
Terminator MIX	1µl	2µl	4µl
H2O	qsp 20µl	qsp 20µl	qsp 20µl

#### Conditions particulières

*\* Pour les fragments PCR*

Les produits PCR doivent être au préalable purifiés (Cf MOD\_OP\_106).

La quantité de matrice à utilisée pour la réaction de purification (et séquençage) dépend de l'intensité du produit PCR sur gel d'agarose.

\* Remarque : En fonction de la taille des produits d'amplification, on peut jouer sur le volume de Big Dye :

Si produit PCR inférieur ou égal à 800pb = 0.5µl

Si produit PCR supérieur à 800 pb = 1µl

Si produit PCR supérieur à 5 000 pb = 2µl

\* *Additifs pour « échantillons difficiles » :*

➤ Plasmides avec sites Gateway : ajouter du glycérol qsp. 10% final (solution stock ~99.9%).

➤ ADN avec séquences répétées ou structures secondaires possibles :  
ajouter du glycérol 10% final.

Augmenter la température de dénaturation à 98°C sur l'ensemble des cycles.

### **Programmes PCR :**

1 cycle 95°C 5 min

25 cycles	30 cycles	99 cycles
96°C 30sec	96°C 30sec	96°C 30sec
Tm°C 15sec	Tm°C 15sec	60°C 15sec
60°C 4min	60°C 4min	60°C 4min

Si besoin ajuster chaque échantillon à 20µl

Transvaser les échantillons dans la plaque commune 96 puits et remplir la feuille de route.

La réaction de séquence peut se conserver ainsi à -20°C



## 2\_Inscription des échantillons sur la FR du séquençage commun

Sous « W:\ Transfert bis\ » (accessible à partir de tous les ordinateurs sur la plateforme), ouvrir la feuille de route en cours.

Compléter les colonnes, « **Sample Name** » et « **Comment** »

	A	B	C	D	E	F	G	H	I
1	Container Name	Plate ID	Description	ContainerType	AppType	Owner	Operator	PlateSealing	SchedulingPref
2	Nom plaque	Code-barre	Service commun de séquençage du 220210	96-Well	Regular	CTD	FMAR	Septa	1234
3	AppServer	AppInstance							
4	SequencingAnalysis								
5	Well	Sample Name	Comment	Results Group 1	Instrument Protocol 1	Analysis Protocol 1			
6	A01	83ML17up	GC_DM_SERVCOM_GC	RG_Sequencage	SQ_long_V3	AP_Sequencage			
7	B01	83ML17dn	GC_DM_SERVCOM_GC	RG_Sequencage	SQ_long_V3	AP_Sequencage			
8	C01	123K12up	GC_DM_SERVCOM_GC	RG_Sequencage	SQ_long_V3	AP_Sequencage			
9	D01	123K12dn	GC_DM_SERVCOM_GC	RG_Sequencage	SQ_long_V3	AP_Sequencage			
10	E01	ech	LABO_EQUIPE_PROJET_Commentaire	RG_Sequencage	SQ_long_V3	AP_Sequencage			
11	F01	ech	LABO_EQUIPE_PROJET_Commentaire	RG_Sequencage	SQ_long_V3	AP_Sequencage			
12	G01	ech	LABO_EQUIPE_PROJET_Commentaire	RG_Sequencage	SQ_long_V3	AP_Sequencage			
13	H01	ech	LABO_EQUIPE_PROJET_Commentaire	RG_Sequencage	SQ_long_V3	AP_Sequencage			

### Sample name :

Remplacer « ech » par le nom d'échantillon, maximum **20 caractères** et uniquement des lettres (majuscule ou minuscule) et des chiffres. Attention, ne pas mettre de blanc, pas d'underscore, pas de caractères spéciaux...ne pas laisser « ech », au minima mettre ech1, sinon ce dernier sera éliminé

### Comment :

Remplacer « LABO » par l'identifiant du laboratoire (ex : GPS), « EQUIPE » par l'identifiant de votre équipe (ex : GenEpi). L'identifiant du projet est SERVCOM.

Un **commentaire** peut être rajouté, il doit être au maximum de **21 caractères** et il ne doit pas contenir de blanc, d'underscore, ou de caractères spéciaux.

Le reste du fichier ne doit pas être modifié.

Enregistrer le fichier

### Remarque :

Si la feuille est complète créer une nouvelle feuille à partir de la feuille de route modèle, qui se trouve au même niveau et l'enregistrer sous :

W:\ Transfert bis\ **FR\_numéroService commun\_datejjmmaa.xls**

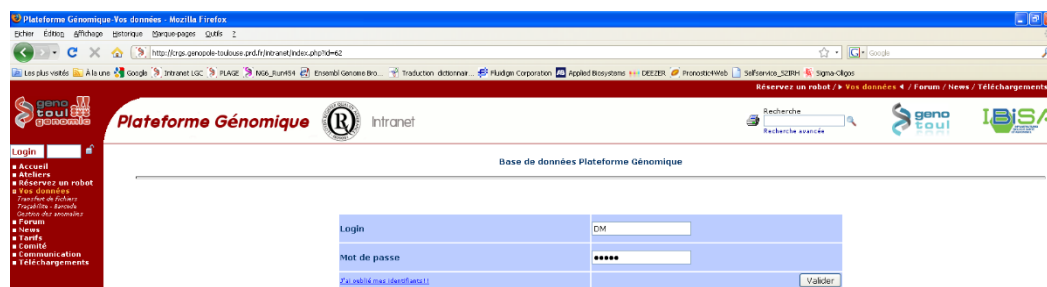
(ex : FR\_625\_220210.xls)

