



**HAL**  
open science

# Analyse de la diversité moléculaire de populations d'abeilles de la lignée ouest-méditerranéenne (*Apis mellifera mellifera*) dans le but de la conservation

Bénédicte Bertrand

► **To cite this version:**

Bénédicte Bertrand. Analyse de la diversité moléculaire de populations d'abeilles de la lignée ouest-méditerranéenne (*Apis mellifera mellifera*) dans le but de la conservation. Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI, 2013. Français. NNT : 2013PA112113 . tel-00951288

**HAL Id: tel-00951288**

**<https://theses.hal.science/tel-00951288v1>**

Submitted on 24 Feb 2014

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

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

UNIVERSITE PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE : Gènes, Génomes, Cellules  
Laboratoire Evolution Génomes et Spéciation

*DISCIPLINE Biologie Moléculaire et Génétique*

THÈSE DE DOCTORAT

soutenue le 28 juin 2013

par

**Bénédicte BERTRAND**

Analyse de la diversité génétique de populations  
d'abeilles de la lignée Ouest-Méditerranéenne  
(*Apis mellifera mellifera*) : Application à la  
conservation

**Directeur de thèse :**  
**Co-directeur de thèse :**

Pierre CAPY  
Lionel GARNERY

Directeur de Recherche (Université Paris-Sud)  
Maitre de Conférences (UVSQ)

**Composition du jury :**

*Rapporteurs :*

Per KRYGER  
Thierry ROBERT  
Steven SHEPPARD  
Maria BOUGA  
Marina MEIXNER

Senior Researcher (Aarhus University, Danemark)  
Maitre de Conférences (UPMC, France)  
Directeur de Recherches (WSU, Etats-Unis)  
Directrice de Recherches (Athens University, Grèce)  
Researcher (Bieneninstitut Kirchhain, Allemagne)

*Président du jury :*  
*Examineurs :*





## Remerciements

Un grand nombre de personnes a permis à cette thèse de voir le jour et surtout d'avoir été menée à son terme.

J'espère n'oublier personne.

Je remercie tout d'abord les membres de mon jury : **Maria BOUGA**, **Per KRYGER**, **Marina MEIXNER**, **Thierry ROBERT** et **Steven SHEPPARD**, qui ont très rapidement accepté de faire partie de ce jury et avec beaucoup d'enthousiasme.

Je tiens à remercier **Pierre CAPY**, sans qui cette thèse n'aurait pas été possible. Merci de m'avoir permis de changer de sujet de recherche, de m'avoir accueillie au LEGS et d'être devenu mon Directeur de thèse. Pour tout cela je vous suis infiniment reconnaissante.

Je remercie **Lionel GARNERY**, mon co-directeur de thèse, pour son encadrement tout au long de ses trois années. Merci de m'avoir fait découvrir le monde des abeilles que je ne connaissais absolument pas, et de m'avoir permis de faire une thèse aussi intéressante qu'enrichissante.

Un merci spécial à **Florence MOUGEL-IMBERT** qui m'a formée en statistiques, ce qui n'était pas une mince affaire, m'a soutenue jusqu'à la dernière ligne de ce manuscrit et dans les moments difficiles. J'ai énormément appris grâce à toi Flo et je n'aurais pas fini sans ton aide plus que précieuse. J'espère un jour être aussi exceptionnelle que toi !

Merci à **Sibyle MOULIN** et **Hélène LEGOUT** avec qui j'ai eu la chance de travailler. Vous êtes des collègues exemplaires, merci pour votre bonne humeur et la bonne ambiance dans laquelle j'ai pu travailler pendant ces trois ans.

Je remercie également l'ensemble de l'équipe EVOLBEE : **Gérard ARNOLD**, **Yves LOUBLIER**, **Jean-Christophe SANDOZ**, **Julie CARCAUD**, **Benoit LAPEYRE**, **Pierre JUNCA**, **Antoine COUTO**, **Florian BASTIN**, **Andi BRANDSTÄTER**, **Anna-Carolina ROSELINO** et **Marie-Anne WYCKE**, pour leur bonne humeur et leurs encouragements.

Merci d'avoir fait de pauses déjeuner des vrais moments de détente !

Merci aux « anciens » de l'équipe : **Mohamed ALBURAKI**, **Mariangela ARCA** et **Constanza VIDAL**.

Merci à **Sylvie APRUZZESE-SERAZIN**, pour son écoute, son soutien et ses encouragements. Merci également pour ta patience dans la gestion des dossiers de l'équipe et ce chapeau magique duquel tu trouves toujours une solution.

Merci à toute l'équipe **IRD DEEIT** avec laquelle j'ai partagé bien plus qu'un couloir et une salle de manip' du bâtiment 13 pendant ces années de thèse. Je remercie particulièrement **Claire CAPDEVIELLE-DULAC** et **Morgane LAVINA** pour leur aide, leur soutien et leur extraordinaire bonne humeur quotidienne.

Je remercie également l'ensemble des collègues du **LEGS** pour ces trois belles années en leur compagnie.

Un grand merci aux collègues enseignant de **l'Université Denis-Diderot** et de **l'Université Paris-Sud**, vous êtes de vrais modèles, travailler à vos côtés fut une joie et un honneur.

Je remercie **l'Ecole Doctorale Gènes, Génomes, Cellules** et **l'Université Paris-Sud XI** pour les financements que j'ai obtenus pour cette thèse.

Cette thèse n'aurait pas pu aboutir sans le soutien de ma famille et amis, la liste est longue...

Je remercie donc ma maman et ma soeur Nathalie ; les craquottes : Marie, Sophie et Camille ; Barth, Pauline, Jess, Julie, Mika, Djigui, Floriane, Steph, Olivier, Thomas, Matthieu, Charlotte, Alex, Ronan, Ben, Laure, Antoine, Marianne, Djibril, Claire, Damien, Jean, Hadrien, Katty, Naomi, Jeanne et tous ceux que j'oublie mais qui ont cru en moi quand moi-même je n'y croyais plus. Merci pour tous vos conseils et corrections. Merci juste d'avoir été là, c'est un peu de vous tous que j'ai couché sur les pages de ce manuscrit...

That's all folks !

# Sommaire

INTRODUCTION .....	1
<b>1. Généralités sur l'abeille .....</b>	<b>2</b>
<b>2. Biologie de la reproduction .....</b>	<b>6</b>
A. Le déterminisme du sexe .....	6
B. Monoandrie versus Polyandrie .....	8
C. Les congrégations de mâles .....	10
<b>3. Diversité .....</b>	<b>12</b>
A. La diversité morphologique .....	12
B. Les données moléculaires .....	14
<b>4. Conservation de l'Abeille .....</b>	<b>17</b>
<b>5. Problématique de la thèse .....</b>	<b>18</b>
<b>6. Objectifs de l'étude .....</b>	<b>21</b>
PARTIE 1 : Diversité génétique et introgression de conservatoires d' <i>Apis mellifera mellifera</i> en Europe .....	25
<b>Introduction .....</b>	<b>30</b>
<b>Resultats .....</b>	<b>36</b>
<b>Discussion .....</b>	<b>39</b>
PARTIE 2 : The Use of Mitochondrial Markers for The Conservation of Honeybee Populations ( <i>Apis mellifera</i> , L.): An Applied Approach .....	53
<b>Introduction .....</b>	<b>58</b>
<b>Resultats .....</b>	<b>62</b>
<b>Discussion .....</b>	<b>64</b>

PARTIE 3 : Etude spatio-temporelle du comportement reproducteur d' <i>Apis mellifera</i> à travers une congrégation de mâles, application à la conservation.....	83
<b>Introduction</b> .....	87
<b>Resultats</b> .....	92
<b>Discussion</b> .....	94
 CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES .....	 104
 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	 112





# INTRODUCTION

## 1. Généralités sur l'abeille

Insecte fascinant et terrifiant à la fois, l'abeille a été maintes fois étudiée, de l'Antiquité à nos jours. Grecs et Romains de l'Antiquité pensaient que les abeilles naissaient spontanément de carcasses animales en putréfaction, ce phénomène particulier de renaissance étant appelé Bougonie. En Egypte, une légende racontait qu'elles étaient issues de larmes du dieu Ra, qui en tombant sur le sol s'étaient spontanément transformées en abeilles. L'une des premières études scientifiques concernant les abeilles date de la Grèce Antique. Aristote en 343 av JC fait dans son Histoire des Animaux (ARISTOTLE and LOUIS 1964) une analyse certes erronée mais remarquable de cet insecte. En effet, même s'il ne considère jamais la Bougonie comme plausible, le philosophe reste convaincu de la reproduction asexuée des abeilles. Reines (appelées alors Rois), ouvrières et faux-bourçons furent décrits de façon très précise, notamment par l'observation fortuite d'une colonie bourdonneuse. Les faux-bourçons, selon sa théorie, n'engendrent aucune descendance, et contribuent uniquement à la prospérité de la ruche, en rendant les ouvrières plus diligentes.

Grâce aux avancées technologiques, allant de l'utilisation du microscope à la création de ruches d'observation vitrées, Réaumur put réfuter l'hypothèse de la génération spontanée des abeilles et faire une description non seulement morphologique mais également anatomique de l'insecte (REAUMUR 1748). C'est en 1758 que Linné (LINNAEUS 1758), médecin et botaniste suédois, donna à l'abeille le nom d'*Apis mellifera*, dont la signification latine signifie qu'elle « porte le miel ». Ce nom fut discuté plus tard, quand il fut reconnu que les abeilles ne portaient pas le miel, mais qu'elles le fabriquaient ». Le nouveau nom d'*Apis mellifica* fut donc proposé, mais n'est que très peu utilisé (principe d'antériorité d'appellation).

Kirby et Latreille proposèrent au XIX<sup>ème</sup> siècle presque simultanément une première classification globale pour les abeilles au sens large (ce que nous appelons maintenant les *Apoidea* Apiformes). Cette classification, basée sur la longueur du proboscis des abeilles, fut enrichie et modifiée par la suite. Michener donna en 1944 la première classification moderne des abeilles (Figure 1), modifiée récemment par Danforth (Figure 2) grâce à des analyses moléculaires (DANFORTH *et al.* 2006a; DANFORTH *et al.* 2006b)

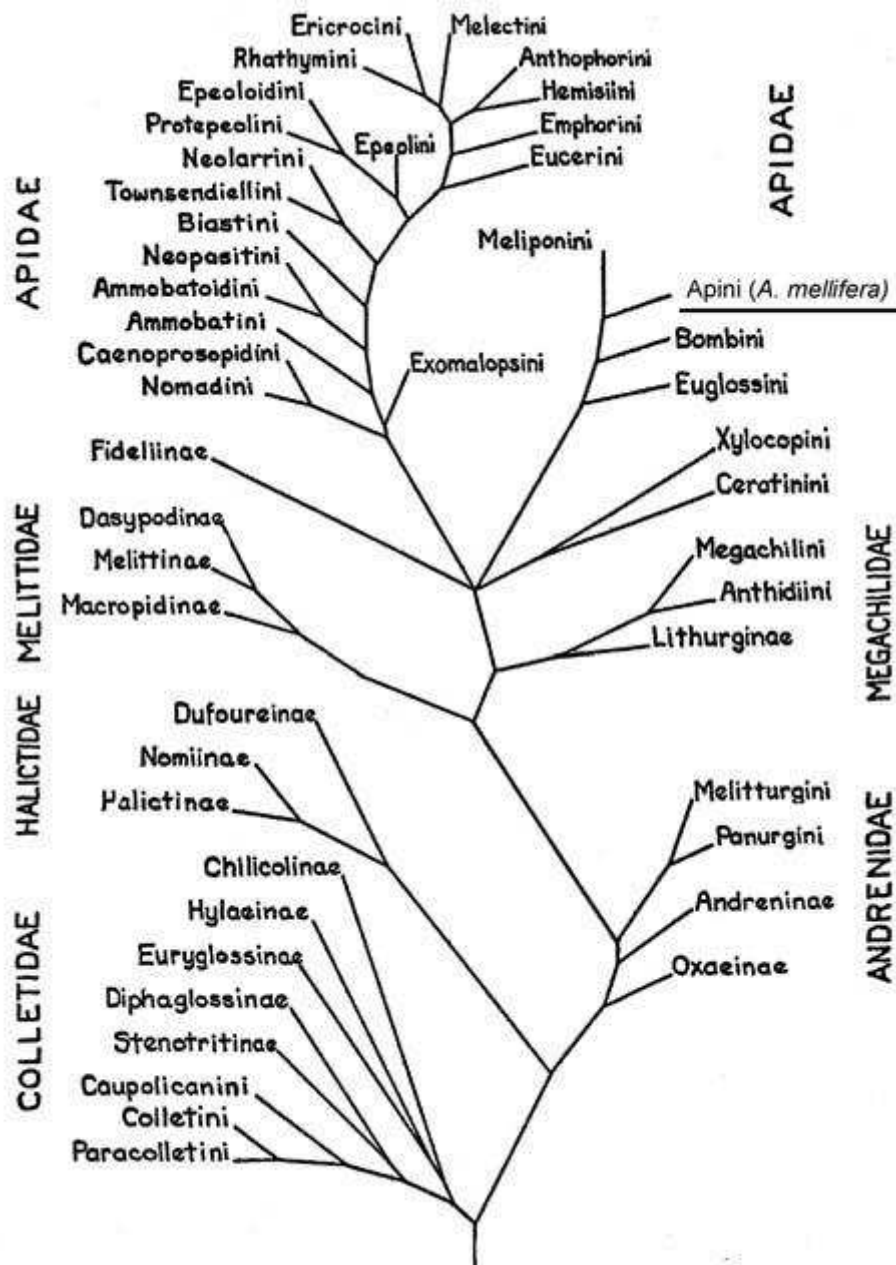


Figure 1 : Phylogénie des Apidae suggérant les apparentements entre familles, basée sur la morphologie des adultes. D'après (MICHENER 1944).

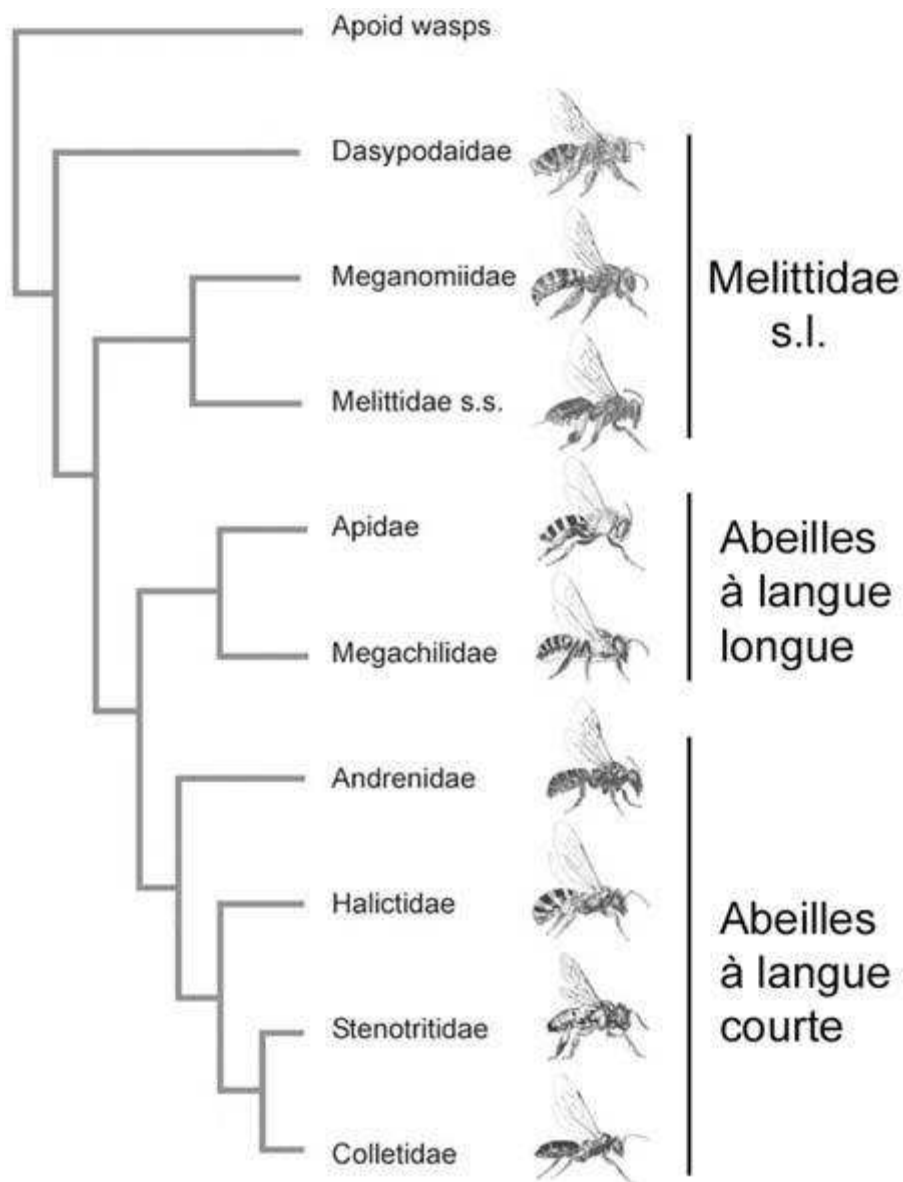


Figure 2 : Phylogénie des *Apidae* basée sur la morphologie des adultes et le séquençage de 5 gènes (Analyses Bayésiennes). D'après (DANFORTH et al. 2006a).

Apparues au cours du Crétacé, entre 145 et 65 millions d'années (Ma), les « abeilles sociales » ou *Apidae* se sont développées simultanément avec les angiospermes (CRANE 1999). Les *Apidae* se sont ainsi diversifiés en de nombreux genres, comprenant *Apis* ou *Bombus*, et ont survécu à de nombreuses crises géologiques et climatiques. Les différentes périodes glaciaires ont abouti à l'isolement et à la différenciation de 4 groupes d'espèces d'abeilles du genre *Apis*, il y a 6 à 9 Ma. *Apis dorsata*, « Abeille Géante » d'Asie et d'Australie, *Apis florea*, « Abeille Naine » d'Asie, *Apis cerana*, « Abeille Asiatique » et *Apis mellifera*, « Abeille mellifère » (Figure 3).

Ce dernier groupe ne comprend qu'une seule espèce (parmi les 9 décrites actuellement) : *Apis mellifera*. Son aire de répartition naturelle recouvre l'Europe, l'Afrique et le Proche-Orient, mais suites aux importations dues notamment aux migrations humaines, *Apis mellifera* est, actuellement, présente dans le monde entier.

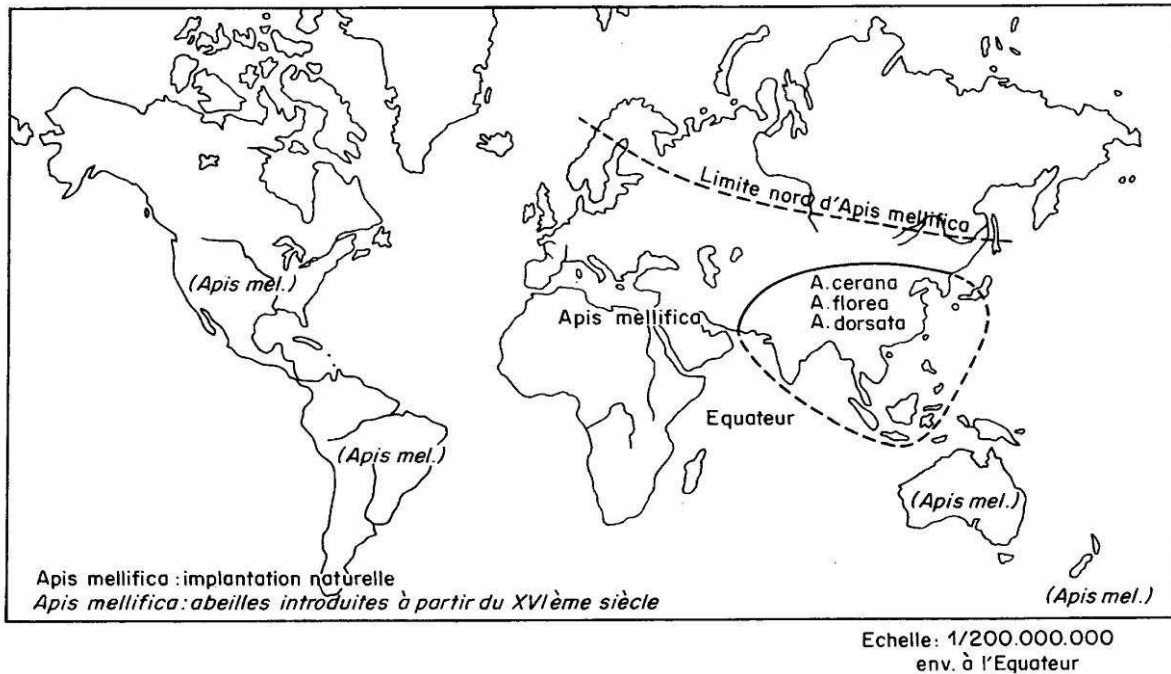


Figure 3 : Répartition géographique des 4 espèces du genre *Apis*. D'après (RUTTNER 1988).