Le personnel plateforme ou un responsable technique du laboratoire se chargera de code-barrer la nouvelle plaque de service commun (plaque 4titude 4TI960C + tapis + code-barre, au minima service commun) et de la mettre dans le congélateur -20°C N°1\_MAT5000, tiroir 5.

### 3\_Récupération des données

La récupération des données se fait via l'interface du site intranet de la plateforme, dans la rubrique « vos données ».

<http://crgs.genopole-toulouse.prd.fr/intranet/index.php?id=62>



Saisir l'identifiant équipe ainsi que le mot de passe :

Login : Identifiants d'équipe : GenEpi, GenROC, Cytogen

mot de passe : défini par chaque équipe

SABRGEN - Etude de l'empreinte parentale dans la region d'un QTL chez le porc (n° : 149)	
Séquenceurs automatiques	Nb échantillons génotypes 898
	Nb échantillons séquences 62
Robots	TECAN 200 : 2_run(s)    ABI 7900HT : 1_run(s)    TECAN 150 : 5_run(s)    ROCHE LC480 : 23_run(s)    ABGENE SMARTSCAN : 2_run(s)
SERVCOM - Service Commun (n° : 9)	
Séquenceurs automatiques	Nb échantillons génotypes 48
	Nb échantillons séquences 6486
Robots	ABI 7900HT : 4_run(s)    MICROGRID : 2_run(s)    ABGENE SMARTSCAN : 1_run(s)    3100 : 1_run(s)

Les fichiers créés lors de la manipulation sont mis à disposition de la personne l'ayant effectuée et de l'équipe en charge du projet via le module dataAccess.

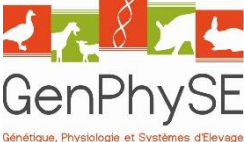
- Si vous vous connectez avec votre login d'équipe, vous accédez à toutes les données produites pour celle-ci, classées par **projet**, par **robot** et par **run**.

Cliquer sur « Nb échantillons sequences » dans le projet SERVCOM, tous les runs pour ce projet apparaissent, puis cliquer sur « télécharger » du run concerné.

N° Génopole	Robot	Nom de la plaque	Nombre de puits	Date du run	Feuille de route	détailier	telecharger
5182	3730-1	861	93	2009-07-06	5182_FR_861_SERVCOM_060709.txt		
5169	3730-1	858	96	2009-06-29	5169_FR_858_290609.txt		
4960	3730-1	836	28	2009-04-15	4960_FR_836_140409.txt		


La procédure de téléchargements permet d'obtenir un fichier au format zip.

Les séquences peuvent être soit visualisés à l'aide de chromas ou analysés avec Sequencing Analysisv3.7 (logiciel ABI) disponible sur les PC d'analyses de la Plateforme.

 <b>GenPhySE</b> Génétique, Physiologie et Systèmes d'Élevage  <b>UMR 1388</b>	<b>MODE OPERATOIRE</b>	<b>N° Ref. : MOD-OP 010</b>
	<b>Séquençage pour le run de service commun</b>	Date de création : 01/09/2004 Créateur : Nathalie Iannuccelli  Date de modification : 25/08/2015 Modificateur : Katia Feve

**Annexe 5 : Mode opératoire séquençage pour le run de service commun (INRA GenPhyse)**

## ➤ ANNEXE 6

	<b>MODE OPERATOIRE</b>	<b>N° d'identification :</b> Rédigé par : EMLA Date : 22/04/2014 Vérifié par : Date : Modifié par : EMLA Date : 21/09/15
<b>EXTRACTION D'ADN A PARTIR D'ABEILLE</b>		

### **1 Extraction :**

Prélever la partie de l'abeille qui vous intéresse (nymphe : tête et thorax, larve : entière), découper la en petits morceaux à l'aide d'un scalpel.

Insérer les morceaux dans un tube eppendorf 2mL contenant 975µL de tampon TNES-Urée et 25µL de protéinase K à 10mg/mL.

Vortexer

Mettre le tube à 56°C pendant 3h en vortexant toutes les 30min (ou sous agitation constante à 650rpm à 56°C)

Ajouter 10µL de protéinase K à 10mg/mL, vortexer.

Mettre le tube à 37°C pendant toute la nuit.

Ajouter 400µL de NaCl saturé.

Agiter doucement par inversion.

Centrifuger 30min à 12500tr/min à 4°C.

Transférer le surnageant dans un nouveau tube eppendorf 2mL.

Ajouter 5µL de RNase à 100mg/mL.

Incuber 5min à température ambiante.

Transférer le contenu du tube dans 2,5mL d'éthanol 100% (tube à hémolyse).

*Si apparition d'une « méduse d'ADN » :*

Prélever la méduse à l'aide d'une anse.

Rincer la méduse dans un tube eppendorf contenant 200µL d' ETOH 70%.

Déposer la méduse dans un tubes eppendorf contenant 200µL de TE.

Faire tourner les tubes à 37°C pendant au moins 12h.

*S'il n'y a pas apparition de l'ADN :*

Distribuer le contenu du tube dans 2 tubes eppendorf 2mL.

Centrifuger 10min à 10000g.

Eliminer le surnageant.

Reprendre chaque tube avec 100µL de TE 10/0,1.

Aspirer/refouler pour bien resuspendre l'ADN.

Faire tourner les tubes à 37°C pendant au moins 12h.

Pooler les 2 tubes.

## **2 Préparation des solutions :**

Solution d'urée 8M :

178.88g d'urée.

75ml de H<sub>2</sub>O.

Laisser dissoudre en chauffant légèrement si besoin.

Compléter à 250mL.

Solution TNES-Urée :

50mL d'urée 8M.


1mL de Tris-HCl à 1M pH8

10mL de NaCl à 3M

10mL de SDS à 10%

2mL de EDTA à 0.5M

Qsp 100mL H<sub>2</sub>O

 <p><i>Laboratoire de génétique cellulaire</i></p>	<p><b>MODE OPERATOIRE</b></p>	<p><b>N° d'identification :</b></p> <p>Rédigé par : EMLA</p> <p>Date : 22/04/2014</p> <p>Vérifié par :</p> <p>Date :</p> <p>Modifié par : EMLA</p> <p>Date : 21/09/15</p>
<p><b>EXTRACTION D'ADN A PARTIR D'ABEILLE</b></p>		

Annexe 6 : Mode opératoire « Extraction d'ADN à partir d'abeilles » (INRA GenPhyse)

## ➤ ANNEXE 7

Date de prélèvement	N° Tube	Département de provenance
03/04/2015	1	67
30/03/2015	2	67
30/03/2015	3	34
30/03/2015	5	6
31/03/2015	6	67
31/03/2015	7	67
03/04/2015	8	35
03/04/2015	9	6
30/03/2015	10	6
31/03/2015	11	6
03/04/2015	12	67
30/03/2015	13	6
03/04/2015	15	6
03/04/2015	16	6
03/04/2015	17	9
31/03/2015	18	34
30/03/2015	20	81
30/03/2015	21	2A
31/03/2015	23	81
30/03/2015	24	9
30/03/2015	25	32
30/03/2015	28	32
03/04/2015	29	32
30/03/2015	30	59
30/03/2015	31	59
11/05/2015	35	38

12/05/2015	36	38
02/04/2015	37	38
03/04/2015	38	38
03/04/2015	39	38
11/05/2015	40	38
03/04/2015	42	38
03/04/2015	43	38
31/03/2015	45	81
03/04/2015	46	6
03/04/2015	47	6
03/04/2015	48	80
03/04/2015	49	6
03/04/2015	50	80
12/05/2015	51	84
13/05/2015	52	84
02/04/2015	53	6
31/03/2015	54	6
03/04/2015	55	38
20/04/2015	60	38
20/04/2015	61	38
20/04/2015	63	34
20/04/2015	64	81
20/04/2015	65	2A
23/04/2015	103	38
23/04/2015	104	2A
23/04/2015	105	6