Du fait de sa large répartition géographique, cette espèce est devenue la plus utilisée en apiculture. Elle rapporte plus de 10 milliards de dollars par an grâce aux ventes de miel, gelée royale et autres produits dérivés de la ruche. Elle est également utilisée pour ses vertus thérapeutiques, notamment issues de la gelée royale mais également du venin, en traitement contre l'arthrite ou, comme des études récentes l'auraient démontré en traitement, contre le VIH (Virus d'Immunodéficience Humaine) (HOOD *et al.* 2013). L'abeille est également le premier insecte pollinisateur mondial et par conséquent joue un rôle primordial dans les ressources alimentaires.

L'abeille mellifère est couramment appelée, à tort, abeille domestique. En effet, il existe dans la littérature plusieurs définitions de la domestication. Parmi celle-ci on trouve celle de Price (PRICE 1984) qui définit la domestication comme « le processus par lequel un animal captif s'adapte à l'homme et à l'environnement qu'il lui procure ». Cette adaptation est basée sur

une évolution génétique de plusieurs caractères, au cours des générations. La domestication représente donc la première étape de la sélection, elle se distingue du domptage dans le sens où les croisements (choix des partenaires notamment), les soins (abris, protection contre les prédateurs...) et le nourrissage des animaux sont contrôlés par l'Homme (HALE 1969). Ainsi, le simple fait d'élever des animaux dans un environnement adapté à l'espèce considérée, comme c'est le cas pour les abeilles, les huîtres et les moules par exemple, ne peut pas être considéré comme de la domestication.

## **2. Biologie de la reproduction**

L'une des plus grandes découvertes concernant cette espèce fut faite en 1845 par Jan Dzierzon, prêtre et apiculteur polonais. Celui-ci permit de mieux comprendre la biologie de la reproduction de l'abeille. Jusqu'alors des hypothèses variées expliquaient la reproduction, allant de la naissance spontanée jusqu'à la fécondation des œufs, grâce à une odeur émise par les mâles. Dzierzon mit en évidence le phénomène de parthénogenèse des abeilles, c'est-à-dire que les mâles d'abeilles sont issus d'œufs non fécondés. C'est également ce même apiculteur qui fabrique les premiers cadres amovibles des ruches permettant ainsi un accès au cœur du nid. Cette avancée apicole fut ensuite très largement reprise dans le monde entier, et en premier lieu par Langstroth en 1851 aux Etats Unis.

### *A. Le déterminisme du sexe*

Le déterminisme du sexe chez de nombreux hyménoptères est assez particulier et dépend du nombre d'allèles différents à un ou plusieurs locus de détermination du sexe (CROZIER and PAMILO 1996). Si les individus possèdent deux allèles distincts pour au moins un des locus, ils deviendront femelles. Dans le cas contraire (un seul allèle), ils deviendront mâles. Chez certaines espèces, comme l'abeille, le déterminisme du sexe n'est lié qu'à un seul locus. Ainsi, les œufs non fécondés haploïdes sont hémizygotés au locus concerné et deviennent toujours des mâles, on parle de parthénogenèse arrhénotoque. Les mâles haploïdes portent 16 chromosomes distincts. En revanche, les œufs diploïdes peuvent *a priori* devenir mâles ou femelles et porter 32 chromosomes (Figure 4). Ces mâles diploïdes, s'ils ne sont pas dévorés, à l'état larvaire par les ouvrières, sont généralement stériles (COOK and CROZIER 1995; KRIEGER *et al.* 1999), leur production représente donc un fardeau pour la colonie.

Chaque locus sexuel chez les hyménoptères contiendrait 10 à 20 allèles (COOK 1993). La proportion de mâles diploïdes dans de telles populations est faible et généralement issue de croisements consanguins (PAMILO *et al.* 1994). Il existe cependant des populations où seulement 5 allèles ont été dénombrés (ZAYED 2009). La proportion de mâles diploïdes est donc augmentée, entraînant une baisse dans le taux de croissance des colonies et une diminution de taille de celles-ci. Cela peut, dans les cas extrêmes, mener à l'extinction complète d'une colonie (Figure 5). Pour limiter ce risque, un très grand nombre d'allèles pour les gènes du déterminisme du sexe aurait été sélectionné par la sélection naturelle (BEYE *et al.* 2003).

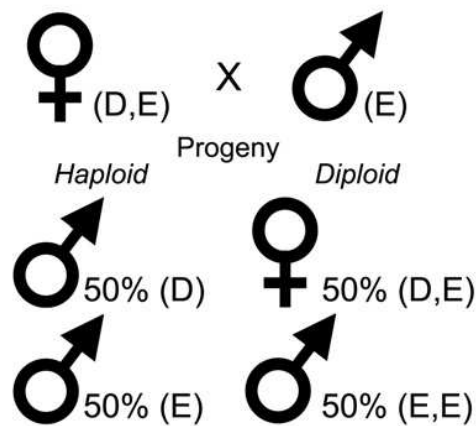


Figure 4 : Production de mâles diploïdes par accouplement d'une femelle et d'un mâle ayant un allèle commun (E) au locus sexuel. La moitié des individus diploïdes au locus sexuel deviendront des mâles diploïdes avec un génotype homozygote (E, E). D'après (ZAYED 2009)



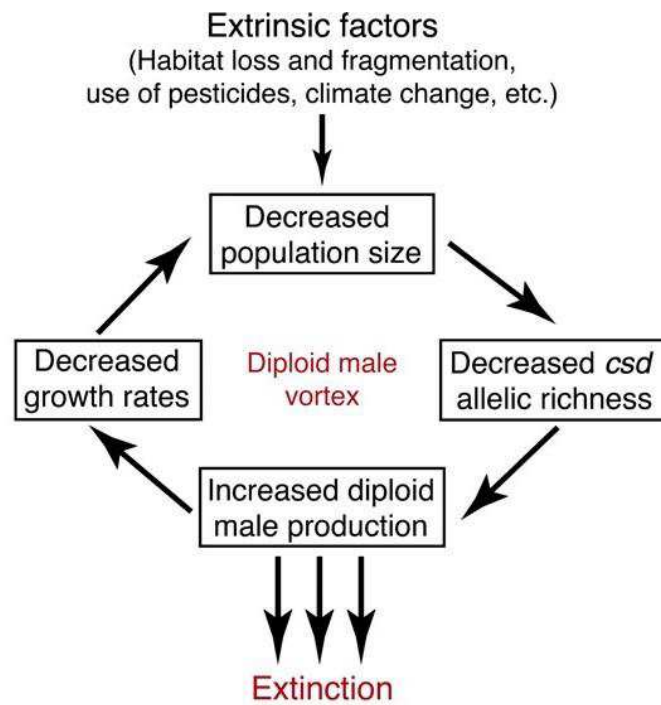


Figure 5 : Effets de la production de mâles diploïdes sur des petites populations. Création d'un « vortex d'extinction ». D'après (ZAYED and PACKER 2005).

La polyandrie (plusieurs mâles fécondants une même femelle) permet également de limiter la proportion de mâles diploïdes dans la descendance dans la mesure où un plus grand brassage des allèles est assuré.

### B. Monoandrie versus Polyandrie

L'évolution et le maintien de la polyandrie chez les hyménoptères eusociaux (activité de reproduction assurée par un ou plusieurs individus dominants) sont des phénomènes toujours inexplicables (BOOMSMA and RATNIEKS 1996). Comme chez les autres espèces animales, les accouplements multiples des femelles sont probablement coûteux pour les reines elles-mêmes. Ils impliquent non seulement une perte de temps et d'énergie (THORNHILL and ALCOCK 1983) mais également une augmentation des risques de prédation et d'infections parasitaires (THORNHILL and ALCOCK 1983; HURST and PECK 1996; ARNQVIST and NILSSON 2000).

Diverses hypothèses ont été proposées pour expliquer la présence de polyandrie chez les hyménoptères (BOOMSMA and RATNIEKS 1996; CROZIER and PAMILO 1996; CHAPUISAT 1998; CROZIER and FJERDINGSTAD 2001; STRASSMANN 2001).

*Hypothèse 1* : La femelle peut accepter de multiples copulations pour éviter un coût inutile lié à la résistance contre l'accouplement et la sélection du mâle (THORNHILL and ALCOCK 1983). La faiblesse de cette hypothèse peut être démontrée par des études de terrain. En effet, chez les abeilles, les reines effectuent plusieurs vols nuptiaux (TAN *et al.* 1999). L'accouplement multiple est donc bien un choix des reines, elles ne sont pas contraintes par les mâles.

*Hypothèse 2* : Un accouplement multiple pourrait permettre à la reine d'effectuer une sélection spermatique du meilleur mâle ou du mâle le moins apparenté (THORNHILL and ALCOCK 1983; STARR 1984). Selon cette hypothèse, un biais de représentation de certains mâles dans la descendance devrait exister. Or, le sperme est utilisé aléatoirement chez certaines espèces d'abeilles (BOOMSMA and RATNIEKS 1996; BOOMSMA and SUNDSTRÖM 1998; HABERL and TAUTZ 1998).

*Hypothèse 3* : Les femelles s'accoupleraient avec plusieurs mâles pour constituer une grande réserve de sperme (COLE 1983). Cependant, chez les abeilles, il a été observé que la spermathèque des reines contient une quantité de sperme équivalente à celle d'un seul mâle (CROZIER and PAGE 1985).

*Hypothèse 4* : La polyandrie permettrait de diminuer le fardeau génétique dû à la production de mâles diploïdes stériles (PAMILO *et al.* 1994). Les mâles homozygotes diploïdes sont stériles et représentent une charge pour la colonie d'origine. Aussi, une reine qui s'accouple avec de nombreux mâles augmente le risque de production de mâles diploïdes mais diminue leur proportion dans la descendance (augmentation plus importante du nombre de descendants par rapport au nombre de mâles diploïdes). Cette hypothèse expliquerait donc le passage de la monoandrie vers la polyandrie, mais n'expliquerait pas la polyandrie extrême de certaines espèces, comme chez *Apis dorsata* où la reine peut s'accoupler jusqu'avec 100 mâles (WATTANAACHAIYINGCHAROEN *et al.* 2003).

*Hypothèse 5* : L'augmentation de la variabilité génétique pourrait réduire les conflits sociaux entre reines et ouvrières liés au sex-ratio. En situation monoandre, les ouvrières sont trois fois plus apparentées à leurs sœurs qu'à leurs frères. Elles devraient donc favoriser la production des sexuées femelles au détriment de celle des mâles. En revanche, comme la reine est aussi apparentée à ses fils qu'à ses filles, elle devrait favoriser un sex-ratio équilibré. Plus le

nombre d'accouplements augmente, plus l'apparement des ouvrières décroît, diminuant ainsi l'intensité du conflit quant au sex-ratio de la descendance. Cette hypothèse semble peu probable si on considère que les ouvrières sont incapables de détecter le nombre exact de mâles avec lesquels les femelles se sont accouplées, et donc ajuster précisément le sex-ratio (PALMER and OLDROYD 2000).

*Hypothèse 6* : Une plus grande variabilité génétique des ouvrières à l'intérieur des colonies aurait une incidence sur la performance de celles-ci (CROZIER and CONSUL 1976). Il en découlerait une meilleure résistance aux parasites ou aux pathogènes (HAMILTON 1987; SHERMAN *et al.* 1988; SCHMID-HEMPEL 1994; SCHMID-HEMPEL 1998), une meilleure distribution des tâches (FEWELL and PAGE JR 1993) et également une meilleure capacité d'adaptation à des modifications environnementales (WILLIAMS 1966). Ceci suppose donc l'existence d'une base génétique à la résistance aux parasites ou pathogènes et un déterminisme génétique des performances des ouvrières dans les différentes tâches au sein des colonies. Pourtant, Neumann et Moritz (NEUMANN and MORITZ 2000) n'ont trouvé aucune association entre la fréquence d'accouplement des reines, la taille des colonies, la productivité ou même la résistance aux parasites chez *Apis mellifera*. Cependant, il a été montré que les colonies ayant de plus hauts niveaux de variabilité génétique s'adaptent mieux à des changements environnementaux pendant le fourragement (FEWELL and PAGE JR 1993).

En définitive, les quelques études menées pour analyser ces hypothèses sont souvent peu fructueuses voire même contradictoires. La polyandrie ne peut, en effet, s'expliquer selon une seule de ses hypothèses mais doit très probablement résulter de facteurs multiples.

Chez *Apis mellifera*, la polyandrie est élevée, en moyenne 15 mâles s'accouplent avec la reine (ESTOUP *et al.* 1994; KRYGER and MORITZ 1997). Le degré de polyandrie est estimé grâce au « classement » des ouvrières d'une colonie en fratries sur la base des analyses microsatellites, permettant ainsi de compter les différents mâles féconds.

### C. Les congrégations de mâles

Les abeilles mellifères ont un comportement reproducteur très particulier. Il implique l'agrégation de plusieurs milliers de mâles, jusqu'à 25 000 (PAGE JR and METCALF 1982), en une zone particulière appelée « congrégation de mâles » (DCA : drone congregation areas).

Les reines vierges se rendent dans ces congrégations et s'accouplent avec de nombreux mâles (MORITZ and SOUTHWICK 1992; ESTOUP *et al.* 1994).

Les mâles matures quittent leur colonie environ dix jours après l'émergence (sortie de l'alvéole), pour rejoindre la congrégation la plus proche (KOENIGER *et al.* 2005). Il a été estimé que plus de 200 colonies participaient à la formation d'une congrégation (PAGE JR and METCALF 1982; BAUDRY *et al.* 1998). Les mâles parcourent en général moins de 8km pour rejoindre une congrégation (JENSEN *et al.* 2005b) mais peuvent voler jusqu'à 15 km (PEER 1957; JENSEN *et al.* 2005b). Ces faux-bourçons vont alors voler à une hauteur de 15 à 60m. La congrégation peut atteindre un diamètre de 60 à 200m (LOPER *et al.* 1987). Dès qu'une reine vierge approche, les mâles forment une comète derrière elle et entrent en compétition pour la féconder.

Les congrégations se forment lorsque les conditions météorologiques sont favorables, en fin de printemps et en été, l'après midi (KOENIGER *et al.* 2005). Ces congrégations apparaissent, même en absence de reine vierge, majoritairement dans des espaces dégagés (RUTTNER 1966). Elles sont stables sur plusieurs années : en effet, les premiers faux-bourçons émergents de la saison savent trouver l'emplacement d'une congrégation après l'hiver (JEAN-PROST 1957). Les facteurs permettant cette stabilité restent encore inconnus.

Ce mode de reproduction, avec fécondation de la reine vierge à quelques centaines de mètres de la colonie, possède un caractère dangereux, à la fois pour la reine mais également pour la colonie. Il n'est pas improbable que la reine meure au cours de ce vol nuptial (SCHLÜNS *et al.* 2005). Il sera alors quasiment impossible pour la colonie d'élever une nouvelle reine vierge, le couvain de femelles diploïdes étant alors trop âgé, et cette colonie sera vouée à la mort. En effet, même si avant un essaimage, plusieurs reines vierges sont produites, la reine qui naît la première s'emploie à éliminer ses rivales avant qu'elles aient fini leur développement. Pour cela, elle les tue en réalisant un orifice sur le côté de la cellule. Si toutes les cellules ne sont pas détruites, elle se battra jusqu'à la mort de toutes les rivales, la colonie redeviendra donc monogyne, et la reine vierge ira se faire féconder.

Ce mode de reproduction est donc dangereux, mais il permet notamment un brassage génétique important. Par ailleurs, en raison de la grande représentation des colonies environnantes au sein des congrégations de mâles, leur étude est donc un bon moyen d'apprécier la diversité génétique d'*Apis mellifera* dans les conditions naturelles.

### 3. Diversité

La grande capacité d'adaptation des abeilles mellifères leur a permis de se répandre sur de larges zones géographiques (Europe, Afrique et Moyen-Orient).

De nombreuses sous-espèces, isolées géographiquement (océans, chaînes montagneuses, zones refuges durant les périodes glaciaires), se sont différenciées. Elles sont définies aujourd'hui avec des caractéristiques écologiques propres (RUTTNER 1988; SHEPPARD *et al.* 1997).

#### A. La diversité morphologique

Une analyse a été faite par Ruttner et ses collaborateurs sur plus de cinquante ans, regroupant des échantillons de l'ensemble de l'aire de répartition de l'espèce. Grâce à une quarantaine de variables morphométriques, 24 sous-espèces d'abeilles ont été identifiées (RUTTNER 1988).

Ces 24 sous-espèces géographiques ont été confirmées grâce à d'autres analyses de morphométrie puis grâce à la biologie moléculaire. Par la suite, deux autres sous-espèces ont été identifiées : *Apis mellifera ruttneri* (*A. m. ruttneri*) sur l'île de Malte (SHEPPARD *et al.* 1997) et *A. m. pomonella* au Proche-Orient (SHEPPARD and MEIXNER 2003).



Figure 6: Répartition géographique des 26 sous-espèces d'abeilles en Europe, Moyen Orient et Afrique et localisation des quatre lignées évolutives A, C, O and M. D'après (RUTTNER 1988).

Une importante structuration morphologique de ces sous-espèces a été observée grâce à des analyses en composantes principales (ACP). Ainsi, trois groupes ont été identifiés (Figure 7), correspondants à des zones géographiques bien définies. Ces groupes furent nommés M, A et C, respectivement pour les zones Ouest-Méditerranéenne, Africaine et Nord-Méditerranéenne (RUTTNER 1988).

Une quatrième lignée fut identifiée par la suite, regroupant les sous-espèces du Caucase et de

la Turquie (RUTTNER 1988). Cette dernière lignée O (Orientale) rassemble *A. m. anatoliaca*, *A. m. caucasica* et *A. m. pomonella* (SHEPPARD and MEIXNER 2003).

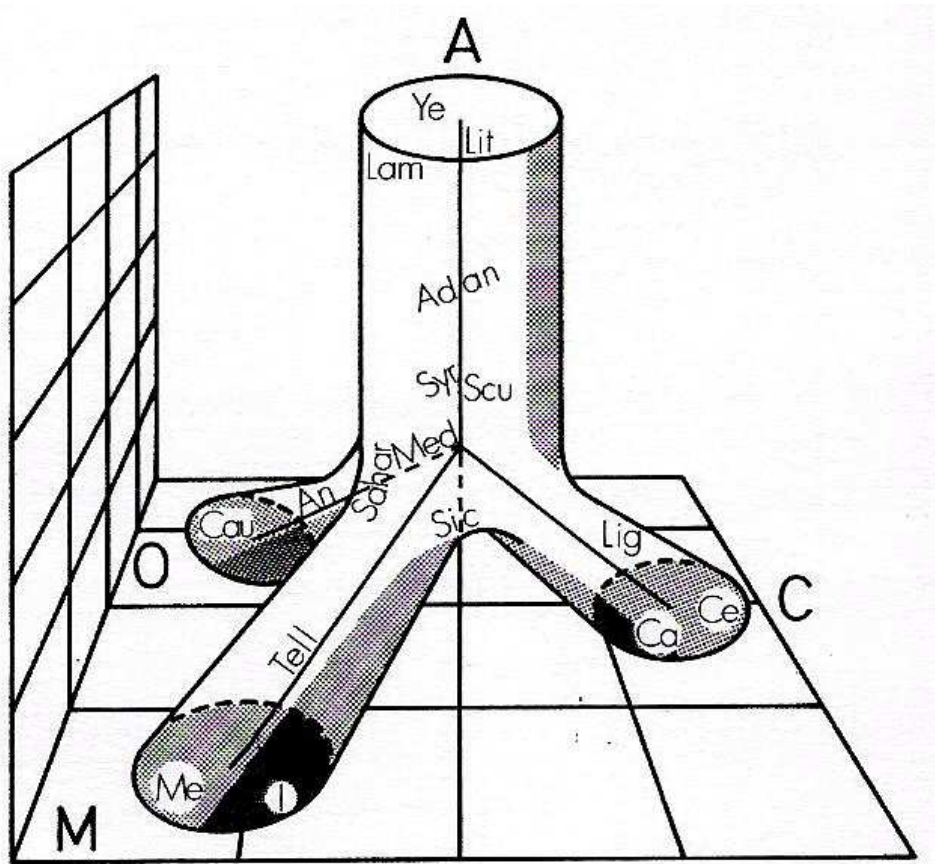


Figure 7: Phénogramme tridimensionnel de l'abeille *A. mellifera* obtenu à partir de mesures morphométriques et caractérisant les quatre branches évolutives M, A, C et O.

*Adan* = *adansonni*, *An* = *anatoliaca*, *Ca* = *carnica*, *Cau* = *caucasica*, *Ce* = *cecropia*,  
*I* = *iberica*, *Lam* = *lamarckii*, *Lig* = *ligustica*, *Lit* = *litorea*, *Me* = *mellifera*, *Med* = *meda*,  
*Sahar* = *sahariensis*, *Scu* = *scutellata*, *Sic* = *sicula*, *Syr* = *syriaca*, *Tell* = *intermissa*,  
*Ye* = *yemenitica*. D'après (RUTTNER 1988).