**Annexe 7 : Date de prélèvement et département de provenance des abeilles "ITSAP"**



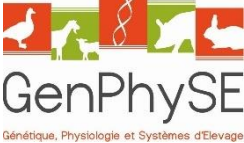
## ➤ ANNEXE 8

Provenance	Île d'Ouessant	Île de Colonsay	Italie	Slovénie	Berlin (Allemagne)	France
Race	<i>A. mellifera. mellifera</i>		<i>A. mellifera ligustica</i>	<i>A. mellifera carnica</i>		/
N	40	28	30	20	18	52
Nom	OUE 1	UK 1	ITA 1	SLO 1	BER 2	ITSAP 1
	OUE 2	UK 2	ITA 2	SLO 2	BER 4	ITSAP 2
	OUE 3	UK 3	ITA 3	SLO 3	BER 5	ITSAP 3
	OUE 4	UK 4	ITA 4	SLO 4	BER 6	ITSAP 5
	OUE 5	UK 5	ITA 5	SLO 5	BER 7	ITSAP 6
	OUE 6	UK 6	ITA 6	SLO 6	BER 8	ITSAP 7
	OUE 7	UK 7	ITA 7	SLO 7	BER 9	ITSAP 8
	OUE 8	UK 8	ITA 8	SLO 8	BER 10	ITSAP 9
	OUE 9	UK 9	ITA 9	SLO 9	BER 11	ITSAP 10
	OUE 10	UK 10	ITA 10	SLO 10	BER 12	ITSAP 11
	OUE 11	UK 11	ITA 11	SLO 11	BER 13	ITSAP 12
	OUE 12	UK 12	ITA 12	SLO 12	BER 14	ITSAP 13
	OUE 13	UK 13	ITA 13	SLO 13	BER 15	ITSAP 15
	OUE 14	UK 14	ITA 14	SLO 14	BER 16	ITSAP 16
	OUE 15	UK 15	ITA 15	SLO 15	BER 17	ITSAP 17
	OUE 16	UK 16	ITA 16	SLO 16	BER 18	ITSAP 18
	OUE 17	UK 17	ITA 17	SLO 17	BER 19	ITSAP 20
	OUE 18	UK 18	ITA 18	SLO 18	BER 21	ITSAP 21
	OUE 19	UK 19	ITA 19	SLO 19		ITSAP 23
	OUE 20	UK 20	ITA 20	SLO 20		ITSAP 24
	OUE 21	UK 21	ITA 21			ITSAP 25
	OUE 22	UK 22	ITA 22			ITSAP 28
	OUE 23	UK 23	ITA 23			ITSAP 29
	OUE 24	UK 25	ITA 24			ITSAP 30
	OUE 25	UK 26	ITA 25			ITSAP 31
	OUE 26	UK 27	ITA 26			ITSAP 35
	OUE 27	UK 28	ITA 27			ITSAP 36
	OUE 28	UK 29	ITA 28			ITSAP 37
	OUE 29		ITA 29			ITSAP 38
	OUE 30		ITA 30			ITSAP 39
	OUE 31					ITSAP 40
	OUE 32					ITSAP 42
	OUE 33					ITSAP 43
	OUE 34					ITSAP 45
	OUE 35					ITSAP 46
	OUE 36					ITSAP 47
	OUE 37					ITSAP 48
	OUE 38					ITSAP 49

	OUÉ 39			ITSAP 50
	OUÉ 40			ITSAP 51
				ITSAP 52
				ITSAP 53
				ITSAP 54
				ITSAP 55
				ITSAP 60
				ITSAP 61
				ITSAP 63
				ITSAP 64
				ITSAP 65
				ITSAP 103
				ITSAP 104
				ITSAP 105

**Annexe 8 : Caractéristiques des abeilles de l'étude principale**

## ➤ ANNEXE 9

 <b>GenPhySE</b> Génétique, Physiologie et Systèmes d'Elevage  UMR 1388	<b>MODE OPERATOIRE</b>	<b>N° Ref. : MOD-OP 012</b>
	<b>PURIFICATION DES ddNTP FLUORESCENTS</b>	Date de création : 01/09/2004 Créateur : Nathalie Iannuccelli Date de modification : 25/08/2015 Modificateur : Katia Feve

### Domaine d'application / Objectifs

L'objectif de ce mode opératoire est d'éliminer les excès de ddNTP fluorescent avant la migration sur un séquenceur automatique (ABI3730).

### Consommables et réactifs nécessaires

#### [Liens hypertexte avec fichiers consommable et matériels](#)

G50 sephadex superfine GE Healthcare	Fisher	ref= 11524875
Plaque membrane multiscreen 96 puits	Millipore	ref= MAHVN4510
Colonn loader	Millipore	
H2O mQ		
Plaque 96 puits Greiner fond V	Dutscher	ref= 651201
Plaque 96 puits 4titude 4TI0730C		ref= 044754

### Documents rattachés

- Documentation technique du Fournisseur

### Hygiène sécurité

Gants  
Blouse

## Contenu du Mode Operatoire

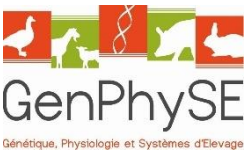
- Saupoudrer de G50 **super fine** la plaque métallique colonn loader (Millipore) et éliminer l'excès de poudre à l'aide de la raclette transparente.
- Poser à l'envers une plaque membrane multiscreen 96 puits (Millipore).
- Retourner l'ensemble.
- Tapoter légèrement pour faire tomber la poudre dans la plaque millipore.
- Ajouter 300 µl d'H<sub>2</sub>O mQ par puits. Laisser gonfler le G50 une nuit à 4°C (ou 3 heures à température ambiante).
- Mettre sous la plaque membrane une plaque Greiner « poubelle » et un intercalaire de centrifugation bleu (cadre d'alignement)
- Centrifuger pendant 3 min à 2000 tours/min (755 g) à 4°C **sans le frein** (Heraus, Megafuge 1.0 R)
- Vider la plaque poubelle
- Laver les colonnes avec 150µl d'H<sub>2</sub>O
- Centrifuger pendant 3 min à 2000 tours/min (755 g) à 4°C **sans le frein.**
- Mettre sous la plaque membrane une nouvelle plaque 96 puits Greiner « purification ».
- Déposer délicatement, au centre de chaque colonne, l'échantillon de réaction de séquence à purifier (20 µl)
- Centrifuger pendant 3 min à 2000 tours/min (755 g) à 4°C **sans le frein.**
- Transférer les 20µl de séquence purifiée dans une plaque 96 puits 4titude 4TI0730C

**Attention** : Uniquement dans les colonnes impaires si seulement 48 ech (=1Run).

- Migration sur séquenceur.

Le lancement d'un run sur séquenceur ABI3730 ne pourra se faire que par un responsable technique du laboratoire, accrédité sur ces machines.

Vider la plaque membrane multiscreen 96 puits lorsque les colonnes sont sèches (attendre 24 ou 48H)) la passer sous l'eau et la mettre à sécher. Les plaques membrane multiscreen 96 puits peuvent être réutilisé jusqu' à 5X.

 <p><b>GenPhySE</b> Génétique, Physiologie et Systèmes d'Élevage</p> <p><b>UMR 1388</b></p>	<b>MODE OPERATOIRE</b>	<b>N° Ref. : MOD-OP 012</b>
	<b>PURIFICATION DES ddNTP FLUORESCENTS</b>	<p>Date de création : 01/09/2004</p> <p>Créateur : Nathalie Iannuccelli</p> <p>Date de modification : 25/08/2015</p> <p>Modificateur : Katia Feve</p>

**Annexe 9 : Mode opératoire « Purification des ddNTP fluorescents » (INRA GenPhyse)**

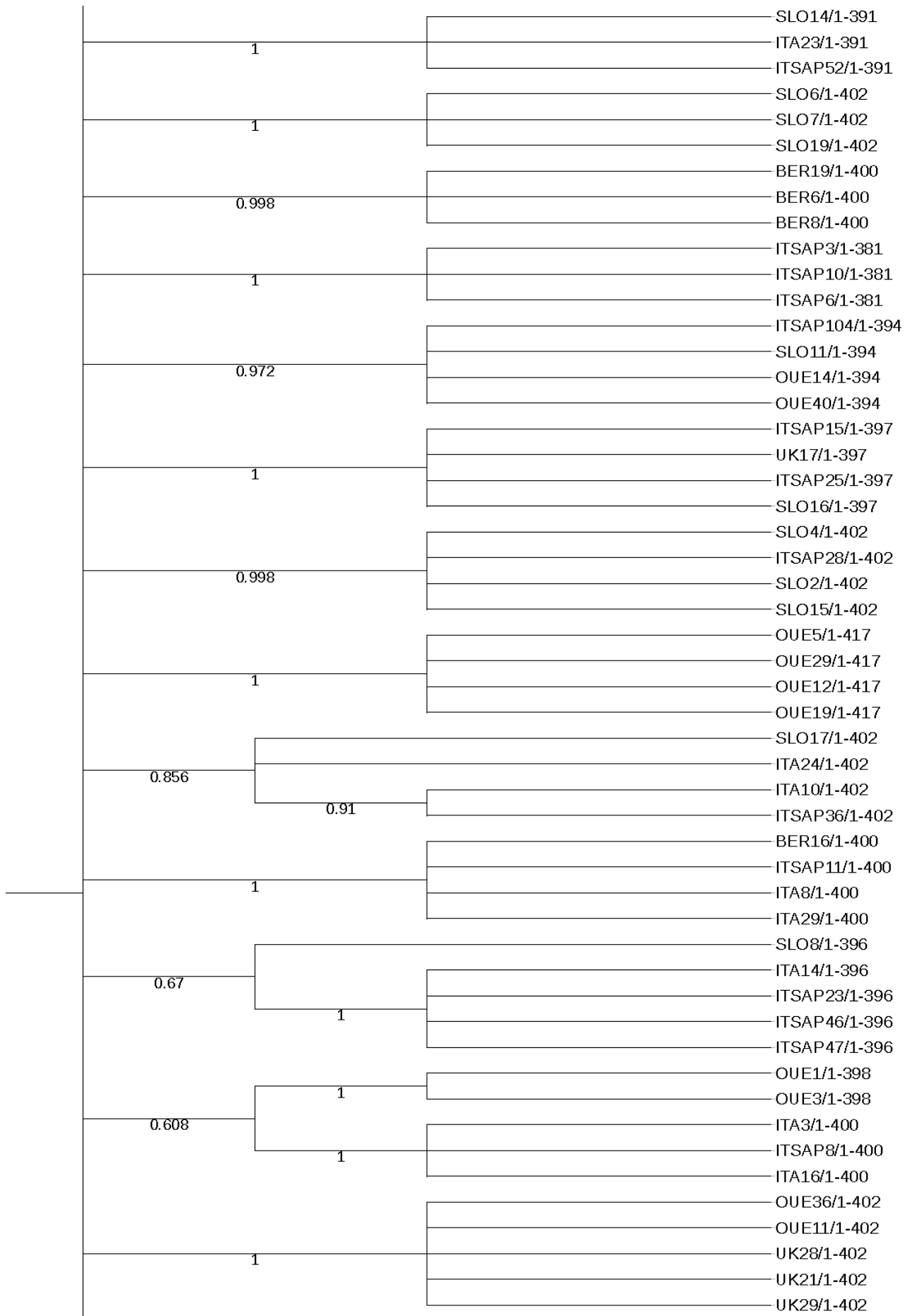