### B. Les données moléculaires

Grâce aux avancées technologiques des années 80-90, l'ADN est devenu plus facilement exploitable, notamment avec les réactions de PCR.

Différents marqueurs ont ainsi pu être utilisés pour étudier la diversité génétique des abeilles :

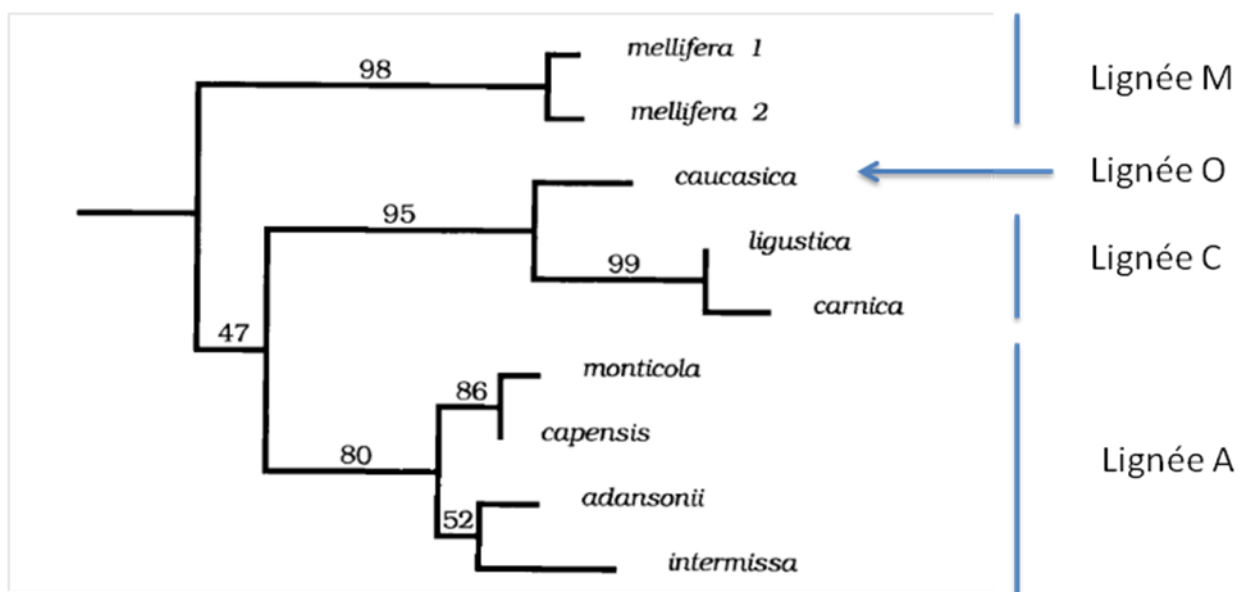
- les marqueurs de l'ADN mitochondrial,
- les marqueurs de l'ADN nucléaire.

### *i. ADN mitochondrial (ADNmt)*

La mitochondrie est la source majeure d'énergie cellulaire, sous forme d'ATP. Cet organe est présent chez tous les eucaryotes et résulte d'une endosymbiose d'une alpha-protéobactérie dans une cellule eucaryote. Chaque cellule eucaryote contient un grand nombre de mitochondries. L'ADNmt est une molécule circulaire et double brin, sa longueur totale est de l'ordre de 16 kb (BOURSOT and BONHOMME 1986). L'organisation générale du génome mitochondrial (taille de la molécule et nombre de gènes) semble malgré tout être conservée au sein des Métazoaires et ne contiendrait aucun intron (BROWN 1983; CHINNERY and SCHON 2003). Sa transmission maternelle et son fort taux de mutation (5 à 10 fois plus vite que l'ADN nucléaire chez l'Homme) en font un excellent marqueur direct et non ambigu de la généalogie maternelle et de la structuration géographique au sein d'une espèce, ainsi que des échanges génétiques entre populations (VILA *et al.* 1999; ORLANDO *et al.* 2003; NADERI *et al.* 2007). Son étude est de plus facile et peu onéreuse, d'où son utilisation courante dans l'analyse de la diversité de nombreuses espèces, dont l'abeille (MORITZ *et al.* 1986; SMITH 1991; GARNERY *et al.* 1992), voir entre espèce proche (Barcode).

L'utilisation de l'ADNmt a permis de retracer l'histoire évolutive de l'espèce *Apis mellifera*, (SMITH 1991; GARNERY *et al.* 1992) (Figure 8). Cette méthode a également confirmé l'existence de 3 lignées évolutives chez l'abeille, M, A et C (SMITH 1991; GARNERY *et al.* 1992; GARNERY *et al.* 1993; ARIAS and SHEPPARD 2005).

La lignée O n'est pas clairement identifiée avec ce marqueur mitochondrial, où elle est non dissociable de la lignée C (Figure 8).





*Figure 8: Phylogénie (Neighbor-joining) des sous-espèces de A. mellifera basée sur les séquences de la région COI-COII de l'ADNmt. A. cerana a été utilisée pour raciner l'arbre. Les lignées évolutives M, C et A (de haut en bas) sont bien différenciées. D'après (CORNUET et al. 1991).*

Le marqueur mitochondrial, malgré ses multiples possibilités, ne permet d'étudier qu'une facette de la génétique des populations d'abeilles. La phylogénie liée aux molécules d'ADNmt ne représente que la généalogie des femelles. Les mutations évolutives au niveau de l'ADN nucléaire peuvent être associées à la phylogénie mitochondriale mais ne témoignent pas de la même histoire évolutive.

## **ii. ADN nucléaire, marqueurs microsatellites**

Les marqueurs microsatellites sont abondants dans les génomes (pour la très grande majorité des êtres vivants), neutres, co-dominants, et surtout très variables en taille. Ces propriétés en ont fait un outil majeur en médecine, notamment pour les tests de paternité, et en biologie des populations, pour évaluer les liens de parenté entre individus.

Ils sont constitués de motifs de un à six nucléotides répétés en tandem. Le nombre de répétition de ces motifs étant variable d'un allèle à l'autre. Le mécanisme le plus communément admis comme source de la variabilité des microsatellites est le glissement de polymérase, SSM (Slipped-Strand Mispairing). Lors de la réplication de l'ADN, le brin synthétisé peut se dissocier du brin matrice. Si cela se produit lors de la synthèse d'un microsatellite, le ré-appariement peut être décalé à cause du caractère répété de la séquence. Ce décalage, s'il n'est pas détecté par les enzymes de réparation de l'ADN, provoque alors la perte ou le gain d'une ou plusieurs répétitions sur le nouveau brin par rapport à la matrice, selon que le décalage s'est produit en amont ou en aval de la position de mésappariement (TAUTZ and SCHLÖTTERER 1994).

Chez l'abeille plus de 500 microsatellites ont été identifiés (ESTOUP *et al.* 1994; GARNERY *et al.* 1998b; SOLIGNAC *et al.* 2003b). Ils sont principalement utilisés dans la détermination de la paternité afin de rechercher les fratries dans une colonie (ARNOLD *et al.* 2002; CHALINE *et al.* 2004), ainsi que dans la cartographie génétique (SOLIGNAC *et al.* 2004; SOLIGNAC *et al.* 2007).

Les trois lignées évolutives M, A et C (identifiées en morphométrie et avec l'ADNmt) furent confirmées avec les marqueurs de l'ADN nucléaires (Figure 9) (ESTOUP *et al.* 1994; WHITFIELD *et al.* 2006b).

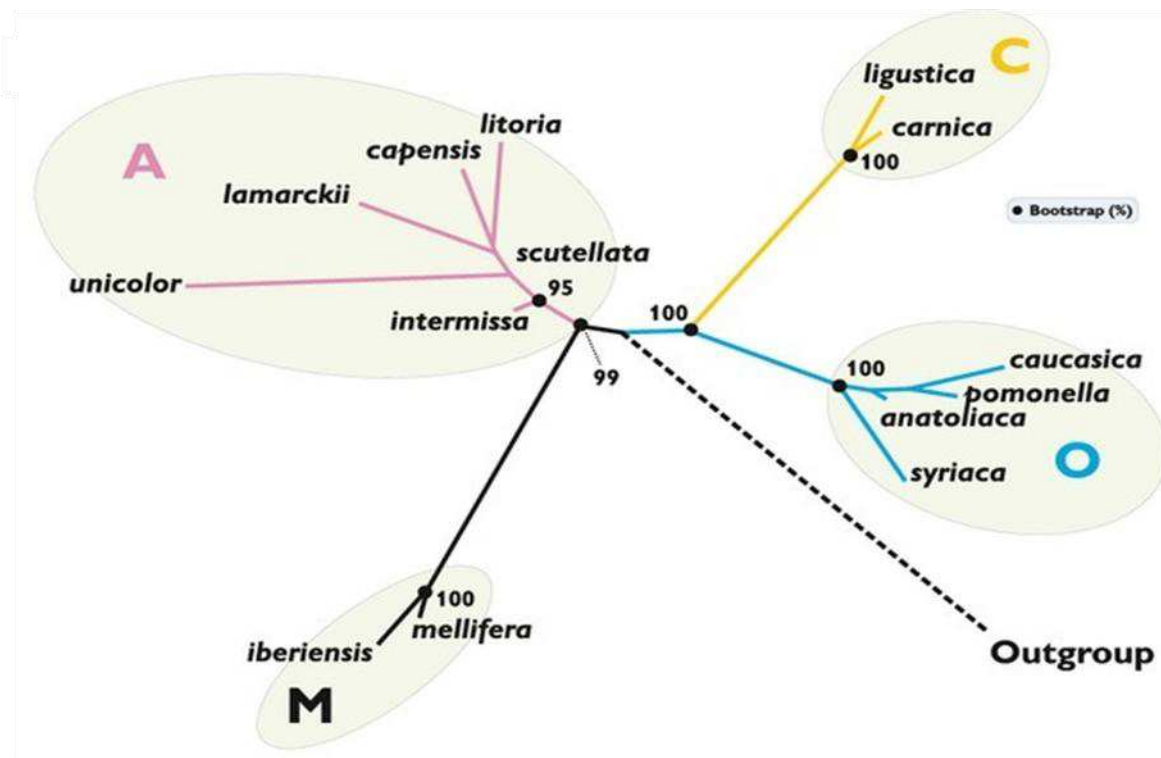


Figure 9: Représentation phylogénétique (Neighbor-joining) des quatre lignées évolutives et différentes sous-espèces d'*A. mellifera* basée sur les analyses nucléaires. *A. cerana* a été utilisé pour raciner l'arbre. D'après (WHITFIELD *et al.* 2006a).

La lignée la plus étudiée avec les marqueurs microsatellites est sans conteste la lignée M (FRANCK *et al.* 1998b; GARNERY *et al.* 1998b; JENSEN *et al.* 2005a; SOLAND-RECKEWEG *et al.* 2009), avec notamment la mise en évidence de zones d'hybridation avec d'autres lignées.

#### 4. Conservation de l'Abeille

La sauvegarde d'espèces menacées est un sujet d'actualité. Cette attention particulière concerne majoritairement les vertébrés et en particulier les mammifères (HILTON-TAYLOR and MITTERMEIER 2000; SCHERF 2000). Les insectes, qui représentent plus de 50% des animaux recensés, ne font l'objet que de peu d'études et d'attention dans le domaine de la conservation, sauf pour des espèces emblématiques (nombreux papillons) voire pour des raisons économiques et/ou politiques (passage d'autoroute).

Parmi les insectes, l'Abeille (*Apis mellifera*, Linné 1758) a toutefois tendance à se démarquer. En effet, avec un rendement annuel de plusieurs milliards de dollars (DELAPLANE and MAYER 2000), son intérêt économique n'est plus à discuter.

Les changements d'habitats récents et les introductions faites par l'homme ont mis en contact des espèces proches génétiquement mais isolées géographiquement (allopatriques) de telle sorte qu'elles n'ont jamais développé de barrière empêchant leur croisement. L'hybridation entre une espèce locale et une importée peut avoir des impacts significatifs sur les espèces locales, allant jusqu'à l'extinction de celles-ci (PERRY *et al.* 2002b).

L'hybridation intraspécifique fait toutefois débat. En effet, au sein d'une même espèce, les populations partagent un certain nombre d'allèles. Les termes hybridation et introgression sont généralement utilisés au niveau interspécifique, mais dans le cas présent ils seront utilisés au niveau intraspécifique, dans la mesure où les lignées géographiques sont bien marquées. De même, l'introduction de diversité génétique dans une population sera, en général, bénéfique et permettra ainsi d'augmenter la valeur sélective de la population.

Cependant, dans le cas de l'Abeille, les sous-espèces d'*Apis mellifera* se distinguent notamment par leur adaptation à leur environnement respectif. Ainsi, en hybridant différentes sous-espèces, ces adaptations à leurs environnements pourront être perdues et avoir des conséquences non négligeables sur les sous-espèces considérées. Ces traits de caractères d'adaptation à l'environnement ne sont pas toujours facilement détectables. La résistance à de très basses températures ou la capacité de voler sur de longues distances de la sous-espèce *A. m. mellifera* (Ruttner 2004) ne sont pas des caractéristiques *a priori* primordiales ou même facilement observables. Pourtant ces traits de caractères font qu'elle est particulièrement bien adaptée au climat tempéré Européen où les hivers peuvent être rigoureux.

## **5. Problématique de la thèse**

Comme de nombreuses espèces en Europe, l'Abeille mellifère subit les actions de l'agriculture intensive, de l'industrialisation, de l'urbanisme qui ont tendance à fragmenter les habitats mais aussi à éliminer une partie de la différenciation adaptative. Certaines pratiques apicoles, telles que la sélection de souches plus productives, l'importation de reines et la transhumance des colonies, peuvent entraîner à long terme une homogénéisation de la

structure géographique de l'espèce, voire la perte des potentialités adaptatives locales (variants locaux ou formes écotypiques adaptées à un environnement).

Ainsi, la mise en place de grandes zones de monocultures a progressivement modifié les paysages, diminuant les ressources en pollen aussi bien de manière quantitative que qualitative. Les carences qui en résultent peuvent contribuer à affaiblir les colonies et réduire l'effectif en colonies des populations.

La sélection et la multiplication de souches plus productives peuvent avoir des effets directs sur les modalités d'évolution des populations. En effet, la sélection de souches amène à utiliser moins de colonies pour une même production et donc à diminuer l'effectif efficace des populations pouvant amener des populations à évoluer non plus sous le régime de la panmixie avec adaptation Darwinienne (sélection naturelle), mais sous celui de populations de petits effectifs (dérive génétique et consanguinité).

Du fait de la complexité génétique de l'abeille (socialité, haplo-diploïdie, polyandrie, locus sexuel), la sélection de souche n'a pas progressé de manière significative. La profession a donc eu de plus en plus recourt à l'importation de souches réputées plus productives. Ainsi, depuis les années 60, plusieurs vagues d'importations ont eu lieu, suivant ainsi des phénomènes de mode en relation avec la progression des connaissances sur les différentes sous-espèces. Dans un premier temps ce sont les sous-espèces *ligustica* et *carnica* qui ont été importées, suivies dans les années 80 par l'abeille caucasienne (*caucasica*) ou encore la race « triple hybride » (fécondation de reines Italo-caucasiennes par des mâles locaux). Ces croisements permettaient de doubler la production en miel d'une colonie. Plus récemment encore la race « Buckfast » (multi-hybride sélectionné) appelée aussi « Frère Adam » connut un franc succès.

Ainsi, certaines sous-espèces, telles que *A. m. carnica* et *A. m. ligustica*, réputées de grand intérêt pour l'apiculture furent massivement exportées au détriment de sous-espèces locales comme *A. m. mellifera* (ADAM 1983). En conséquence, de nombreuses populations d'abeilles noires *A. m. mellifera* montrent un taux important d'introgession par *A. m. ligustica* au Danemark (JENSEN *et al.* 2005a) et en France (GARNERY *et al.* 1998a; GARNERY *et al.* 1998b; PERRIER *et al.* 2003b). Cette situation peut aller jusqu'à l'extrême, comme en Allemagne, où la sous-espèce *A. m. mellifera* a été complètement éradiquée et remplacée par *A. m. carnica* (MORITZ 1991).

Ces différentes souches ont été importées pour des raisons de productivité mais ne sont pas forcément bien adaptées au climat local. Une des conséquences est que le développement de la colonie est trop précoce et nécessite le maintien artificiel de la force de la colonie en début de saison. Ces colonies d'importation ont également besoin d'un nourrissage hivernal (période de repos de la colonie) plus important car les populations de ruche sont plus importantes (sur 6 à 8 cadres) que celle des souches locales (sur 4 ou 5 cadres).

Le remplacement progressif de populations locales d'abeilles adaptées à une flore et un climat local par des abeilles plus productives n'est pas sans conséquence sur la structure génétique et l'adaptation des populations locales. Alors que la sélection naturelle aurait dû éliminer les colonies moins adaptées, leur maintien artificiel peut avoir pour conséquence la disparition des adaptations locales qui se sont mises en place au cours des millénaires.

De plus, l'augmentation des pertes de colonies observées ces dix dernières années a entraîné une augmentation du niveau d'importations afin de restaurer les cheptels perdus. Du fait du manque d'éleveurs de reines d'*A. m. mellifera*, une grande partie des colonies perdues est remplacée par des abeilles d'importation ce qui a tendance à accélérer la disparition des abeilles locales. L'évolution au cours du temps de la structure des populations traduit une tendance à l'augmentation des introgressions liées aux importations (Bertrand *et al.* soumis).

L'abeille noire, dont l'aire de répartition s'étend des Pyrénées jusqu'à l'Oural, possède néanmoins des caractères non négligeables pour l'apiculture, tels que la résistance à des températures basses, la capacité à voler sur de longues distances et à faire de bonnes récoltes de pollen et propolis (RUTTNER *et al.* 2004). Ces caractéristiques démontrent la rusticité de cette sous-espèce et donc son intérêt à la fois en apiculture et également dans des programmes de conservation.

Quelles que soient les causes des pertes de colonies en Europe, la situation de l'Abeille noire est très préoccupante et risque de basculer rapidement vers une disparition complète de la sous-espèce.

Des conservatoires de l'Abeille noire ont été initiés en Europe, soit par élevage de reines, soit en installant des zones protégées comme en Norvège (Flekkefjord), au Danemark (île de Læsø) et en France (île d'Ouessant). L'objectif des conservatoires génétiques est de conserver la diversité des populations d'abeilles noires soit pour utiliser ces abeilles en race pure, soit pour la formation d'hybrides de qualité. Ils ont pour principal objectif de maintenir un niveau de variabilité en relation avec l'adaptation des populations à leur environnement. Ils doivent

également constituer des réservoirs de gènes (actuels et futurs) qui pourront s'avérer utiles, à long terme, pour la profession (sélection de caractères d'intérêt, tels que la résistance à certaines maladies, ou la production de miel). Des conservatoires furent également initiés dans des régions présentant des populations écotypiques, c'est-à-dire des zones ayant des spécificités écologiques liées à leur environnement, ce qui exclut les zones d'agriculture intensive ou de forte urbanisation. Ainsi, la plupart des conservatoires de l'abeille noire Européenne sont inclus dans des parcs régionaux ou nationaux.

## **6. Objectifs de l'étude**

Bien que des niveaux d'introgression importants aient été observés dans de nombreuses régions françaises (Figure 10), certaines populations se sont révélées compatibles avec la mise en place de conservatoires génétiques (rapport FEAGA, 2007-2008). Les critères de compatibilité retenus pour l'installation de ces structures conservatoires prennent en compte soit un niveau d'introgression génétique faible (région Nord et Nord Ouest de la France), soit une particularité génétique des populations (Sud Est, Savoie et Corse), liée à leur histoire évolutive, qui a contribué à mettre en place des combinaisons de gènes originales (introgressions naturelles). Ces combinaisons pourraient se révéler intéressantes pour comprendre l'adaptation de populations locales (écotypiques).

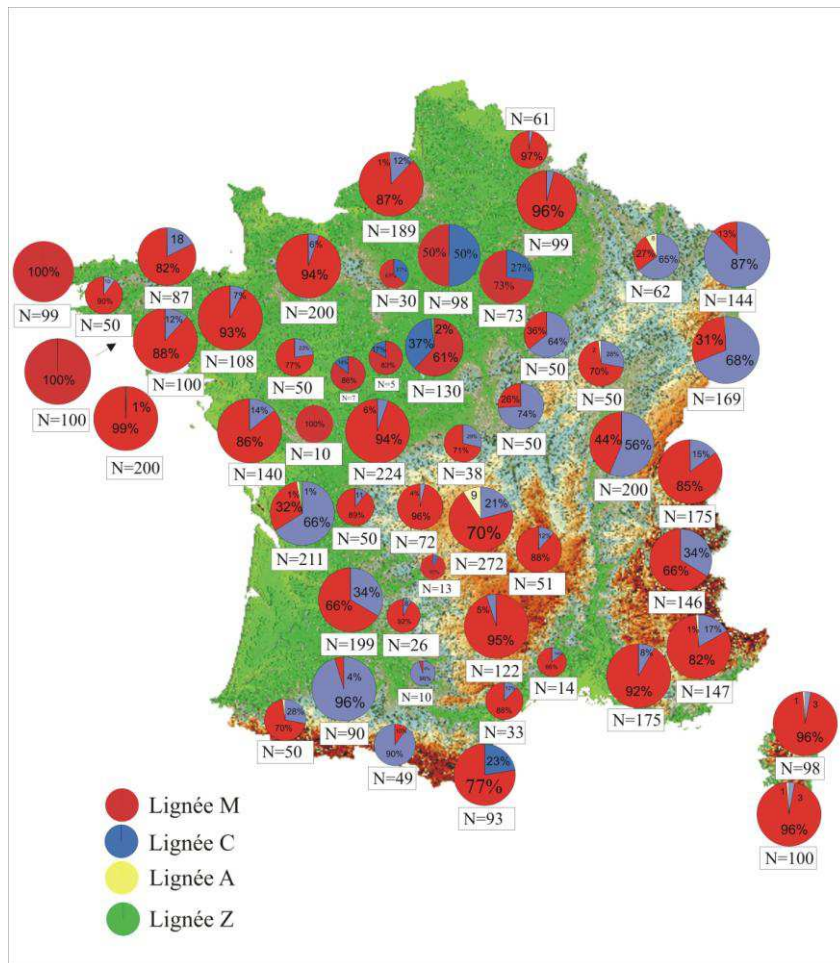


Figure 10: Niveaux d'introgressions mitochondriales des populations françaises (FEAGA, 2007-2008). Les haplotypes locaux de la lignée M sont en rouge, les haplotypes importés des lignées C, A et Z (sous populations de la lignée Orientale) sont respectivement en bleu, jaune et vert.

Les conservatoires de l'Abeille Noire *A. m. mellifera* actuels ont été mis en place et sont gérés par des associations locales d'apiculteurs. Ceux-ci se basent sur des critères morphologiques et morphométriques pour caractériser leurs colonies. Ces approches ont l'avantage d'être rapides, très peu onéreuses et réalisables par des non scientifiques. Toutefois, elles ne permettent pas une caractérisation précise des colonies ou de la structure de la population conservatoire.

Les méthodes de conservation mises en place ne sont pas homogènes et présentent parfois certaines faiblesses. En particulier, l'approche appliquée de la conservation est trop souvent gérée à l'échelle de la colonie ou du rucher sans tenir compte de la structure populationnelle ni de la biologie de la reproduction de cette espèce.

De plus, il n'existe à ce jour aucun protocole de caractérisation de la population d'abeilles au départ ni pour la mise en place de conservatoire concernant une sous espèce d'abeille.

Le premier objectif de cette étude a consisté en l'analyse de la structure génétique de 5 conservatoires en France et en Belgique (Belgique, Cévennes, Ouessant, Savoie, et Vendée). En parallèle, une population conservatoire a été initiée en 2008 en région Ile-de-France. Cette structure pilote a été mise en place afin de proposer et tester un protocole de mise en place et de suivi de la structure de la population. Cette population conservatoire fait l'objet d'un suivi scientifique afin de déterminer les paramètres de conservation (taille de population, flux de gènes), d'estimer les risques d'introgession et de tester l'efficacité des actions de conservation.

Ce protocole implique dans un premier temps une étude d'impact visant à caractériser la structure génétique (mitochondriale et nucléaire) de la population. Il implique donc une analyse de la diversité génétique allant de la population à l'individu. La caractérisation à l'échelle des colonies permettra de mieux comprendre leur structure génétique grâce, notamment, à des marqueurs nucléaires.

Ainsi, chaque colonie sera caractérisée par son niveau de variabilité, son niveau d'introgession propre, lié non seulement à la lignée maternelle mais également à la lignée paternelle, grâce à l'étude des différentes fratries. Cette étude à l'échelle de la colonie, au regard des mâles fécondants les reines, renseigne sur la diversité génétique locale, qui pourrait, dans un cas d'isolement géographique trop prononcé, être très faible et donc problématique.

Enfin, cette étude a également pour objectif de mieux comprendre le comportement reproducteur de l'Abeille, à travers l'analyse d'une congrégation de mâles, suivie sur trois années consécutives.

Cette congrégation de mâles a été identifiée au sein du Conservatoire de l'Abeille Noire d'Ile-de-France (CANIF). Par cette analyse, nous avons obtenu des informations cruciales concernant le suivi du conservatoire telles que le niveau d'introgession de la congrégation et l'estimation des flux de gènes provenant de colonies extérieures au conservatoire.

Ces paramètres sont essentiels afin de réaliser des simulations de scénarios d'évolution de la population conservatoire permettant d'envisager différents protocoles de conservation. Enfin,



de manière moins importante, nous avons obtenu une estimation des impacts, liés à la gestion du conservatoire, sur la structure génétique de la congrégation.

# PARTIE 1

## Diversité génétique et introgression de conservatoires d'*Apis mellifera mellifera* en Europe

## Introduction

Les insectes représentent plus de 50% des espèces actuellement connues. Ils sont essentiels à la plupart des écosystèmes terrestres mais également aquatiques. Parmi les insectes, l'un des plus grand groupe de pollinisateurs est représenté par la famille des *Apidae*. Cette famille est apparue au cours du Crétacé, il y a plus de 65 millions d'années et comprend quelques 20000 espèces (Michener 2000). Avec un rendement annuel de plus de 10 milliards de dollars, leur intérêt économique n'est plus à confirmer (Delaplane and Mayer 2000).

Les abeilles appartenant à cette famille subissent, comme l'ensemble de la biodiversité, un déclin de populations depuis les dernières décennies (vanEngelsdorp 2009). Plusieurs facteurs ont été proposés pour expliquer ce déclin généralisé : la surexploitation, les changements climatiques, la pollution, les pesticides et l'introduction d'espèces invasives.

L'Abeille Mellifère *Apis mellifera*, est très largement répandue et diversifiée en Occident. Elle comprend au moins 26 sous-espèces caractérisées selon des critères morphométriques et moléculaires (Ruttner 1988, Sheppard and Meixner 2003). Ces sous-espèces sont réparties en quatre lignées évolutives : la lignée Ouest-Méditerranéenne (M), la lignée Africaine (A), la lignée Nord-Méditerranéenne (C) et la lignée Orientale (O) (Ruttner 1978, Bouga *et al.* 2005, Garnery *et al.* 1992, 1998a, 1998b, Franck *et al.* 2000).

La lignée Ouest-Méditerranéenne est composée de deux sous-espèces dont *Apis mellifera mellifera* (*A. m. mellifera*) également connue sous le nom d'Abeille Noire. Son aire de répartition naturelle, le plus large actuellement identifié parmi les abeilles, va des Pyrénées à l'Oural (Ruttner 1988). Cette large distribution suggère une forte capacité d'adaptation aux différents climats et changements environnementaux ainsi qu'aux biotopes spécifiques (Garnery *et al.* 1992, Jensen *et al.* 2005a). L'Abeille Noire possède donc des caractéristiques qui font de cette sous-espèce la plus adaptée au climat nord-européen.

Au cours des dernières décennies, pour palier au déclin de populations d'abeilles à travers l'Europe, des apiculteurs auraient importé des colonies allochtones. Les populations natives d'*A. m. mellifera* furent davantage réduites due à l'hybridation avec ses colonies de sous-espèces non locales (Garnery *et al.* 1998, Franck *et al.* 2000, De la Rúa *et al.* 2002, Jensen *et al.* 2005a).

Des conservatoires se sont progressivement mis en place en Europe. Ils consistent principalement en des stations de fécondation où les différents partenaires sont sélectionnés selon des caractéristiques morphologiques. Et il n'est pas rare que ces stations soient relativement isolées géographiquement (sur des îles ou des vallées). Toutefois, l'isolement géographique n'est pas toujours compatible avec la conservation (conservation de biotopes notamment) et peut même s'avérer désavantageux si l'effectif des populations est trop restreint.

Au cours de cette étude, nous avons étudié six conservatoires européens, isolés (sur l'île d'Ouessant) ou non, mis en place dans des zones de forte apiculture professionnelle (en Vendée) ou dans des zones de contact naturel entre lignées M et C (en Savoie). Ainsi, nous avons regardé les différents niveaux d'introgession de chaque conservatoire potentiel puis leur diversité génétique pour pouvoir, ou non, les valider comme conservatoire d'*A. m. mellifera*.

## Conclusion

Les conservatoires étudiés présentent de manière générale, à l'exception de l'île d'Ouessant, un niveau d'introggression d'au moins 10% d'allèles importés. En considérant le nombre de locus introgressés par individu et par conservatoire, il apparaît clairement que l'hybridation entre les sous-espèces de lignées M et C sont anciennes et ne concernent plus les F1. Les plus haut taux d'introggression sont trouvés dans les zones où l'apiculture professionnelle est importante, comme en Vendée, et où les lignées M et C sont naturellement en contact, comme en Savoie.

Toutefois, ces différents conservatoires, malgré la présence d'introggression, se placent dans les branches de la lignée M, proches de populations de référence de cette même lignée. En considérant donc, que les populations étudiées présentent plus de 80% d'allèles d'*A. m. mellifera*, elles représentent un bon point de départ dans la conservation de l'Abeille Noire. Il faut maintenant limiter au maximum l'importation de colonies de sous-espèces non locales afin de conserver ce faible taux d'introggression.

Il faut aussi considérer la possibilité de conserver « l'adaptation locale », c'est-à-dire que les colonies les mieux adaptées à leur environnement seront naturellement plus sélectionnées (sélection Darwinienne). Dans ce cas également ce faible taux d'introggression ne pose pas de problème pour la conservation, et les populations considérées dans cette étude peuvent donc servir à la mise en place de conservatoires.

Néanmoins, il ressort de cette étude que des populations pures d'abeilles noires existent encore en France, comme sur l'île d'Ouessant. Leur diversité génétique est, cependant, beaucoup trop faible pour pouvoir envisager une conservation de la sous-espèce sur le long terme. Ainsi, même si les conservatoires isolés semblent, en théorie, être la meilleure alternative, la présente étude démontre les risques encourus suite à cette isolation. Pour sauver la population d'Ouessant, mise en place à partir de seulement 50 colonies différentes, il faudrait identifier d'autres populations pures d'*A. m. mellifera* afin d'apporter la diversité génétique suffisante pour palier à l'effet de fondation de cette population.

Cette étude est donc en accord avec celles réalisées précédemment (Garnery *et al.* 1998b, Jensen *et al.* 2005a, Soland-Rekeweg *et al.* 2009). La situation de l'Abeille Noire est très préoccupante en Europe, à cause notamment de l'introggression que subissent les populations

locales. Il est donc urgent d'envisager des mesures afin de limiter les imports de colonies allochtones afin de préserver au maximum cette sous-espèce.

## **Introduction**

In the whole world, among all taxa, biodiversity is tragically declining, and unless conservation programs are promptly initiated, most of the species diversity may soon be lost forever. Since the beginning of the eighties, about 30% of vertebrate populations are decreasing, and 6% of mammals, birds, amphibians and corals populations have been added to the Red List Indicator (BUTCHART *et al.* 2010).

Recent habitat changes and/or human-mediated introductions sometimes put in contact closely related but naturally allopatric species. Those species have not developed reproduction barriers, so they are able to hybridize with one another. The impact of hybridization between native and introduced species can be of major importance, and may lead to loss of native diversity (PERRY *et al.* 2002a).

These observations have mostly been made on vertebrates like American black ducks, bull trout, grey wolves or the very interesting case of red wolves which could be hybrids between grey wolves and coyotes (LEARY *et al.* 1993; MANK *et al.* 2004; LEONARD and WAYNE 2008). But, it is also the case for invertebrates (PERRY *et al.* 2002a).

Insects represent more than 50% of the known species. They are essential to most terrestrial and even some aquatic ecosystems. Among insects, *Apidae* is the most important group of pollinators. They arose in the early to mid-Cretaceous approximately 140 to 110 Mya (million years ago) and comprise nearly 20 000 described species (MICHENER 2000). Because they are the most important wild and managed agricultural pollinators (KLEIN *et al.* 2007; KREMEN *et al.* 2007), they are of very high economic importance: they are estimated to represent more than 10 billion dollars per year (DELAPLANE and MAYER 2000).

As a global trend of biodiversity, honeybees have been observed to decline in the past few years (BIESMEIJER *et al.* 2006; VANENGELSDORP *et al.* 2009). Several factors have been proposed to explain the declines in bee populations: habitat fragmentation, overexploitation, climate changes, pollution and introduced species.

The western honeybee, *Apis mellifera*, is widely spread and diversified and comprises at least 26 allopatric subspecies based on morphometrical and molecular analysis (RUTTNER 1988; SHEPPARD and MEIXNER 2003). These subspecies are clustered in four evolutionary lineages, the West-Mediterranean (M), the African (A), the North-Mediterranean (C) and the Oriental

(O) lineages (RUTNER *et al.* 1978; GARNERY *et al.* 1992; GARNERY *et al.* 1998b; GARNERY *et al.* 1998a; FRANCK *et al.* 2000b; BOUGA *et al.* 2005).

The West-Mediterranean lineage is represented by two subspecies, *Apis mellifera iberica* (*A. m. iberica*) and the black honeybee *Apis mellifera mellifera* (*A. m. mellifera*), which is the most widely distributed over Europe, from the Pyrenees to Ural (RUTTNER 1988). The distribution of this subspecies suggests a high potential of adaptation to changing environments and to specific biotopes (GARNERY *et al.* 1992; JENSEN *et al.* 2005a). *A. m. mellifera* has, therefore, characteristics that make it more suitable than any other subspecies to the climate of North-Western Europe.

Over the last decades, to face the decline of honeybee populations through Europe, beekeepers have sometimes imported non local subspecies, leading to the homogenization of the native *A. m. mellifera* populations (GARNERY *et al.* 1998b; GARNERY *et al.* 1998a; FRANCK *et al.* 2000a; DE LA RUA *et al.* 2002; JENSEN *et al.* 2005a) and to genome admixtures between these naturally well differentiated subspecies.

Non local subspecies, like *A. m. ligustica* or *A. m. carnica*, both corresponding to C lineage subspecies, but also hybrids strains, like Buckfast bees (hybrid between M and C lineages created by the beekeeper Brother Adam) were chosen because of their greater honey production, quicker spring build up, lower swarming tendency and lower defensiveness (RUTTNER 1988). Another reason to these importations is that allochthone queens are cheaper and more easily available.

Importations led to hybridization between the different subspecies, leading to introgression of *A. m. mellifera* genome by mostly *A. m. ligustica* and *A. m. carnica* alleles.

Conservation of *A. m. mellifera* is therefore important for conserving the European native biodiversity, but also to produce hybrid bees with interesting apicultural properties. These strains have been imported for productivity reasons but are not always well adapted to the local climate. Therefore, the development of the colonies occurs too early during the season and obliges the beekeeper to an artificial feeding. This specific attention is also needed during winter because of a more important consumption due to bigger populations at that time of year.

To put up with the loss of *A.m. mellifera* colonies, different black honeybee conservation centers have been started all over Europe (SICAMM Conference, 2012). Most of these conservation centers are based on breeding programs, which rely on mating apiaries. In



mating apiaries, the production of specific drones is controlled by the selection of colonies according to their haplotypes (or specific traits). The honeybees mating system is characterized by drone congregation areas (DCA) that are visited by drones from many colonies by colonies (BAUDRY *et al.* 1998; KOENIGER *et al.* 2005). So if a higher number of pure drones is produced in the mating apiary, a higher percentage of them will also be found in the DCA. Then, the probability of a virgin queen to be fertilized by pure drones, compared to drones of surrounding populations, is enhanced.

It is very common for such mating apiaries to be isolated on islands or mountain valleys (NEUMANN and MORITZ 2000; JENSEN *et al.* 2005b). But conservation centers have also been set up according to ecological traits, such as ecotypes or natural areas of admixture between different subspecies. In this case, the isolation is therefore, not possible.

In this study, we analyzed six European conservation centers. Ouessant Island is a typical isolated mating apiary. The Vendee center is close enough to the Landes to be considered as having an ecotypic preference. The Savoie center is located in a contact zone between lineages M and C. Finally, Cevennes and Belgium conservation centers show low level of introgression in the surrounding populations (GARNERY *et al.* 1998b; GARNERY *et al.* 1998a) and are located in regions where no professional beekeeper is established.

The aim of this study is therefore in the first part to quantify the amount of introgression in six different putative European conservation centers. The second part focuses on the genetic diversity in each location in order to eventually validate their efficiency as conservation centers.

## **Materials and methods**

Because of the very specific mating system of honeybees, in which virgin queens mate with drones in congregation areas (DCA), we chose to base our study on drone samples. Up to 25 000 drones aggregate in a DCA (PAGE JR and METCALF 1982). They preferentially join the closest DCA (KOENIGER *et al.* 2005), but partners have been observed to mate in up to 16km distance (PEER 1957). DCA are thus considered as panmictic units (BAUDRY *et al.* 1998) and represent the local diversity at best.

However DCA are not easy to detect and when detected, it is again difficult to sample drones because of the meteorological conditions. So when sampling directly in the DCA was not possible, we genotyped fathering drones of different colonies in each conservation center.

## **Sampling and DNA extraction**

### Direct sampling

In the Ile-de-France region, a DCA was detected less than 1km away from the experimental apiary of the conservation center.

In 2010, 183 drones were captured using a helium-filled balloon and pheromone (9-ODA) drone trap, built following (WILLIAMS 1987).

### Indirect sampling

Samples were taken in 2010, for five conservation centers, from established colonies where the queens mated in the considered area. Three to four colonies were sampled in each conservation center (Figure 1)

For each colony, 48 workers were analyzed. When the number of fathering drones was really low, 48 supplementary workers were analyzed. For one colony, only 32 workers were analyzed because of the weakness of the colony. A total of 1040 workers were analyzed.

The genotypes of the queen and the fathering drones were estimated from the genotypes of the workers, using the program Colony 1.2 (WANG 2004). The program analyzes haplo-diploid systems based on the expression of codominant genetic markers, such as DNA microsatellites. It calculates the probabilities of all possible queen genotypes, based on the observed allele frequencies in the population. For each locus, the genotype may be determined unambiguously or there may be different possibilities. When multiple genotypes were proposed, we chose the one where the probabilities were above 80%. Individuals sampled from a single generation of a population were assigned into full-sibling families. The number of full-sibling families corresponds to the number of partners that mated with the queen.

### DNA extraction

All bees were stored in 90% ethanol until processing to DNA extraction from the head. Drone DNA was extracted with a phenol-chloroform extraction, followed by ethanol precipitation (KOCHER *et al.* 1989a), modified by (GARNERY *et al.* 1993)). Worker DNA was extracted

using a 10% Chelex protocol (WALSH *et al.* 1991). The Chelex method was used because it is much faster than the phenol-chloroform one. It is therefore well adapted for the great number of workers analyzed.

### **Microsatellite analysis**

DNA samples were amplified using multiplex PCR reaction with 14 microsatellite loci: A7, A28, A113, A43, A88, Ap43, Ap55, Ap81, B24, Ap36, Ap66, Ap33, A8 and B124 (Estoup *et al.*, 1995; Franck *et al.*, 2001; Solignac *et al.* 2003). These 14 loci are considered to be independent from one another: most of them are on separate chromosomes, the smallest distance between markers on the same chromosome is 20 cM (Ap36 and Ap 66; and Ap55 and A43).

PCR was carried out in a total volume of 10  $\mu$ L, containing 5  $\mu$ L of the Platinum Multiplex 2X PCR Master mix (Applied Biosystems), 1.0  $\mu$ L of 10X primer mix and 1.0  $\mu$ L of DNA extract with 30 amplification cycles in conditions defined by the provider. PCR products were visualized by capillary electrophoresis (Applied Biosystems 3130) and sized with the internal size-standard ROX from Applied Biosystems. Fragments were scored with the software GeneMapper 4.0 (Applied Biosystems).

### **Population genetic analysis**

Genotypes of 404 drones were obtained, including the 183 drones that were sampled in the DCA.

Tests for population differentiation and pairwise  $F_{st}$  indices between conservation centers were performed using the software GenePop (RAYMOND and ROUSSET 1995). To calculate the effective number of alleles per locus and population the software GenAIEx (PEAKALL and SMOUSE 2006) was used. We chose to analyze the effective number of alleles to avoid any sampling bias. It was calculated as follow:

$$N_e = 1 / \sum p_i^2$$

where  $p_i$  is the allelic frequencies for the population.

Between conservation centers, the comparison of effective number alleles was performed using a Kruskal-Wallis test. Pairwise tests were further applied using the Mann-Whitney-Wilcoxon procedure. To reduce the likelihood of type I errors among multiple tests a Benjamini and Hochberg correction was applied (BENJAMINI and HOCHBERG 1995).