## ➤ ANNEXE 10

Provenance	Île d'Ouessant	Île de Colonsay	Italie	Slovénie	Berlin (Allemagne)	France
Race	<i>A. mellifera. mellifera</i>		<i>A. mellifera ligustica</i>	<i>A. mellifera carnica</i>		/
N	12	12	12	12	12	12
Nom	OUE 1	UK 17	ITA 13	SLO 9	BER 7	ITSAP 1
	OUE 2	UK 18	ITA 14	SLO 10	BER 8	ITSAP 2
	OUE 3	UK 19	ITA 15	SLO 11	BER 9	ITSAP 3
	OUE 4	UK 20	ITA 16	SLO 12	BER 10	ITSAP 5
	OUE 5	UK 21	ITA 17	SLO 13	BER 11	ITSAP 6
	OUE 6	UK 22	ITA 18	SLO 14	BER 12	ITSAP 7
	OUE 7	UK 23	ITA 19	SLO 15	BER 13	ITSAP 8
	OUE 8	UK 25	ITA 20	SLO 16	BER 14	ITSAP 9
	OUE 9	UK 26	ITA 21	SLO 17	BER 15	ITSAP 10
	OUE 10	UK 27	ITA 22	SLO 18	BER 16	ITSAP 11
	OUE 11	UK 28	ITA 23	SLO 19	BER 17	ITSAP 12
	OUE 12	UK 29	ITA 24	SLO 20	BER 18	ITSAP 13

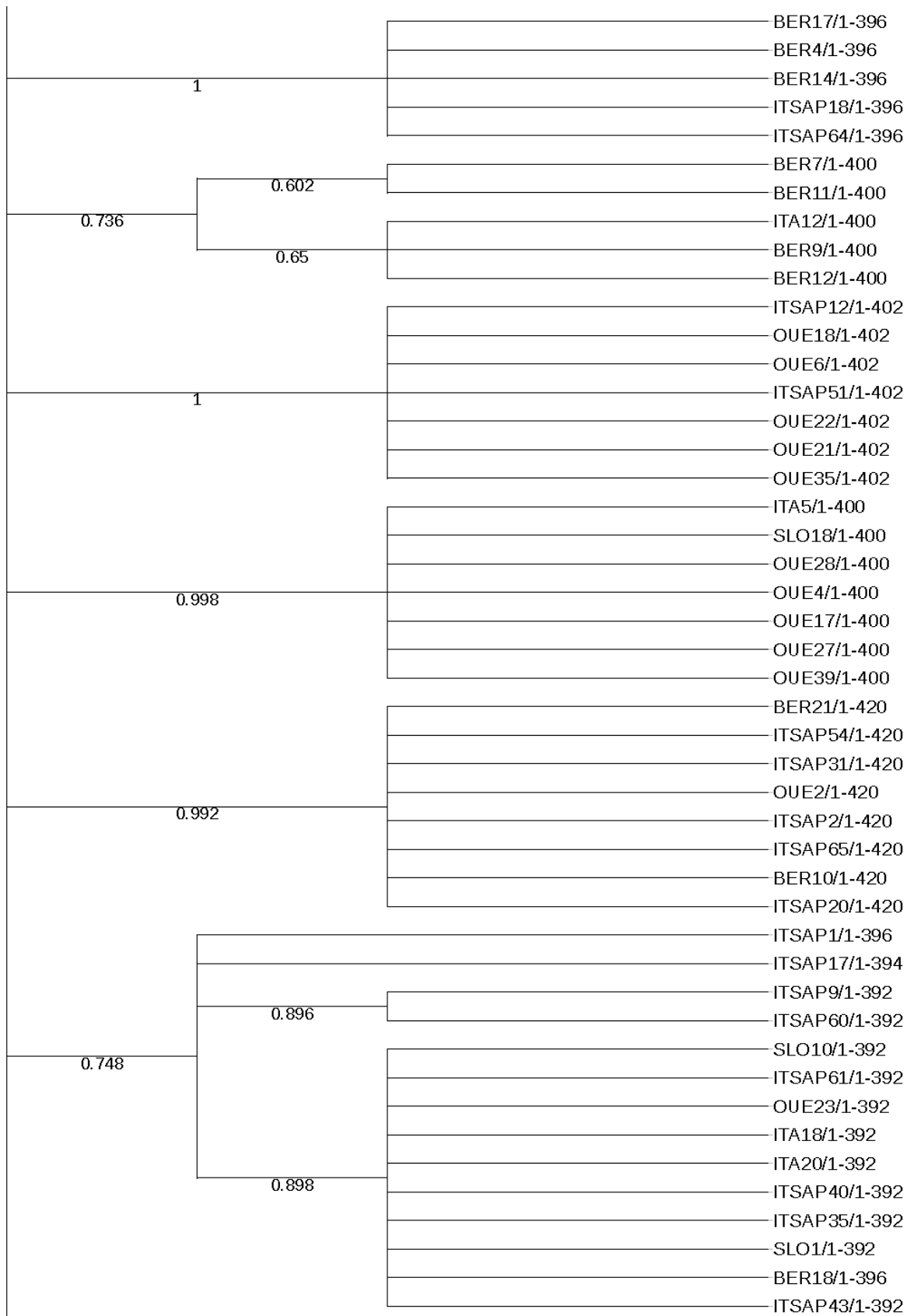
Annexe 10 : Caractéristiques des abeilles de l'étude complémentaire