#### Genetic relationships between conservation centers and reference populations

A neighbor-joining tree was built with Populations 1.2.32 software (LANGELLA 1999) using Cavalli-Sforza and Edwards' standard distances (CAVALLI-SFORZA and EDWARDS 1967a). Bootstrap over individuals was performed using 2000 replicates. Trees were edited with Treeview v32 (PAGE 1996).

The genetic structure among the populations was further evaluated using the program Structure 2.0 (FALUSH *et al.* 2003). Simulations were run for all samples simultaneously using 500,000 burn-in steps and MCMC (Markov Chain Monte Carlo algorithm) steps. The true number of clusters ( $K$ ) was defined using the value of  $\Delta K$  as described in (EVANNO *et al.* 2005). Dispersal of the data set was also evaluated with a Principal Components Analysis (PCA) using R software v2.14.1 (RDEVELOPMENT 2011).

#### Introgression level estimation

The level of introgression into each conservation centre population was investigated using four populations of the C lineage as references (Table 1). These populations belong to *A. m. ligustica*, *A. m. carnica*, *A. m. cecropia* and *A. m. macedonica* subspecies. They were previously characterized using a morphometrical analysis and their lineage was confirmed with mitochondrial DNA marker (<http://Apiclass.mnhn.fr>). The frequency of introgressed alleles was estimated for twelve loci, for which one or several alleles seem to be diagnostic between M and C lineages (GARNERY *et al.* 1998b) (Garnery, personal communication).

The proportion of introgressed alleles (IR) in each conservation center was calculated as in (GARNERY *et al.* 1998b), by locus:

$$IR = \frac{\sum_{i \in D} p_i}{\sum_{i \in D} q_i}$$

where  $D$  is the set of diagnostic alleles at the locus,  $p_i$  and  $q_i$  are the allelic frequencies respectively in the tested and in the reference populations.

The diagnostic alleles were identified when comparing the allele frequencies at a specific locus, between C and M lineage populations. When a C haplotype population had a high frequency of one allele at a given locus, it was compared to M haplotype populations. This allele was called “putative diagnostic” if its frequency was low in the M haplotype populations.

To investigate whether the hybridization was recent or not, we estimated the number of loci exhibiting diagnostic alleles in each individual from each conservation center (Figure 2).

To see whether a particular subspecies was involved in the introgression, a Neighbor-Joining tree was built including present study samples and reference populations described in (PERRIER *et al.* 2003a). These populations are: Nord-Pas-de-Calais (*A. m. mellifera*) for the M lineage, Chalkidiki (*A. m. macedonica*), Forli (*A. m. ligustica*), Argos (*A. m. cecropia*) and Slovenia (*A. m. carnica*) for the C lineage, Tbilissi and Erevan (*A. m. caucasica*) for the O lineage and Al-Hoceima (*A. m. major*) for the A lineage. The procedure for tree building is the same as described above.

So far, no program is available to calculate distances between haploid (drone from the different conservation centers) and diploid populations (reference populations). To do so, the haploid samples were transformed in diploid homozygotes. The already diploid samples from the reference populations were doubled in order to limit the sampling bias resulting from this artificial diploidisation.

## **Results**

### **Population structure of the conservation centers**

The effective number of alleles over the 14 studied loci for the different conservation centers is presented in Figure 3.

Sample sizes were 26 in Ouessant, 35 in Vendee, 40 in Savoie, 51 in Cevennes, 69 in Belgium and 183 in Ile-de-France. The bias induced by the different sample sizes in each population was avoided by considering the effective number of alleles: mean effective number of allele is about 2 in 5 out of the 6 conservation centers analyzed. The more contrasting result is observed in Ouessant where only 1.83 effective allele is observed. This difference is however

not significant ( $0.179 < \text{Mann-Whitney-Wilcoxon P-value} < 0.220$  after Benjamini and Hochberg correction for multiple testing). The lower diversity of Ouessant sample may nevertheless reflect a real biological depletion as this conservation center was initiated from few colonies and is completely isolated.

Populations from the different conservation centers were identified as significantly different (Fisher's exact test  $\text{P-value} < 0.05$ ). Beside this overall differentiation, all pairwise differentiations between populations were also significant although multilocus  $F_{st}$  values were mostly small (Table 2). The  $F_{st}$  values indicate a slightly higher genetic proximity between Vendee and Ile-de-France populations ( $F_{st} = 0.019$ ), then Cevennes and Belgium also appear close to Vendee and Ile-de-France populations ( $F_{st}$  about 0.025). Ouessant is the most divergent population ( $0.09 < F_{st} < 0.15$ ), and Savoie is as distant of Ouessant as of any other populations ( $0.04 < F_{st} < 0.05$ ).

However, when using the program Structure and applying the method provided by Evanno *et al.* (2005), the highest probability was detected when a model assuming only one cluster was set ( $K=1$ ).

When considering a set of two clusters ( $K=2$ ) or more, the affectation of a sample to a particular group seems random. The bar plots associated indicate that samples could not be attributed to a single cluster but rather belong to different clusters with similar probability.

This observation was confirmed by a Principal Components Analysis, which shows one cluster and a few samples that differ from it (Figure 4). Furthermore, the variation depicted by the first two dimensions was only 24%, underlining the weakness of any structure.

The unrooted neighbor-joining tree based on the Cavalli-Sforza's distances between the six conservation centers (Figure 5) shows results consistent with the  $F_{st}$  analysis. Ouessant is differentiated from the other conservation centers. Then, Vendee and Ile-de-France are closer to one another than to any other population. Furthermore, the terminal branches leading to population samples are far longer than internal branches of the tree, supporting the low level of structure, even too low to be detected with Structure or PCA analysis.

## **Introgression**

Considering the 33 diagnostic alleles between M and C lineages (Table 1), the proportion of alleles showing introgression was estimated by population (for each of the conservation centers).

Table 3 shows the level of introgression, either by the C lineage in general, or by one of the four different subspecies known to be often used in beekeeping practices. So the main introgression level observed is from *A. m. ligustica*, followed by *A. m. carnica*. Congruent with this observation, those two subspecies are the most used by beekeepers, and the most imported subspecies through Europe (KAUHAUSEN-KELLER and KELLER 1994; GARNERY *et al.* 1998b; GARNERY *et al.* 1998a; JENSEN *et al.* 2005a).

The population of Ouessant shows no introgression at all. The level of introgression by C lineage alleles in the five other conservation centers varies from 9% (in Cevennes) to 20% (in Vendee). The proportions of introgression considering the different subspecies are indeed different (Kruskal-Wallis test,  $p < 0.005$  for each population, data not shown).

Considering the number of loci showing introgression in each individual of the different populations (Figure 2), the overall introgression level can be linked with the number of introgressed loci. The samples of the Cevennes population, which shows the lower level of introgression (after Ouessant), present introgression mostly on one locus. Whereas with a higher level of introgression, the samples of the Vendee population show introgression mostly on one to three loci but also on eleven and twelve loci for some samples. This bimodal distribution suggests recent events of hybridization with imported bees from C lineages. The level of introgression of Belgian and Ile-de-France populations seems to be quite close. The difference between those two conservation centers could be explained by conservation measures in place in Belgium; more likely, the impact of the number of loci studied, and the pre-existing introgression level for each conservation center should be considered.

The unrooted Neighbor joining tree based on the Cavalli-Sforza distances between populations shows that the six conservation centers are closer to the population taken as reference for the M lineage than to any other population (Figure 6). The populations from Ile-de-France, Vendee, Cevennes and Belgium are the closest ones. Then, they cluster with Savoie population and finally with Ouessant.

None of these six conservation centers are close to a C lineage population or even a hybrid Buckfast population.

## Discussion

The six conservation centers analyzed show a low level of differentiation. Despite significant Fisher's exact test for population differentiation, the  $F_{st}$  values are small. This differentiation is so small that it is not seen on the Principal Components Analysis (Figure 4).

But a differentiation was observed between isolated and non-isolated conservation centers. Ouessant Island is, indeed, the most distant population considered (Figures 5 and 6). This could be explained by a possible foundation event in the Ouessant population, where traits might have naturally been selected by inbreeding because of the isolation and now defined this population.

Among the six conservation centers studied, five have the same level of diversity (Figure 3). The case of Ouessant is really interesting. In this study, it appears clearly that in this conservation center, the level of allelic diversity is lower than any other one. This foundation event is likely due to the low number of colonies with which the conservation center was initiated (50 colonies). Even if the population size grows, the genetic diversity will stay at the same level or worse will decrease. The idea of genetic diversity decreasing is even stronger when considering the fact that some colonies may have been selected over others for specific beekeeping traits. Indeed, the haplotypes found on the island have changed according to two different studies made in 1998 and 2004 (Garnery *et al.* 1998a, Bertrand *et al.* submitted). Even if an isolated conservation center seems to be an ideal situation (JENSEN *et al.* 2005b; SOLAND-RECKEWEG *et al.* 2009), it could be a real disadvantage for long-term conservation programs. Isolated populations (by mountains, large water-bodies, geographical distances, human activities...) are more at risk of extinction than non-isolated (DAVIES *et al.* 2000). They are more subject to inbreeding depression, which, by redistributing the genotype frequencies, increase the homozygosity (LYNCH and WALSH 1998). One hypothesis to explain the inbreeding depression with an increase of homozygosity was that the homozygote state could increase the expression of deleterious recessives (KELLER and WALLER 2002). In small populations, it results in a decrease of the genetic diversity, leading to a higher difficulty for populations to evolve in response to constant environmental changes.

The lack of genetic diversity could be concerning in the future, leading to an increase in the production of diploid drones, or even population extinction if the proportion of diploid drones



is too high (ZAYED and PACKER 2005). Moreover, the loss of genetic diversity in small population decreases the evolutionary potentials. It has been shown that inbreeding depression (reduction of fitness) caused a reduction of 33% of the survivors of captive mammal offspring (FRANKHAM and RALLS 1998), and of 23% to 53% in plant species (KELLER and WALLER 2002). So far, no conservation center with low level of genetic diversity has been identified not to suffer from inbreeding depression (low level of female fecundity...).

To limit the loss of genetic diversity in such isolated populations, outbreeding should be considered. The Ouessant conservation center is typically a case where population mixing is required to restore genetic health. Honeybee populations that will be outbred must be as genetically and adaptively similar as possible. So, "pure" *A. m. mellifera* populations have to be identified in order to save the Ouessant conservation center. Nevertheless, as one isolated population will show low level of genetic diversity, and a variation typical of its geographical habitat, its usefulness to set up conservation centers may be limited. However, if other isolated *A. m. mellifera* populations are identified, more diverse conservation centers could be generated by inbreeding honeybees from different isolated places. Each isolated population is, indeed likely to preserve distinct subsets of alleles.

Previous study on mitochondrial DNA was performed on three to four colonies of each conservation center. The colonies of Savoie, Cevennes and Ouessant are of M lineage, Vendee colonies are 50% M lineage and 50% C lineage and Belgium colonies are 25% of M lineage and 75% of C lineage.

The high level of nuclear introgression compared to the mitochondrial one in the Savoie population might be due to long term equilibrium in a natural zone of contact between M and C lineages (GARNERY *et al.* 1998b).

The Ile-de-France conservation center shows similar level of mitochondrial and nuclear introgressions, about 20% (BERTRAND *et al.* submitted). This could be due to a massive importation over a short period of time (GARNERY *et al.* 1998b).

In the Belgian conservation center, the difference between mitochondrial and nuclear introgression could reflect a strong mitochondrial gene flow due to swarms escaping from professional apiaries. But, the escaped queens were inseminated in the DCA close enough to the conservation center, so that we can consider mating drones to be local. This result should be considered with caution due to the low number of colonies studied (mitochondrial analyses).

It is therefore, really important to analyze the surrounding populations of each conservation center. Those surrounding populations have to be genetically characterized. The beekeeping practices (like colony importations or swarming frequencies) also have to be well known, so the level of introgression and the risk for the conservation centers could be estimated, even if mating distances in honeybee are still not well documented.

The level of introgression of some populations found in the present study seems to have increased compared to the one observed either by Garnery *et al.* (1998a) or Perrier *et al.* (2003). Indeed, Garnery *et al.* (1998a) found about 3% of introgression in the Landes population (assimilated to the Vendee population in the present study), and Perrier *et al.* (2003) found about 15% of introgression for the same population. In this study, the Vendee population shows about 20% of introgression. The same observations were made for Belgian and Savoie populations (6% to 11% and 8% to 17%, respectively). This could be the consequence of quite recent non local queen importations by beekeepers who are known to prefer the presume honey production superiority of C lineage colonies.

According to this study, “pure” *A. m. mellifera* populations still exist in France, as in the island of Ouessant. But introgression of C lineage occurred in many areas.

The estimation of introgression was done following Garnery *et al.* (1998a). Because the real introgressing population was not identified, we used the allele frequencies of four different reference populations from the C lineage, corresponding to four subspecies (*carnica*, *cecropia*, *macedonica* and *ligustica*). But as only four different populations were used to identify diagnostic alleles, it is likely that the level of introgression is either underestimated, or overestimated in the populations. Some diagnostic alleles may have not been yet identified because only a few number of reference populations were analyzed, possibly leading to an underestimation of the level of introgression. However, random mutations may have occurred in pure M population leading to a misinterpretation concerning it lineage.

However, all diagnostic alleles represent around 80% of the diversity in the C subspecies and over the 12 loci analyzed. Consequently, this approach tends to minimize these biases.

The question of whether the conservation centers analyzed in the present study are pure enough could be asked. There is no specific answer to such a question. We support the statement of (ALLENDORF *et al.* 2001), that choosing specific management programs are more

important than defining the exact proportion of admixture acceptable. No indication about the diversity of *A. m. mellifera* before any importation is yet available. So, conservation centers that branched with reference populations of M lineage (Figure 6), with about 80% to 90% of *A. m. mellifera* alleles are a good start for management programs. Furthermore, the markers used in this study are neutral ones. They show every kind of neutral introgression. Identifying specific genes of local adaptation, and so with traits characteristics of *A. m. mellifera* will allow a better estimation of the level of non local introgression. It would be interesting to study the impact of natural selection on these genes related to local adaptation. The number of pure *A. m. mellifera* populations is so small that little hybridized populations are of great value for conservation and restoration. But importation of non-local queens or colonies must be stopped in order to keep this hybridization at a low level. The status of *A. m. mellifera* subspecies is for many reasons, very concerning. The remaining “pure populations” should be given the status of endangered subspecies.

## **References**

- ALLENDORF, F. W., R. F. LEARY, P. SPRUELL and J. K. WENBURG, 2001 The problems with hybrids: setting conservation guidelines, pp. 613-622. Elsevier.
- BAUDRY, E., M. SOLIGNAC, L. GARNERY, M. GRIES, J. CORNUET *et al.*, 1998 Relatedness among honeybees (*Apis mellifera*) of a drone congregation. Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences **265**: 2009-2014.
- BENJAMINI, Y., and Y. HOCHBERG, 1995 Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological) **57**: 289-300.
- BERTRAND, B., S. MOULIN, H. LEGOUT, F. MOUGEL, M. ALBURAKI *et al.*, submitted The Use of Mitochondrial Markers for The Conservation of Honeybee Populations (*Apis mellifera*, L.): An Applied Approach. PLoS One.
- BIESMEIJER, J. C., S. P. ROBERTS, M. REEMER, R. OHLEMULLER, M. EDWARDS *et al.*, 2006 Parallel declines in pollinators and insect-pollinated plants in Britain and the Netherlands. Science **313**: 351-354.
- BOUGA, M., P. C. HARIZANIS, G. KILIAS and S. ALAHIOTIS, 2005 Genetic divergence and phylogenetic relationships of honey bee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) populations from Greece and Cyprus using PCR-RFLP analysis of three mtDNA segments, pp. 335. EDP SCIENCES.
- BUTCHART, S. H. M., M. WALPOLE, B. COLLEN, A. VAN STRIEN, J. P. W. SCHARLEMANN *et al.*, 2010 Global Biodiversity: Indicators of Recent Declines, pp. 1164-1168. Science.
- CAVALLI-SFORZA, L. L., and A. W. EDWARDS, 1967 Phylogenetic analysis. Models and estimation procedures. Am J Hum Genet **19**: 233-257.
- DAVIES, K. F., C. R. MARGULES and J. F. LAWRENCE, 2000 Which traits of species predict population declines in experimental forest fragments? Ecology **81**: 1450-1461.
- DE LA RUA, P., J. SERRANO and J. GALIAN, 2002 Biodiversity of *Apis mellifera* populations from Tenerife (Canary Islands) and hybridisation with East European races, pp. 59-67. Springer.

- DELAPLANE, K. S., and D. F. MAYER, 2000 *Crop pollination by bees*. Cabi.
- EVANNO, G., S. REGNAUT and J. GOUDET, 2005 Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study, pp. 2611-2620. Wiley Online Library.
- FALUSH, D., M. STEPHENS and J. K. PRITCHARD, 2003 Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies, pp. 1567-1587. Genetics Soc America.
- FRANCK, P., L. GARNERY, G. CELEBRANO, M. SOLIGNAC and J. M. CORNUET, 2000a Hybrid origins of honeybees from Italy (*Apis mellifera ligustica*) and Sicily (*A. m. sicula*), pp. 907-921. Wiley Online Library.
- FRANCK, P., L. GARNERY, M. SOLIGNAC and J.-M. CORNUET, 2000b Molecular confirmation of a fourth lineage in honeybees from the Near East. *Apidologie* **31**: 167-180.
- FRANKHAM, R., and K. RALLS, 1998 Conservation biology: inbreeding leads to extinction. *Nature* **392**: 441-442.
- GARNERY, L., J. M. CORNUET and M. SOLIGNAC, 1992 Evolutionary history of the honey bee *Apis mellifera* inferred from mitochondrial DNA analysis, pp. 145-154. Wiley Online Library.
- GARNERY, L., P. FRANCK, E. BAUDRY, D. VAUTRIN, J.-M. CORNUET *et al.*, 1998a Genetic diversity of the west European honey bee (*Apis mellifera mellifera* and *A. m. iberica*) I. Mitochondrial DNA. *Genet. Sel. Evol.* **30**, pp. S31-S48.
- GARNERY, L., P. FRANCK, E. BAUDRY, D. VAUTRIN, J.-M. CORNUET *et al.*, 1998b Genetic diversity of the west European honey bee (*Apis mellifera mellifera* and *A. m. iberica*) II. Microsatellite loci. *Genet. Sel. Evol.* **30**, pp. S49-S74.
- GARNERY, L., M. SOLIGNAC, G. CELEBRANO and J. M. CORNUET, 1993 A simple test using restricted PCR-amplified mitochondrial DNA to study the genetic structure of *Apis mellifera* L. *Experientia* **49**: 1016-1021.
- JENSEN, A. B., K. A. PALMER, J. J. BOOMSMA and B. V. PEDERSEN, 2005a Varying degrees of *Apis mellifera ligustica* introgression in protected populations of the black honeybee, *Apis mellifera mellifera*, in northwest Europe. *Molecular Ecology* **14**: 93-106.
- JENSEN, A. B., K. A. PALMER, N. CHALINE, N. E. RAINE, A. TOFILSKI *et al.*, 2005b Quantifying honey bee mating range and isolation in semi-isolated valleys by DNA microsatellite paternity analysis, pp. 527-537. Springer.
- KAUHAUSEN-KELLER, D., and R. KELLER, 1994 Morphometrical control of pure race breeding in the honeybee (*Apis mellifera* L), pp. 133-143.
- KELLER, L. F., and D. M. WALLER, 2002 Inbreeding effects in wild populations. *Trends in Ecology & Evolution* **17**: 230-241.
- KLEIN, A.-M., B. E. VAISSIERE, J. H. CANE, I. STEFFAN-DEWENTER, S. A. CUNNINGHAM *et al.*, 2007 Importance of pollinators in changing landscapes for world crops, pp. 303-313. The Royal Society.
- KOCHER, T. D., W. K. THOMAS, A. MEYER, S. V. EDWARDS, S. Pääbo *et al.*, 1989 Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **86**: 6196-6200.
- KOENIGER, N., G. KOENIGER and H. PECHHACKER, 2005 The nearer the better? Drones (*Apis mellifera*) prefer nearer drone congregation areas, pp. 31-35. Springer.
- KREMEN, C., N. M. WILLIAMS, M. A. AIZEN, B. GEMMILL, H. HERREN, G. LEBUHN *et al.*, 2007 Pollination and other ecosystem services produced by mobile organisms: A conceptual framework for the effects of land use change, pp. 299-314. Wiley Online Library.
- LANGELLA, O., 1999 Populations 1.2. 30: a population genetic software. CNRS UPR9034, pp.

- LEARY, R. F., F. W. ALLENDORF and S. H. FORBES, 1993 Conservation genetics of bull trout in the Columbia and Klamath River drainages. *Conservation Biology* **7**: 856-865.
- LEONARD, J. A., and R. K. WAYNE, 2008 Native Great Lakes wolves were not restored, pp. 95-98.
- LYNCH, M., and B. WALSH, 1998 *Genetics and analysis of quantitative traits*.
- MANK, J. E., J. E. CARLSON and M. C. BRITTINGHAM, 2004 A century of hybridization: decreasing genetic distance between American black ducks and mallards. *Conservation Genetics* **5**: 395-403.
- MICHENER, C. D., 2000 *The bees of the world*. JHU Press.
- NEUMANN, P., and R. F. A. MORITZ, 2000 Testing genetic variance hypotheses for the evolution of polyandry in the honeybee (*Apis mellifera* L.), pp. 271-279. Springer.
- PAGE JR, R. E., and R. A. METCALF, 1982 Multiple mating, sperm utilization, and social evolution, pp. 263-281. JSTOR.
- PAGE, R. D. M., 1996 Tree View: An application to display phylogenetic trees on personal computers, pp. 357-358. Oxford Univ Press.
- PEAKALL, R. O. D., and P. E. SMOUSE, 2006 GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research, pp. 288-295. Wiley Online Library.
- PEER, D. F., 1957 Further Studies on the Mating Range of the Honey Bee, *Apis mellifera* L, pp. 108-110. Cambridge Univ Press.
- PERRIER, C., J. STRANGE, O. LANGELLA, W. S. SHEPPARD and L. GARNERY, 2003 Diversité génétique, introgressions mitochondriales et nucléaires dans une population d'abeilles des Landes de Gascogne, pp. 79-100.
- PERRY, W. L., D. M. LODGE and J. L. FEDER, 2002 Importance of Hybridization Between Indigenous and Nonindigenous Freshwater Species: An Overlooked Threat to North American Biodiversity, pp. 255-275.
- RAYMOND, M., and F. O. ROUSSET, 1995 GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism, pp. 248-249. Am Genetic Assoc.
- RDEVELOPMENT, C. T., 2011 R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, pp. 3-900051.
- RUTNER, F., I. TASSENCOURT and J. LOUVEAUX, 1978 Biometrical-statistical analysis of the geographic variability of *Apis mellifera* L, pp. 363-381.
- RUTTNER, F., 1988 *Biogeography and taxonomy of honeybees*. Springer-Verlag, Berlin.
- SHEPPARD, W. S., and M. D. MEIXNER, 2003 *Apis mellifera pomonella*, a new honey bee subspecies from Central Asia, pp. 367-376. EDP SCIENCES.
- SOLAND-RECKEWEG, G., G. HECKEL, P. NEUMANN, P. FLURI and L. EXCOFFIER, 2009 Gene flow in admixed populations and implications for the conservation of the Western honeybee, *Apis mellifera*. *Journal of Insect Conservation* **13**: 317-328.
- VANENGELSDORP, D., J. D. EVANS, C. SAEGERMAN, C. MULLIN, E. HAUBRUGE *et al.*, 2009 Colony collapse disorder: a descriptive study. *PLoS One* **4**: e6481.
- WALSH, P. S., D. A. METZGER and R. HIGUCHI, 1991 Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *BioTechniques* **10**: 506-513.
- WANG, J., 2004 Sibship reconstruction from genetic data with typing errors, pp. 1963-1979. Genetics Soc America.
- WILLIAMS, J., 1987 Wind-directed pheromone trap for drone honey bees (Hyme, optera : Apidae). *Journal of economic entomology* **80**: 532-536.

ZAYED, A., and L. PACKER, 2005 Complementary sex determination substantially increases extinction proneness of haplodiploid populations, pp. 10742-10746. National Acad Sciences.

## Tables

Table 1: Diagnostic allele frequencies in reference populations

Locus	Diagnostic Alleles	Diagnostic alleles frequency in reference populations				
		macedonica	cecropia	carnica	ligustica	C lineage
A43	127	0,083	NA	0,082	0,1	
A43	141	0,85	0,816	0,731	0,633	
		<b>0,933</b>	<b>0,816</b>	<b>0,813</b>	<b>0,733</b>	<b>0,82</b>
A88	152	0,133	0,51	0,066	0,067	
A88	154	0,6	0,408	0,835	0,9	
		<b>0,733</b>	<b>0,918</b>	<b>0,901</b>	<b>0,967</b>	<b>0,89</b>
B24	106	0,467	0,245	0,462	0,35	
B24	108	0,517	0,735	0,423	0,517	
		<b>0,983</b>	<b>0,98</b>	<b>0,885</b>	<b>0,867</b>	<b>0,92</b>
A8	158	0,35	0,184	0,011	NA	
A8	160	0,333	0,592	0,571	0,233	
A8	162	0,117	0,092	0,104	0,5	
A8	164	0,083	0,071	0,198	0,117	
A8	166	0,017	0,01	0,022	NA	
		<b>0,9</b>	<b>0,949</b>	<b>0,907</b>	<b>0,85</b>	<b>0,908</b>
A113	214	0,767	0,827	0,736	0,317	
		<b>0,767</b>	<b>0,827</b>	<b>0,736</b>	<b>0,317</b>	<b>0,7</b>
AP43	143	0,267	0,224	0,352	0,05	
AP43	145	0,45	0,367	0,434	0,617	
AP43	147	0,05	0,082	0,082	0,15	
		<b>0,767</b>	<b>0,673</b>	<b>0,868</b>	<b>0,817</b>	<b>0,798</b>
A28	138	0,883	0,929	0,857	0,967	
		<b>0,883</b>	<b>0,929</b>	<b>0,857</b>	<b>0,967</b>	<b>0,895</b>
A7	116	0,517	0,633	0,445	0,15	
A7	118	0,133	0,184	0,192	0,267	
A7	120	0,017	NA	0,049	0,067	
A7	122	0,033	NA	NA	0,05	
A7	123	0,017	NA	NA	NA	
A7	126	0,05	NA	0,005	NA	
A7	130	0,05	NA	NA	NA	
A7	132	0,017	NA	0,005	NA	
A7	135	NA	NA	NA	NA	
A7	137	NA	NA	NA	NA	
A7	142	0,017	NA	NA	NA	
A7	156	NA	NA	NA	NA	
		<b>0,85</b>	<b>0,816</b>	<b>0,698</b>	<b>0,533</b>	<b>0,725</b>
AP36	125	0,817	0,898	0,72	0,483	
		<b>0,817</b>	<b>0,898</b>	<b>0,72</b>	<b>0,483</b>	<b>0,743</b>
AP55	173	0,583	0,306	0,247	0,15	
AP55	175	0,367	0,602	0,456	0,1	
		<b>0,95</b>	<b>0,908</b>	<b>0,703</b>	<b>0,25</b>	<b>0,722</b>
AP81	136	0,967	0,878	0,89	0,683	
		<b>0,967</b>	<b>0,878</b>	<b>0,89</b>	<b>0,683</b>	<b>0,867</b>
AP66	94	0,733	0,867	0,896	0,983	
		<b>0,733</b>	<b>0,867</b>	<b>0,896</b>	<b>0,983</b>	<b>0,878</b>

Table 2: Pairwise Fst values between the six conservation centers

Populations	Cevennes	Vendee	Savoie	Ouessant	Belgium
Vendee	0.0224				
Savoie	0.0402	0.0429			
Ouessant	0.0916	0.1176	0.1529		
Belgium	0.0409	0.0271	0.0525	0.1204	
Ile-de-France	0.0346	0.0194	0.0540	0.1143	0.0276

Table 3: Introgression level of the 6 conservation centers calculated from allele frequencies of 5 populations belonging to lineage C or from an admixture of them (Total). Values indicated are the mean calculated on 12 out of the 14 loci analysed and the standard error.

Populations	macedonica	cecropia	carnica	ligustica	Total
Belgium	0.113 ± 0.076	0.11 ± 0.075	0.114 ± 0.08	0.130 ± 0.1	0.114 ± 0.078
Cevennes	0.095 ± 0.065	0.095 ± 0.067	0.1 ± 0.073	0.121 ± 0.073	0.099 ± 0.07
Ouessant	0	0	0	0	0
Savoie	0.168 ± 0.139	0.162 ± 0.133	0.174 ± 0.144	0.223 ± 0.201	0.174 ± 0.143
Vendee	0.196 ± 0.053	0.192 ± 0.05	0.201 ± 0.038	0.270 ± 0.126	0.202 ± 0.041
Ile-de-France	0.154 ± 0.081	0.151 ± 0.073	0.16 ± 0.083	0.224 ± 0.214	0.16 ± 0.08

## Figures

Figure 1: Location of the various conservation centers mentioned in this study

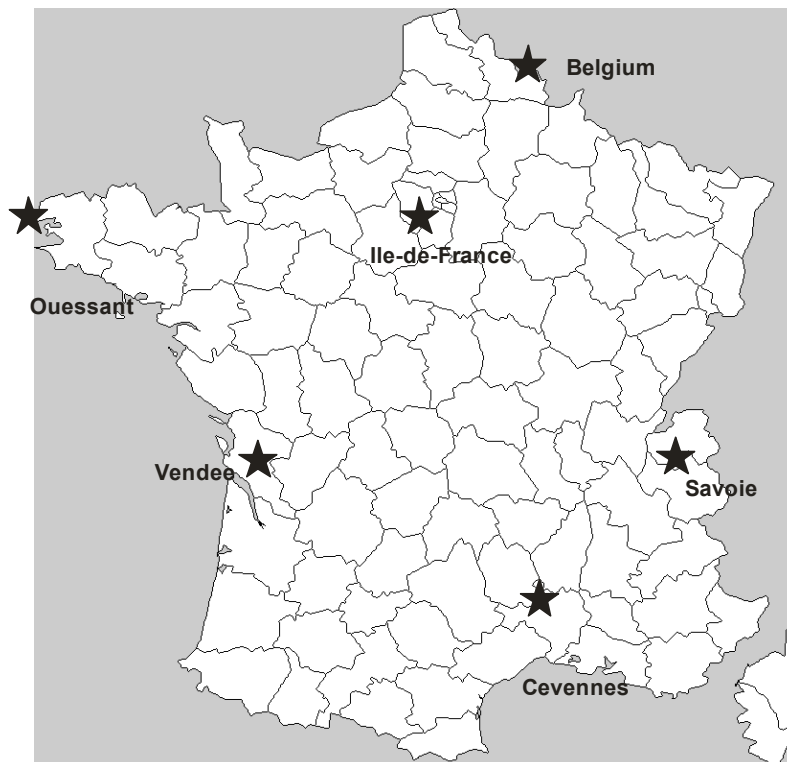




Figure 2: Number of loci exhibiting diagnostic alleles (x-axis) in each individual (y-axis) from each conservation center

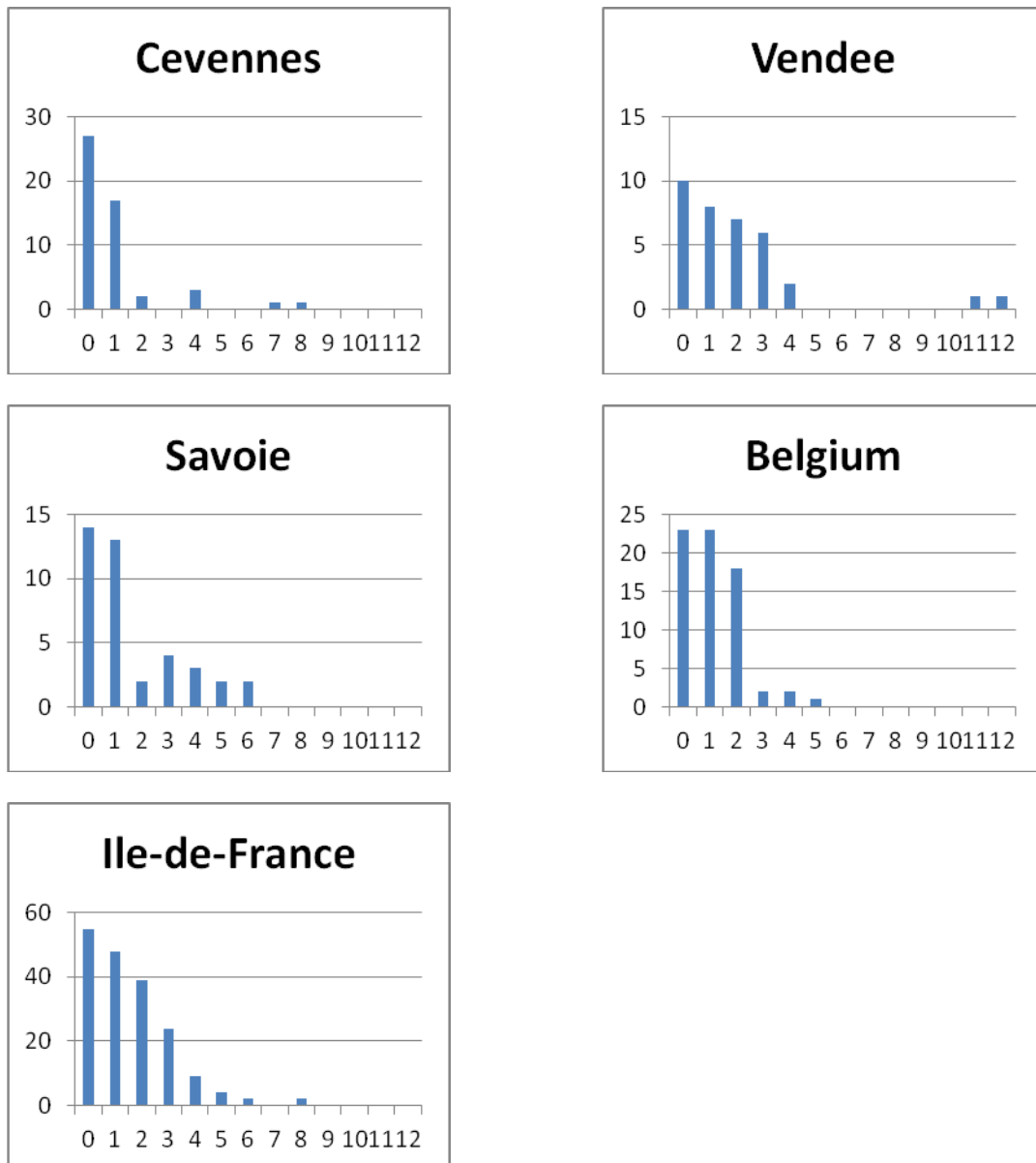


Figure 3: Effective number of alleles in six conservation centers: Belgium (BEL), Cevennes (CE), Ile-de-France (DCR), Ouessant (OUES), Savoie (SA) and Vendee (VEN).

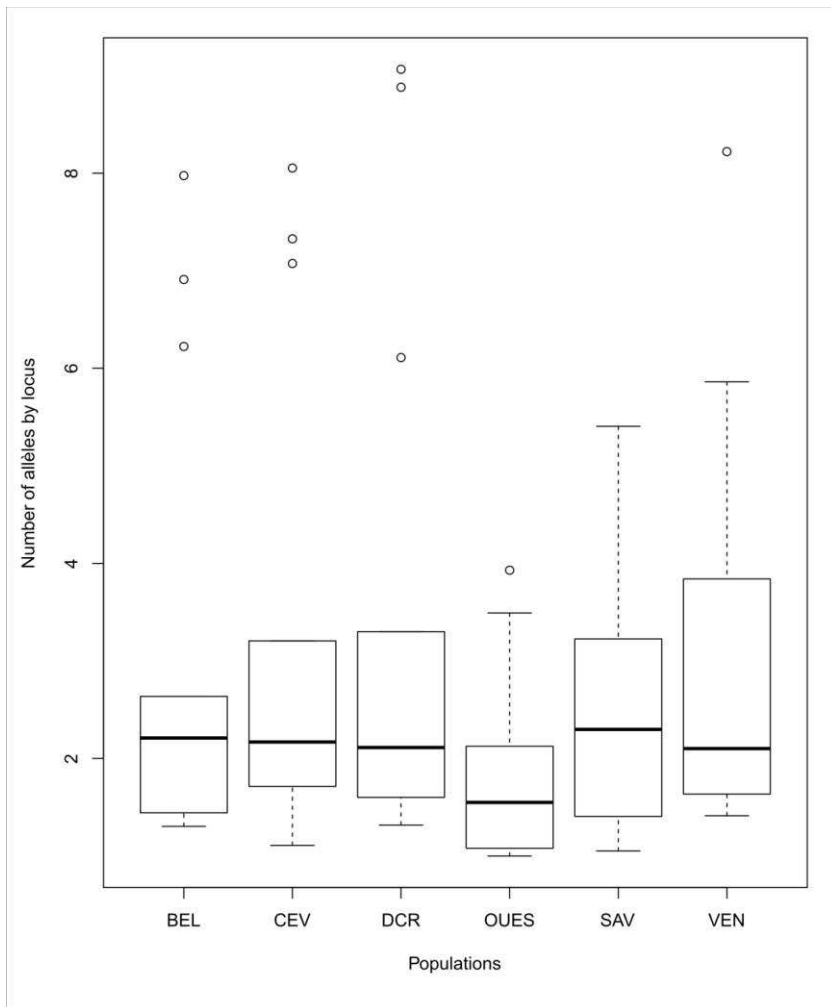




Figure 5: Unrooted neighbor-joining tree based on Cavalli-Sforza's distances between populations. The six European conservation centers are presented.

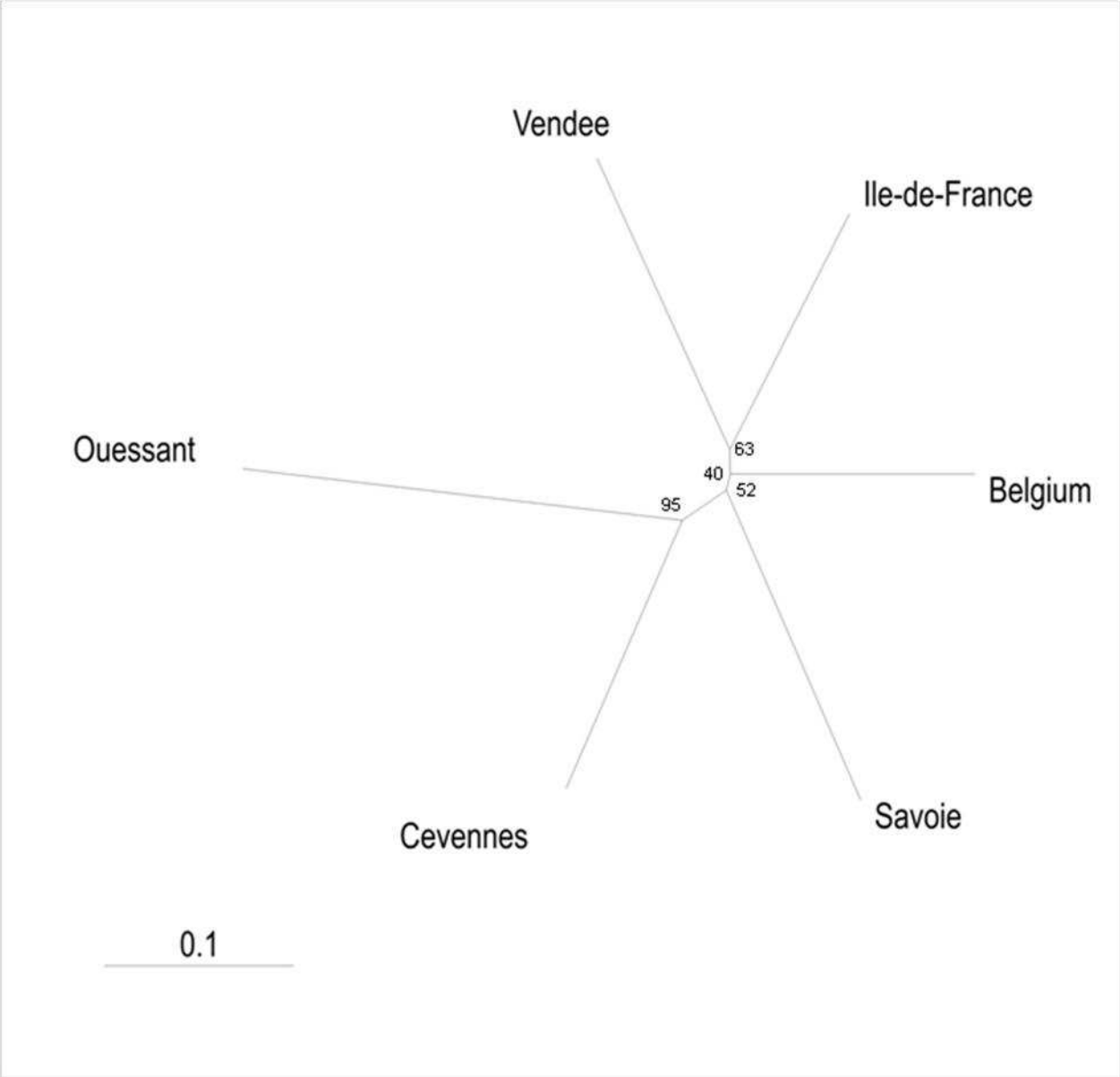
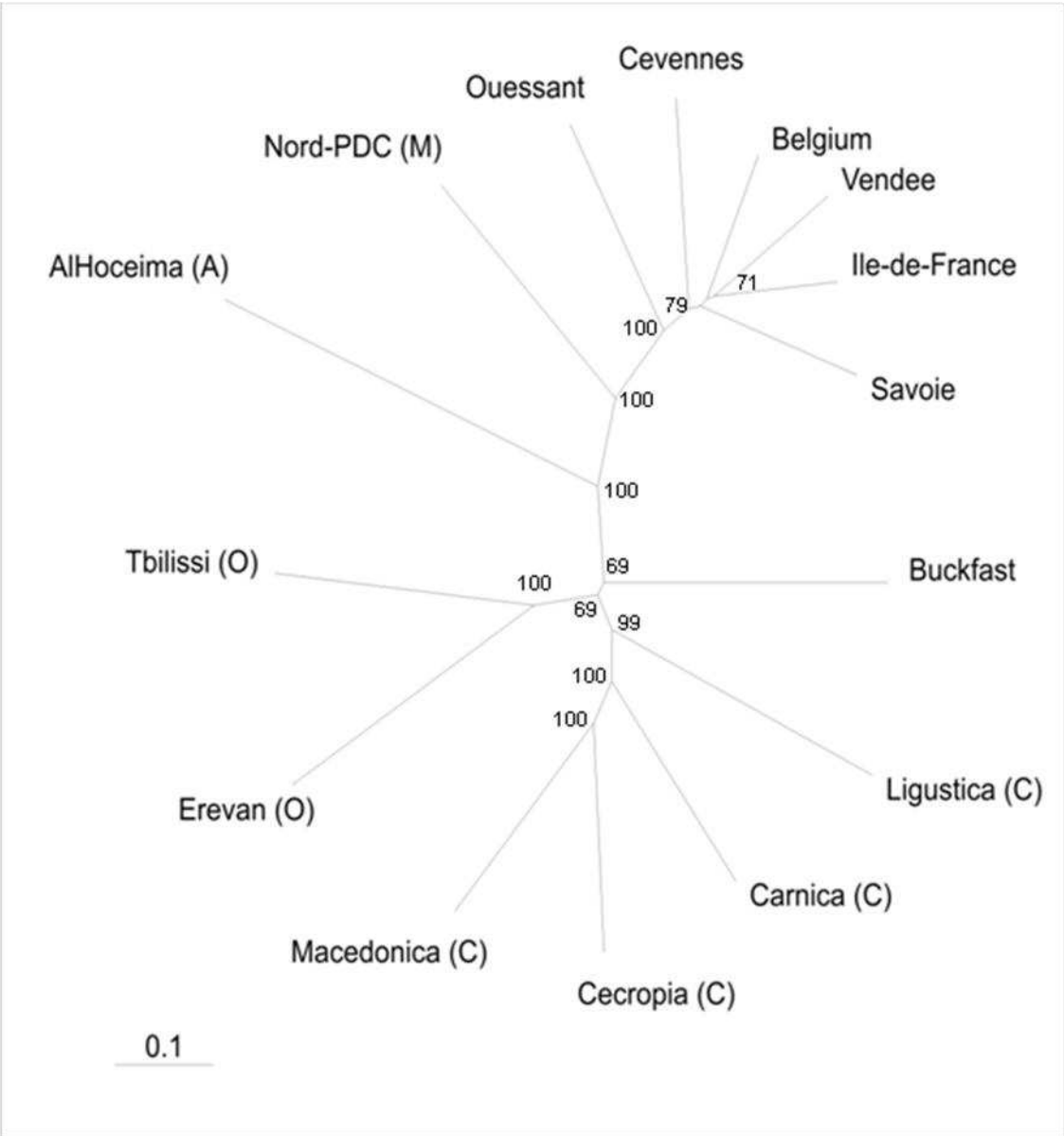