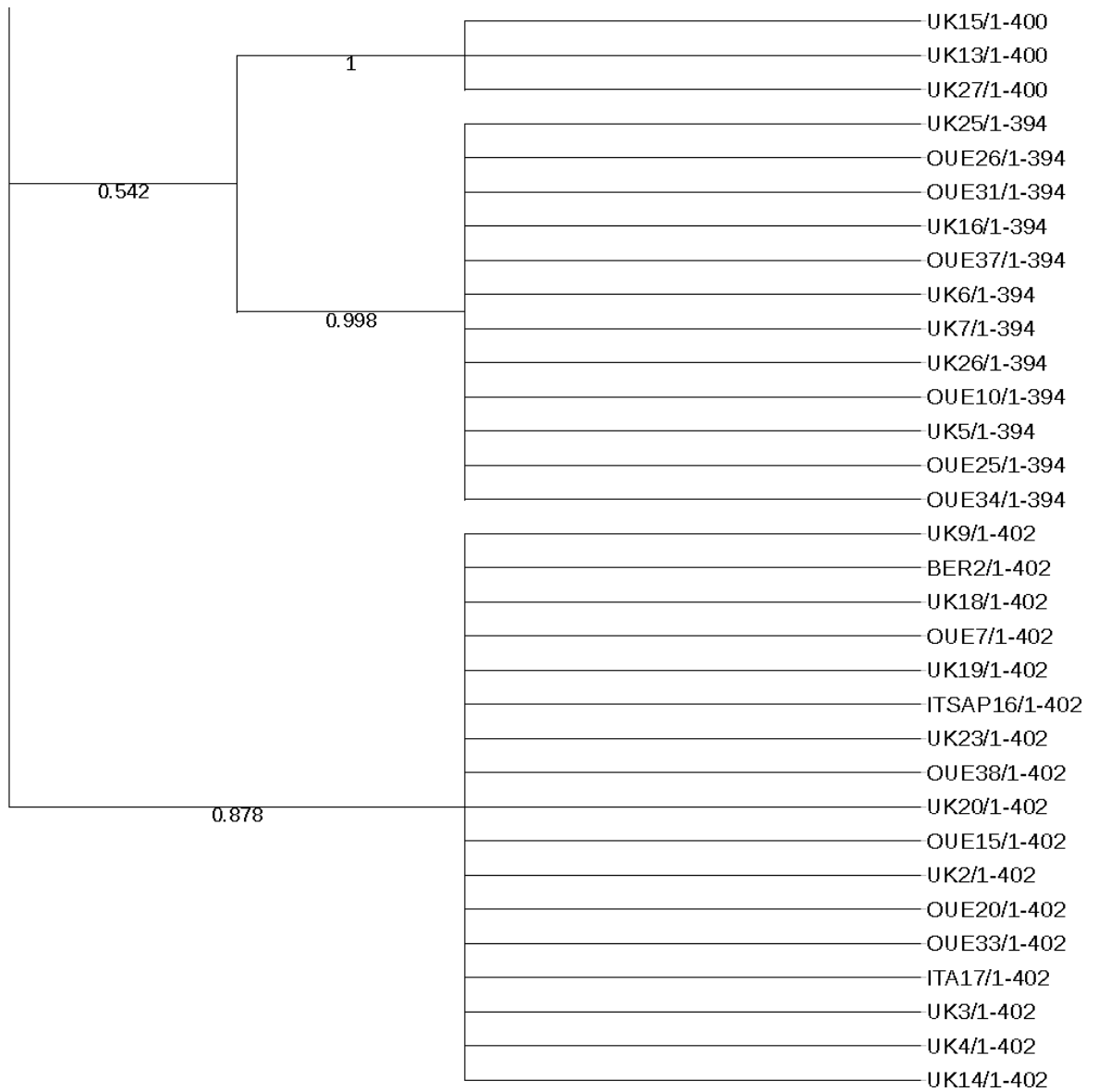
## ➤ ANNEXE 11 (voir page suivante)