Figure 6: Unrooted neighbor-joining tree based on Cavalli-Sforza's distances between populations. The six European conservation centers and reference populations for each lineage are presented.



# PARTIE 2

## The Use of Mitochondrial Markers for The Conservation of Honeybee Populations (*Apis mellifera*, L.): An Applied Approach

Soumis à PLoS ONE le 13 mars 2013

## **Introduction**

Au cours des dernières décennies, les sous-espèces d'abeilles mellifères ont été affectées par l'activité humaine en Europe. L'importation de sous-espèces non locales a eu un impact sur la structure géographique de l'Abeille Noire (*Apis mellifera mellifera*, *A. m. mellifera*), décrit comme phénomène d'introgession. Afin de restaurer la diversité originelle de la sous-espèce locale, différents conservatoires se sont mis en place en Europe. Il n'existe, à ce jour, aucun protocole décrivant cette mise en place. Pour répondre à cette lacune, nous utilisé des marqueurs de l'ADN mitochondrial (ADNmt) comme indicateur de la diversité. L'ADNmt a la particularité d'être exclusivement transmis par la lignée maternelle. Chaque individu d'une même colonie sera donc caractérisé par le même ADNmt.

Nous avons, ainsi, estimé la proportion de colonies non locales dans une partie de la région Ile-de-France. Nous avons également suivi sur trois années consécutives un conservatoire d'abeilles noires (CANIF) ainsi qu'une congrégation de mâles identifiée dans ce conservatoire. L'étude simultanée des colonies du conservatoire, des populations autour du conservatoire et les mâles de la congrégation a permis d'estimer les flux de gènes entre les différentes populations et ainsi estimer l'efficacité des efforts de conservation.

## Conclusion

Cette étude a permis de mettre en évidence l'augmentation du nombre de colonies non locales au cours des quinze dernières années. En effet, une étude réalisée en 1998 avait estimé que 50% des colonies étaient de lignées importées (Garnery *et al.* 1998a), contre plus de 60% dans cette analyse.

Toutefois l'efficacité de la conservation est confirmée. Les colonies du conservatoire ainsi que les faux-bourdon de la congrégation ont des profils haplotypiques similaires, différents des haplotypes des colonies autour du conservatoire. Le nombre d'individus ayant des haplotypes spécifiques de sous-espèces importées est également plus faible dans le conservatoire et dans la congrégation (22% et 23% respectivement).

Ce protocole est applicable aux autres sous-espèces d'abeilles dans la mise en place de conservatoires. Néanmoins, l'utilisation de l'ADNmt uniquement possède certaines limites. Cette technique ne renseigne que sur la lignée maternelle de la colonie (ou de l'individu) et ne donne par conséquent pas de réelle estimation de l'introgession. De même, l'hybridation entre différentes lignées ou sous-espèces ne peut pas être estimée. Par exemple, une abeille portant un haplotype de la lignée M sera considérée comme *A. m. mellifera*, alors que son ADN nucléaire pourrait être, suite à de nombreux croisements avec des mâles de lignée C, être pur *A. m. ligustica*. Cette colonie serait alors à tort conservée suite à l'unique analyse de marqueurs mitochondriaux. Enfin, l'ADNmt ne renseigne pas sur la diversité génétique d'une colonie ou d'une population. En ne sélectionnant des colonies que selon leurs haplotypes, un impact majeur sur la diversité nucléaire peut intervenir, résultant en la perte de diversité nécessaire pour le maintien de la population. Il est donc recommandé de coupler des études de l'ADNmt avec des marqueurs nucléaires pour une meilleure efficacité de conservation.



## **Title / Running title**

### **The Use of Mitochondrial Markers for The Conservation of Honeybee Populations (*Apis mellifera*, L.): An Applied Approach**

#### Authors

Bénédicte Bertrand<sup>1,2</sup>, Sibyle Moulin<sup>1</sup>, Hélène Legout<sup>1</sup>, Florence Mougel<sup>1,2</sup>, Mohamed Alburaki<sup>1,3</sup>, Lionel Garnery<sup>1,4</sup>

#### Address

1. Laboratoire Evolution Génomes et Spéciation, CNRS, UPR 9034, 91190 Gif-sur-Yvette, France

2. Université Paris-Sud XI, 91405 Orsay, France

3. present address : Université Laval, Institut de Biologie Intégrative et des Systèmes (IBIS), G1V 0A6, Québec QC, Canada

4. Université de Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines, 78035 Versailles, France

#### Corresponding author

Benedicte.bertrand@legs.cnrs-gif.fr

## **Abstract**

Over the last decades, the honeybee subspecies have been affected by human activities in Europe. Importations of non-local subspecies had an impact on the geographical structure of the black honeybee (*Apis mellifera mellifera*), described as introgression. In order to restore the original diversity of this local honeybee, different conservation centers were set up in Europe. So far, no common protocol of this setup has ever been provided. To do so, we used mitochondrial markers (restriction fragment length polymorphisms of the intergenic COI-COII region) as the indicator of the honeybee diversity. In the present study, we assess the proportion of introgressed colonies in the French Ile-de-France region. We also studied during three years the colonies of a black honeybee conservation center and a drone congregation area found within, to estimate the gene flows between the conservation center and the surrounding populations. We show that the proportion of introgressed colonies in the French Ile-de-France region increased for the past fifteen years, up to an actual 61%. Nevertheless, the efficiency of the conservation setup protocol was confirmed. Indeed, colonies of the conservation center and drones from the congregation show similar profiles compared to the surrounding populations and a lower level of introgression (about 22% for the conservation center, and about 23% for the congregation). Even if we used *Apis mellifera mellifera* in this study, the protocol we used can easily be applied to other honeybee species to set up conservation centres.

### Key words

Honeybee, conservation center, *Apis mellifera mellifera*, drone, Drone Congregation Area, COI-COII.

## **Introduction**

Human expansion and activities have a great impact on the geographic range, demography and genetic diversity of many species. The most striking influence of humans exerted on wildlife concerns the domestication process. Beside spectacular phenotypic variation, domestication also caused a reduction in the genetic diversity of many species [1-2].

This situation also applies to insects such as the honeybee, *Apis mellifera* (Linné, 1758). Even if the honeybee has not been truly domesticated (according to the definition of the domestication given by Jean-Denis Vigne [3]), it has a very long relationship with humans, at least since 7000 BC [4]. The human control over honeybees includes managing reproduction, sanitary control but also importation/exportation of colonies.

The honeybee native range used to cover Africa, Europe, and central Asia [5]. Based on its morphology and confirmed by molecular approaches, *Apis mellifera* has been divided in 26 geographical subspecies [5-6] and grouped into four evolutionary lineages M (West-Mediterranean), A (African), C (North-Mediterranean) and O (Oriental) [5-7-8-9-10-11].

The European M lineage consists of two subspecies *Apis mellifera iberica* (*A.m. iberica*) and *Apis mellifera mellifera* (*A.m. mellifera*). The latter, also called the black honeybee, was, until the end of the 19<sup>th</sup> century, the most widely distributed subspecies over Europe, from the French Pyrenees to the Ural [5]. This distribution suggests an ability to withstand various environmental conditions, including a wide range of temperatures and altitudes.

*A.m. mellifera* is characterized by rustic traits, such as being good pollen and propolis collector, able to fly for long distances and with longer lifetime expectancy [12-13]. Those traits explain the interest of this subspecies for scientific studies, conservation and apicultural applications.

Since the beginning of the 20<sup>th</sup> century, importations of non local honeybees occurred throughout Western Europe. Subspecies like *A.m. ligustica* or *A.m. carnica* were introduced in Northwest Europe for their apicultural qualities (such as calmness or intensity of their foraging activity). As a consequence, *A.m. mellifera* was replaced by *A.m. carnica* in Germany [14] and by *A.m. ligustica* in Denmark [15-16]. In other parts of Europe, considering the fact that introduced subspecies are more capable to survive in agricultural

landscapes than the native one, the distribution range and consequently the proportion of *A.m. mellifera* is likely reduced [16-17-18-19].

Over the last decades, large declines in honeybee populations were observed in Europe and North America, often due to diseases [20-21]. To compensate these fall outs, massive importations of foreign colonies increased. Furthermore, genetic background of local honeybee was progressively mixed with that of imported bees, a phenomenon described as introgression. Combining importations for apicultural facilities and for the colony losses compensation, the status of the black honeybee, *A.m. mellifera*, is nowadays worrying.

To limit the effects of foreign colonies introduction in France, we started an *A. m. mellifera* conservation center near Paris called CANIF (Conservatoire de l’Abeille Noire d’Ile de France). To set up our black honeybee colonies, we selected a region where no professional beekeeper is established.

Honeybees have a very complex mating system in which drones and virgin queens meet at drone congregation areas (DCA) to mate in mid-air [22-23]. Drones assembled in a DCA are issued from surrounding colonies and therefore represent the diversity of a whole population. The congregation area has been considered as a panmictic structure for honeybee reproduction [24]. As a consequence, it is necessary to understand their spatial and temporal structures to elaborate key strategies for the conservation of honeybee populations. The aim of this study was to develop and test a protocol for *in situ* conservation of a honeybee population regarding (i) the putative influence of the surrounding populations, (ii) the conservation center set up and (iii) the temporal composition of a DCA located within the conservation center, in order to estimate the risks of future introgressions of the conservation center by drones. To do so, we chose to use mtDNA as the easiest way to differentiate the various lineages.

## **Materials and methods**

### **Ethics statements**

The owners of the lands gave permission to conduct the study on the sites. No specific permissions were required for these locations considering the fact that they were private properties and that the owners gave their permissions. The field studies did not involve endangered or protected species.

## **Sampling**

### **Surrounding populations**

In order to determine the proportion of introgressed haplotypes in the populations around the conservation center, we sampled 283 colonies located in eleven different known apiaries, surrounding the conservation center (Figure 1, Table 1). One worker of each of those colonies was used to characterize their mtDNA origin.

### **Colonies from the conservation center**

The conservation center (CANIF) is located 40km South West of Paris in the Rambouillet forest (Figure 1). It has been initiated in 2005, with fifteen local colonies. From 2005 to 2008, the number of colonies was increased by dividing the original colonies and by catching feral swarms. During the summers of 2008 and 2009, nineteen colonies from four different French conservation centers and a Belgian one were added to the existing apiary (Table 1), in order to enlarge the local conservation center.

So far, the lack of differences in either nuclear DNA or morphological analyzes allow us to consider only one subpopulation in the M lineage [25-26]. It was thus possible to set up those colonies in the Ile-de-France region.

Sampling was done on all the managed colonies of the conservation center. In 2010, the conservation center counted 74 colonies, 90 in 2011 and 143 in 2012 (Table 1). As for the surrounding population, one worker of each colony was used to characterize the mtDNA origin of the colonies.

### **The DCA**

Previously, a DCA has been observed close to the conservation center. It was located in the middle of the forest, a few hundred meters from the two main apiaries of the CANIF. Drones were captured using a helium-filled balloon and pheromone (9-ODA) drone trap, built after Williams [27]. A total of 497 drones were sampled between 2010 and 2012 in the DCA. 183 drones were sampled in 2010, 96 in 2011 and 218 in 2012 (Table1). For each considered year, we sampled twice (early and late samplings), in May and June in 2010 and in June and July in 2011 and 2012.

### **mtDNA analysis**

All bees (workers and drones) were stored in 90% ethanol until DNA extraction. DNA was extracted from bee heads with a phenol-chloroform extraction, followed by ethanol precipitation for the drones [28-29]. Worker DNA was extracted using a 10% Chelex protocol [30].

The COI-COII intergenic region was amplified by PCR (Polymerase Chain Reaction) with the primers E2 and H2 [29]. The size of the amplified DNA fragments was determined with 1  $\mu$ l of the PCR product loaded on a 1.4% agarose gel, and the haplotypes were determined on a 7.5% polyacrylamide gel after *DraI* digestion of PCR products. The *DraI*-test is an easy method to distinguish the *A. mellifera* lineages and haplotypes. It has often been used to study the variability of honeybee populations [16-29-31]. The haplotypes obtained were compared with the ones published by Rortais *et al.* [31] for the M populations, and by Garnery *et al.* [29] for the C populations.

The same analysis was performed for each drone captured in the DCA. We also analyzed most of the known colonies surrounding the conservation center (Table1).

### **Drone brood production**

In order to estimate the quantity of drones produced by the colonies, pictures of the frames were taken every two weeks for each colony. This experiment was done from March to September in 2010 and 2011, on a set of respectively 24 and 43 colonies from the CANIF apiaries. The number of drone brood cells was counted manually using the Image J software [32].

A Kruskal-Wallis test was performed in order to see if there was an effect of haplotype in the drone production in 2010 and in 2011.

The possible link between the various haplotypes found in the DCA during the two different samplings (early and late) and the various percentages of haplotypes in the production, twelve to forty-six days before, was also considered. This time frame was chosen to apprehend at best the quantity of drone produced, knowing the time needed between the capping and the full maturation of drones [33].

To see if a homogeneous pattern can be observed, the drone brood production was compared to the type of drones found in the DCA with a Fisher exact test.

For each colony, the evolution of the production of drones was compared between 2010 and 2011.

### **Statistical analyses**

Population differentiation based on haplotype frequencies was analyzed with Fisher Exact tests. Programs included in the software R were used for these calculations [34]. This software was also used to do a Correspondence Analysis on the lineages of the CANIF the DCA and the surrounding bees.

## **Results**

### **Mitochondrial structure of the surrounding populations**

A total of 17 different haplotypes, belonging to three evolutionary lineages, were observed (Table 1, Figures 2 and 3) in the 283 surrounding colonies. Among these, 39% belonged to the M lineage with nine different haplotypes, 50% to the C lineage with three haplotypes and 11% to the A lineage with five haplotypes.

Within the M group, there was a large majority of M4 haplotype (48%), followed by M7 and M4' haplotypes (respectively 21% and 10%). Other haplotypes, such as M17 and M21', were observed at lower frequencies (Table 1).

### **Mitochondrial structure of the conservation center**

In the conservation center, the frequencies of M lineage haplotypes are 74%, 76% and 84% respectively in 2010, 2011 and 2012. For the same period, proportions of C lineage haplotypes are 26%, 24% and 16% (Table 1, Figure 2).

Within the M lineage, a large majority of M4 can be observed (62%, 60% and 58%) followed by haplotypes M17, M4', M8, M28 and M51. Other haplotypes were rarely found.

Among the C lineage, as many colonies of C2 haplotype as of C3 haplotype were found in 2010 and 2011. But in 2012, the C3 haplotype was predominant (70%) followed by C2 (17%).

However, the haplotype composition of the CANIF was significantly homogeneous over the three years (Fisher exact test,  $p = 0.719$ , Table 2).

### **Mitochondrial DNA composition of the DCA**

Early and late samplings, whatever the year studied, show a homogeneous haplotype composition of the DCA (Table 2).

In 2010, 2011, 2012 respectively among the drones collected, 77%, 77%, 71% were M lineage and 23%, 22% and 25% were C lineage (Table 1, Figure 3).

Haplotype composition of the DCA was not homogeneous over the three years (Fisher exact test,  $p < 0.05$ ). The composition was also heterogeneous when comparing data year by year (Table 2).

For the three years, within the M group, haplotype M4 was mainly observed, followed by M4', M6, M17, M17', M19, M21', M28 and M51. The proportions of these last haplotypes were variable from one year to the next. Other haplotypes were punctually observed (M8, M22', M24' and M32').

Among the C lineage, the proportions of all the haplotypes also differed. Notably, in 2010 the haplotype C1 was absent and reached 16% in 2012.

No A lineage was observed in 2010. However, it was present at low frequencies in 2011 and 2012 (1% and 4% respectively). Haplotype A4 was the only one observed in 2011. In 2012, two new African haplotypes (A8 and A9) appeared.

### **Colonies and drones analysis**

No matter the considered year, the haplotype compositions of the DCA and CANIF colonies, are statistically homogeneous (Fisher exact test,  $p > 0.01$ , Table 2).

A Correspondence Analysis, performed on the complete set of data, including some reference populations (the five *A.m. mellifera* conservation centers from where some of the CANIF colonies originated) is presented on Figure 4. This graph shows that, when considering the lineages, some populations differ from a main group (which includes the DCA and the CANIF). Those differentiated populations all belong to the apiaries surrounding the CANIF and are characterized by the presence of African (A) and/or North-Mediterranean (C) lineages.



According to this Correspondence Analysis, the CANIF is closer to the population taken as references than to the surrounding apiaries.

### **Drone brood production**

Table 3 presents the number of drone brood cells, summed by haplotypes, for the CANIF colonies in 2010 and 2011.

During those two years, the colonies respectively produced 70% and 74% of M haplotype drones and 30% and 26% of C haplotype drones (Table 3, Figure 5).

Among the M haplotype drones, there was a large majority of M4 (76% and 64% in 2010 and 2011 respectively), followed by M17, then M51 and less than 4% of M28.

Colonies carrying M8, M19 and M4' haplotypes produced drones at a lower level.

Among the C haplotype drones, C3 was mainly observed, followed by C2 in 2010. There was an inversion of this proportion in 2011, with a majority of C2 drones produced.

Kruskal-Wallis tests clearly indicate the absence of link between the brood production and the considered haplotypes (in 2010,  $p=2.10^{-9}$ ,  $\chi^2=35.994$ ,  $ddl = 1$  and in 2011  $p<2.10^{-16}$ ,  $\chi^2=72.04594$ ,  $ddl = 1$ ).