	UK8/1-396
	ITA2/1-423
	SLO13/1-414
	ITSAP105/1-397
	ITA6/1-398
	ITA25/1-402
	ITA13/1-405
	OUE32/1-396
	ITSAP5/1-396
	ITA27/1-400
	ITSAP49/1-400
	ITA30/1-394
	ITA21/1-394
	ITSAP30/1-397
	ITSAP21/1-385
	ITSAP13/1-404
	ITSAP29/1-396
1	ITSAP55/1-396
0.998	ITSAP38/1-403
	SLO20/1-403
1	ITA15/1-396
	OUE13/1-396
0.998	ITA11/1-400
	ITSAP50/1-400
0.688	ITSAP39/1-402
	ITSAP63/1-402
0.998	ITA28/1-400
	OUE24/1-400
0.982	UK12/1-400
	UK22/1-400
	ITSAP24/1-400
1	OUE30/1-400
	ITA22/1-394
1	SLO5/1-394
	OUE8/1-402
1	OUE16/1-402
0.986	BER13/1-392
	ITSAP7/1-392
0.998	ITSAP45/1-396
	ITSAP103/1-396
0.91	ITSAP42/1-394
	SLO12/1-394
1	ITA1/1-406
	ITA4/1-406
	ITSAP48/1-394
1	SLO9/1-394
	ITA26/1-405
0.952	ITA19/1-405
	ITSAP37/1-405
	ITA7/1-402
1	OUE9/1-402
	UK11/1-402









**Annexe 11 : Arbre phylogénétique réalisé selon la méthode Neighbour Joining à partir des séquences de l'étude principale**

Toulouse, 2016

NOM : CATAYS

PRÉNOM : GUILLAUME

TITRE : Contribution à la caractérisation de la diversité génétique de l'abeille domestique *Apis mellifera* en France : cas du locus *csd* de détermination du sexe.

RÉSUMÉ :

Le déclin de l'abeille domestique *Apis mellifera* est désormais bien documenté. Le secteur de la recherche a été sollicité pour en comprendre les causes et tenter d'y remédier. Les rôles essentiels des abeilles dans notre écosystème sont décrits dans une première partie consacrée à la biologie de l'abeille, au sein de laquelle de multiples thèmes sont abordés et actualisés. La génétique, au sens large, est l'un des leviers mobilisables pour enrayer ce déclin. Caractériser la diversité génétique de l'abeille française est un préalable essentiel à la mise en place de programmes de sélection efficaces. Les sous-espèces d'*Apis mellifera* et les méthodes d'évaluation de cette diversité sont présentées dans une seconde partie. Dans le cadre du projet INRA-ITSAP SeqApiPop, nous nous sommes intéressés à la diversité au locus *csd* de détermination du sexe. Après une synthèse bibliographique concernant les propriétés de ce locus, les résultats de travaux expérimentaux réalisés pendant 6 semaines au centre INRA de Castanet-Tolosan (UMR 1388 GENPHYSE) sont présentés. La région d'intérêt a été amplifiée puis séquencée pour 183 abeilles issues de 6 populations françaises différentes. Soixante-dix-sept haplotypes différents ont été mis en évidence et la confrontation aux bases de données internationales a montré la découverte de 25 nouveaux allèles. Plusieurs autres paramètres ayant trait aux séquences ont été étudiés et discutés. En parallèle, une partie de l'intron 5 du gène, absente jusqu'à présent de l'assemblage de référence, a été produite.

MOTS-CLÉS :

APIS MELLIFERA L. – ABEILLE – DETERMINATION DU SEXE – HAPLODIPLOÏDIE – CSD – FEM – POLYMORPHISME – SOUS-ESPECES – SEQAPIPOP – DIVERSITE GENETIQUE – ALLELES – POLYANDRIE – SELECTION GENETIQUE – SELECTION BALANCEE – SELECTION POSITIVE – APICULTURE

---

TITLE : Contribution to the characterization of the genetic diversity of the honeybee *Apis mellifera* in France : case of the sex determination locus *csd*.

ABSTRACT :

The decline of the honeybee *Apis mellifera* is now well documented. Scientists have been solicited to understand the multiple causes of this decline and to help in trying to resolve it. The crucial roles of bees in our ecosystem are described in a first part devoted to biology, in which multiple topics are considered and updated. Genetics, in the broad sense, is one of the possible strategies that can be mobilized to counter the decline of populations. Characterizing the genetic diversity of French bees is a prerequisite to building efficient selection programmes. The *Apis mellifera* subspecies and methods to evaluate their diversity are presented in a second part of the thesis. Within the framework of the INRA-ITSAP SeqApiPop project, we focused on the diversity at the sex determination locus *csd*. After a review of the literature concerning the properties of this locus, the results of an experimentation carried out at the INRA UMR 1388 GENPHYSE research unit are presented in the last part. The hyper variable region of *csd* was amplified and subsequently sequenced for 183 bees belonging to 6 different French populations. Seventy-seven different haplotypes were highlighted and comparison with international databases showed we discovered 25 new alleles. Several other parameters involving the sequence were studied and discussed. In parallel, part of the intron 5 of the *csd* gene, lacking in the reference assembly, was produced.

KEY-WORDS :

APIS MELLIFERA L. – HONEYBEE – SEX DETERMINATION – HAPLODIPLOIDY – CSD – FEM – POLYMORPHISM – SUBSPECIES – SEQAPIPOP – GENETIC DIVERSITY – ALLELES – POLYANDRY – GENETIC SELECTION – BALANCING SELECTION – POSITIVE SELECTION – BEEKEEPING