The Fisher Exact test indicates differences between the haplotype proportions present in the DCA and that of drones produced in 2010 (data not shown). The same observations are made for 2011.

No significant link has been observed between the haplotype proportions of the drones newly produced by the colonies and the haplotype proportions of the different samplings in the DCA (Fisher Exact test,  $p < 2.2e-16$ ).

### **Discussion**

Over the last decades, increased losses of honeybee colonies have been observed throughout Europe [35]. To compensate the colony losses, beekeepers often restored their apiaries by importing a large number of colonies or queens. These importations increased the level of introgression of local populations in this species, where the genetic variability is geographically highly structured. They have particularly been observed in *A. m. mellifera* [16-17-18-19].

To preserve honeybee endemic diversity, conservation programs of *A. m. mellifera* have been started all over Europe [36]. Conservation is essential to ensure that healthy natural populations can act as a reservoir against losses due to occasional diseases [37]. Looking further ahead, the conservation program will eventually provide strains and traits for beekeeping.

This was a first study using mtDNA to analyze the relationships between an *A. m. mellifera* conservation center and surrounding populations. The study of the DCA was a key element to understand these relationships.

The aim of this study was to characterize the level of introgression of local populations and to compare it with the conservation center we started a few years ago. Looking more precisely at the DCA was necessary in order to confirm the efficiency of the conservation center and to estimate the gene flow between the CANIF and the surrounding apiaries.

The surrounding populations presented 61% of introgression by lineages C and A (Table 1, Figures 2 and 3). In 1998, Garnery *et al.* [17] found 50% of introgression in Ile-de-France based on the C lineage. In the current study, we showed that in fifteen years not only did the level of introgression increase but also the diversity of haplotypes. Particularly, three haplotypes from the C lineage were detected (instead of two) and five haplotypes from the A lineage (11% of the population) that were absent from the previous study. This situation is, according to the present study, of concern. An increase of the introgression is thus, confirmed. In the Northern part round the CANIF, the introgression was mainly by the C lineage, which stands for a North-Mediterranean or Oriental origin (Figure 3). In the South-East of the conservation center, a majority of C1 is observed. In these apiaries, the C1 haplotype, combined with the M7 haplotype, characterizes an Italian origin [10]. In the same apiaries, some African haplotypes are also observed (A1, A2, and A3). Combined with the M7 haplotype, they are mostly found in Spain and are characteristic of *A. m. iberica* populations [38-39]. The presence in the East of some A4 haplotype colonies was very surprising (Figure 3). This haplotype is characteristic of Center or Southern African populations [40]. This was the very first time that such haplotype was found in France (Garnery, unpublished data) and it probably corresponds to a recent origin of importation.

The case of Cernay is really interesting because it is very well documented. Indeed, in 2012 a beekeeper set up an apiary with fifteen colonies with the M7 haplotype and two C2 haplotype

colonies. This beekeeper had bought his colonies in Italy. The fact that his colonies are M7 haplotype is therefore expected [29]. But the C2 haplotype found there (instead of the usual C1) shows that there has also been importation of foreign honeybees in Italy. According to the high level of introgression of the populations surrounding the conservation center, the risk of gene flows from these populations is, therefore, very preoccupying.

Comparing the haplotype structure of the CANIF with that of the surrounding populations (Table 1, Figure 2), we can conclude that the CANIF setup has been efficient. The haplotype frequencies were highly different, with 74% to 84% of *A. m. mellifera* colonies in the CANIF, versus only 39% of M lineage colonies in the surrounding populations (Figure 2). This frequency is even lower (30%) when considering the haplotype characteristic of the *A.m. iberica* (M7).

The CANIF setup was initiated in 2005, and is in a phase of enlargement. It will be expected to reach 240 colonies to be completely effective. This number of colonies corresponds to the maximum mean effective size of natural honeybee populations in Europe (range 22-240 according to previous publications) [24-41-42].

Using the dividing process appeared to be a good protocol to increase the number of colonies of the conservation center. Even when the population doubled (from 74 colonies to 143), there was no statistical change in the haplotype frequencies over three years (Table 1, Figure 2).

The Correspondence Analysis shows that the CANIF was more closely related to the populations taken as references than to the surrounding populations (Figure 4). These reference populations are located in an area showing a low level of mitochondrial introgression (from 0 to 32%) and limited importations. The CANIF setup was more complicated than that of the five other conservation centers, considering the high level of introgressed colonies in the Ile-de-France region. The first step of the setup was to discard colonies which did not correspond to the local mtDNA lineage (M). Again, our results showed a very good efficiency of the conservation center set up in an area with a high risk of introgression from the surrounding populations.

Comparing the DCA to the CANIF, Table 2 shows that for each considered year, the haplotype proportions of the CANIF are statistically similar to those of the DCA. So, the CANIF colonies are well represented in the DCA. These observations are in agreement with those made by Koeniger *et al.* [43], where drones have been shown to prefer joining a close congregation. Looking at the Correspondence Analysis (Figure 4), we found that the DCA is

more closely related to the CANIF than to the surrounding populations. The haplotype composition of the CANIF is homogeneous over three years. Nevertheless, the haplotype proportions were not equivalent in the DCA during the three considered years. This may be due to two combined factors. Firstly, a few differences occurred in the CANIF during those years, even if they are statistically undetected. This is particularly the case of haplotype M28, whose frequencies varied from 1.3% to 4.9% over the three years. This observation can also be done for haplotypes M8 and M51 (Figure 2). Secondly, if the DCA is considered as a panmictic unit, drones sampled from the DCA are supposed to represent the structure of the population. Some of these drones may have been produced by feral colonies located in the area of the conservation center.

A large part of the C2 haplotype colonies were removed from the CANIF during the winter 2011-2012. Nevertheless, the proportion of this haplotype remained stable in the DCA in 2012. This could be due to three reasons. i) The few C2 haplotype colonies that were not removed produced more drones than the other colonies; ii) the C2 haplotype drones found in the congregation in 2012 correspond to gene flow from the surrounding populations; iii) the C2 haplotype drones found in the DCA in 2012 were produced by feral and undetected colonies in the conservation center.

The first hypothesis is unlikely because we saw previously that the haplotype proportion of the DCA is linked to that of the CANIF and not to the production of drones. The second hypothesis cannot be rejected. The C2 haplotype is, indeed, found in every apiary of the surrounding populations. The closest one is located 3.2km from the CANIF. But this explanation is unlikely because some other haplotypes, such as M7, which are specifically observed in the surrounding populations, were not detected in the DCA. The third hypothesis seems to be the most likely. For instance, the M17' haplotype is observed in the DCA in 2010 and 2011 while this haplotype is not detected in the CANIF colonies. In 2012, a swarm was captured in the conservation center and was characterized as M17' haplotype. This is, thus, in favor of the existence of feral colonies with undetected haplotypes in the conservation center. Those colonies could be captured after swarming and their haplotypes then characterized. So, sampling drones in the DCA allows us to better describe the mitochondrial diversity of the preserved population and also, gives us a faster way to detect the potential introgressed colonies. As a consequence, the presence of a large proportion of C2 haplotype drones in the DCA in 2012 seems to be due to feral C2 haplotype

colonies in the conservation center. The same explanation could be done for the presence of A4 and A8 haplotypes in the DCA in 2012. It is likely that A4 and/or A8 haplotype swarms will be caught in the CANIF in the next few years.

Most of the publications concerning honeybee decline focus on the origins of the losses without providing any solutions for the conservation of the diversity of this species. In this study, a protocol for a conservation center setup is given. This protocol is based on mtDNA to sort the colonies and to follow the evolution of the haplotype frequencies in the conservation center. Moreover, the monitoring can be considered as being at a population scale, thanks to the analysis of the structure of the drone congregation. This approach is particularly important to estimate the efficiency of the conservation process in the long term, so that quick measures can be taken when facing a risk of introgression.

In this study, the mtDNA showed its usefulness when applied to a conservation center setup and monitoring. Fast, easy and cheap, it can be commonly used to ensure the evolution of the conservation parameters (stability of the various haplotype frequencies). These parameters have to be neutral, in order not to influence the natural development of the conservation center. This is the case for mtDNA which is probably not in relation with the main interesting beekeeping traits.

Nevertheless, if the field work was efficient to conserve the mitochondrial diversity of the population of the conservation center, it is important to verify that this sorting did not impact on the general diversity of the bee population. This will be particularly important in the next few years, in order to estimate the part of the selection versus that of the conservation measures.

However, using only mtDNA, to set up a conservation center for honeybees, has limits. When using mtDNA it is only possible to assess the genetics background of colonies from the maternal side. Hence, the data given are not really an exact measure of the level of introgression. With mtDNA, the admixture between different lineages cannot be estimated. For example, a honeybee carrying an M lineage haplotype will be considered as *A. m. mellifera*, while the same individual could carry alleles specific of C lineage subspecies, like *A. m. ligustica*. Furthermore, discriminating colonies only according to their maternal background could lead to a decline in the nuclear diversity and result in the setup of

population showing a high bottleneck and a lack in their ability to adapt to their environment. To do so, the use of other neutral markers of the diversity, such as microsatellite markers, should be considered as an interesting addition.

## Acknowledgements

We thank all the beekeepers that provided bee samples. We would also like to thank the different students that helped us either with the fieldwork or for their assistance in the laboratory. We thank the French Research Council (CNRS) and the University Paris-Sud XI for support. We are also grateful to Dr. Marie Liouville-Cagneau for her help in improving the English of the manuscript.

## References

1. Scherf BD (2000) World Watch List for domesticated animal diversity 3<sup>rd</sup> edition. Food and Agricultural Organization of the United Nations, Rome.
2. Bruford MW, Bradley DG, Luikart G (2003) DNA markers reveal the complexity of livestock domestication. *Nat Rev Genet* 4(11): 900-910
3. Vigne J-D (2004) Les débuts de l'élevage. Le Pommier - Cité des Sciences edition. Paris, 189 p.
4. Crane E (1983) The Archaeology of Beekeeping. Cornell University Press, Ithaca, New York.
5. Ruttner F (1988) Biogeography and Taxonomy of Honeybees. New York, Springer Vlg.
6. Sheppard WS, Meixner MD (2003) *Apis mellifera pomonella*, a new honey bee subspecies from the Tien Shan Mountains of Central Asia. *Apidologie* 34:367-375.
7. Cornuet J-M, Garnery L, Solignac M (1991) Putative origin and function of the COI-COII intergenic region of *Apis mellifera* L. mitochondrial DNA. *Genetics* 1128:393-403.
8. Garnery L, Cornuet J-M, Solignac M (1992) Evolutionary history of the honey bee (*Apis mellifera* L.) inferred from mitochondrial DNA analysis. *Mol Ecol* 1:145-154.
9. Estoup A, Garnery L, Solignac M, Cornuet J-M (1995) Microsatellite variation in honey bee (*Apis mellifera*) populations: hierarchical genetic structure and test of infinite and stepwise mutation models. *Genetics* 140:679-695.
10. Franck P, Garnery L, Celebrano G, Solignac M, Cornuet J-M (2000a) Hybrid origins of honeybees from Italy (*Apis mellifera ligustica*) and Sicily (*Apis mellifera sicula*). *Mol Ecol* 9(7):907-921.

11. Franck P, Garnery L, Solignac M, Cornuet J-M (2000b) Molecular confirmation of a fourth lineage in honeybees from Middle-East. *Apidologie* 31:167-180.
12. Ruttner F, Milner E, Dews J (2004) *The Dark European Honey Bee*. 2nd ed. UK: BIBBA, 52 p.
13. Brother Adam (1983) *In search of the best strains of bees*. Northern Bee Books, 206p.
14. Moritz RFA (1991) The limitations of biometric control on pure race breeding in *Apis mellifera*. *J Apic Res* 30:54-59.
15. Kauhausen-Keller D, Keller R (1994) Morphometrical control of pure race breeding of honeybee (*Apis mellifera* L.). *Apidologie* 25:133-143.
16. Jensen AB, Palmer KA, Boomsma JJ, Bo V Pedersen (2005) Varying degrees of *Apis mellifera ligustica* introgression in protected populations of the black honeybee *Apis mellifera mellifera*, in Northwest Europe. *Mol Ecol* 14:93-106.
17. Garnery L, Franck P, Baudry E, Vautrin D, Cornuet J-M, Solignac M (1998a) Genetic biodiversity of the West European honeybee (*Apis mellifera mellifera* and *A. m. iberica*). I. Mitochondrial DNA. *Genet Sel Evol* 30:31-47.
18. Perrier C, Strange J, Langella O, Sheppard WS, Garnery L (2003) Diversité génétique, introgressions mitochondriales et nucléaires dans une population d'abeilles des Landes de Gascogne. *Les Actes du BRG 4* :79-100.
19. Soland-Reckeweg G, Heckel G, Neumann P, Fluri P, Excoffier L (2009) Gene flow in admixed populations and implications for the conservation of the Western honeybee, *Apis mellifera*. *J Insect Conserv* 13:317-328.
20. vanEngelsdorp D, Hayes JJ, Underwood RM, Pettis J (2009) A survey of honey bee colony losses in the US, Fall 2007 to spring 2008. *PLoS One* 3:e4071
21. vanEngelsdorp D, & 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*, 103.
22. Zmarlacki C, Morse RA (1963) Drone congregation areas. *J Apic Res* 2:64-66.
23. Ruttner H, Ruttner F (1966) Untersuchungen über die Flugaktivität und das Paarungsverhalten der Drohnen. 3. Flugweite und Flugrichtung der Drohnen. *Z Bienenforsch* 8:332-354.
24. Baudry E, Solignac M, Garnery L, Gries M, Cornuet J-M, Koeniger N (1998) Relatedness among honeybees (*Apis mellifera*) of a drone congregation. *Proc R Soc Lond B* 26:2009-2014.



25. Garnery L, Franck P, Baudry E, Vautrin D, Cornuet J-M, Solignac M (1998b) Genetic biodiversity of the West European honeybee (*Apis mellifera mellifera* and *A. m. iberica*). II. Microsatellite DNA. *Genet Sel Evol* 30:49-74.
26. Strange JP, Garnery L, Sheppard WS (2008) Morphological and molecular characterization of the Landes honeybee (*Apis mellifera* L.) ecotype for genetic conservation. *J Insect Conserv* 12:527-537.
27. Williams JL (1987) Wind-directed pheromone trap for drone honey bees (Hymenoptera: Apidae). *J Econ Entomol* 80:532-536.
28. Kocher TD, Thomas WK, Meyer A, Edwards SW, Pääbo S, Villablanca FX, Wilson AC (1989) Dynamics of mitochondrial evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proc Natn Acad Sci USA* 86:6196-6200.
29. Garnery L, Solignac M, Celebrano G, Cornuet J-M (1993) A simple test using restricted PCR-amplified mitochondrial DNA to study the genetic structure of *Apis mellifera* L. *Experientia* 49:1016-1021.
30. Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R (1991) Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques* 10:506-513.
31. Rortais A, Arnold G, Alburaki M, Legout H, Garnery L (2011) Review of the *DraI* *COI-COII* test for the conservation of the black honeybee (*Apis mellifera mellifera*). *Conservation Genet Resour* 3:383-391.
32. Abramoff MD, Magalhães PJ, Ram SJ (2004) Image processing with ImageJ. *Biophotonics international* 11:36-42.
33. Winston ML (1987) *The Biology of the Honey Bee*. Harvard University Press, Cambridge, 294p.
34. R Development Core Team (2011) *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
35. EFSA European Food Safety Authority (2009) Bee mortality and bee surveillance in Europe. CFP/EFSA/AMU/2008/02. Scientific Report, Question number EFSA-Q-2009-00801. P 217.
36. SICAMM Conference (2012) *Societas Internationalis pro Conservazione Apis melliferae melliferae*. [www.sicamm.org](http://www.sicamm.org)

37. Kraus B, Page RE (1995) Effect of *Varroa jacobsoni* (Mesostigmata: Varroidae) on feral *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) in California. Environ Entomol 24:1473-1480.
38. Garnery L, Mosshine EH, Cornuet J-M (1995) Mitochondrial DNA variation in Moroccan and Spanish honey bee populations. Mol Ecol 4:465-471.
39. De la Rúa P, Galián J, Serrano J, Moritz RFA (2001) Molecular characterization and population structure of the honeybees from the Balearic Islands (Spain). Apidologie 32:417-427.
40. Franck P, Garnery L, Loiseau A, Oldroyd BP, Hepburn HR, Solignac M, Cornuet J-M (2001) Genetic diversity of the honeybee in Africa : microsatellite and mitochondrial data. Heredity 86:420-430.
41. Estoup A, Solignac M, Cornuet J-M (1994) Precise assessment of the number of patriline and of genetic relatedness among honey bee colonies. Proc R Soc Lond B 258:1-7.
42. Jaffé R, Dietmann V, Alssopp M, Costa C, Crew R, Dall'Olio R, De la Rúa P, El-Niweiri Mogbel AA, Fries I, Kezic N, Meusel M, Paxton RJ, Shaibi T, Stolle E, Moritz RFA (2009) Estimating the density of honeybee colonies across their natural range to fill the gap in pollinator decline censuses. Cons Bio 24(2):583-591.
43. Koeniger N, Koeniger G, Pechhacker H (2005) The nearer the better? Drones (*Apis mellifera*) prefer nearer drone congregation areas. Insect Soc 52:31-35.

## **Tables**

Table 1

A.

Haplotypes	M4	M4'	M4''	M6	M7	M8	M10	M17	M17'	M19	M19'	M20	M20'	M21'	M22	M22'	M23	M24'	M27	M28	M32'	M51	M66
DCA.2010	106	5	0	1	0	0	0	10	4	7	0	0	0	2	0	1	0	1	0	0	0	4	0
DCA.2011	47	0	0	3	0	0	0	10	1	1	0	0	0	5	0	0	0	0	0	3	1	3	0
DCA.2012	98	4	0	0	0	5	0	13	1	6	0	0	0	2	0	1	0	0	0	14	0	11	0
CANIF.2010	34	5	0	0	0	2	0	8	0	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	2	0
CANIF.2011	41	5	0	0	0	5	0	8	0	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	3	0	3	0
CANIF.2012	70	6	0	1	1	7	0	11	1	3	0	0	0	1	0	0	0	4	0	7	0	8	0
St Forget	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
St Arnoult	8	2	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Magny	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Orsay	4	3	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cernay	0	0	0	1	15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Longvillier	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sermaise	11	3	0	0	8	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Etampes	6	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bris	13	0	0	0	0	1	0	0	2	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
Bonnelles	9	3	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Dep29	23	0	0	28	0	0	0	39	0	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Dep48	85	4	0	1	0	0	0	13	0	10	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6
Dep73	77	2	0	1	0	2	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Dep85	71	21	4	1	2	0	9	5	0	0	0	2	1	0	0	0	0	0	2	0	1	0	0
Belgium	21	1	2	0	0	0	0	47	10	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0

## B.

Haplotypes	C2	C1	C3	A1	A2	A3	A4	A8	A9
DCA.2010	26	0	16	0	0	0	0	0	0
DCA.2011	8	1	12	0	0	0	1	0	0
DCA.2012	23	9	23	0	0	0	3	1	4
CANIF.2010	9	1	9	0	0	0	0	0	0
CANIF.2011	11	1	10	0	0	0	0	0	0
CANIF.2012	4	3	16	0	0	0	0	0	0
St Forget*	20	1	7	0	0	0	0	0	0
St Arnoult*	12	3	7	0	0	0	0	0	0
Magny*	18	8	0	0	0	0	0	0	2
Orsay*	7	0	3	0	0	0	1	0	0
Cernay*	9	0	0	0	0	0	1	0	0
Cernay*	11	0	0	0	0	0	1	0	0
Longvillier*	6	0	1	0	0	0	0	0	0
Sermaise*	5	3	6	2	14	1	1	0	1
Etampes*	6	0	0	0	0	0	0	0	0
Bris*	3	2	3	0	0	0	7	0	0
Bonnelles*	6	0	2	0	0	0	3	0	0
Dep29**	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Dep48**	4	2	0	0	0	0	0	0	0
Dep73**	23	9	8	0	0	0	0	0	0
Dep85**	9	3	8	0	0	0	0	0	0
Belgium**	10	0	4	0	0	0	0	0	0

Table 2

Sources of variation	p-values
CANIF over 3 years	0.719
DCA 2010 seasons	0,0831
DCA 2011 seasons	0,8123
DCA 2012 seasons	0,1952
DCA over 3 years	3.962e-05**
DCA 2010 vs 2011	0.007045**
DCA 2011 vs 2012	0,04949*
DCA 2010 vs 2012	0,00003623**
CANIF vs DCA 2010	0,069
CANIF vs DCA 2011	0,05222
CANIF vs DCA 2012	0,03816*

Table 3

Haplotypes	Brood.2010	Brood.2011
M4	30679	46746
M4p	0	718
M8	57	7821
M17	2331	5409
M19	0	2811
M28	908	7257
M51	1277	4114
C2	3994	16408
C3	9172	9517

### Legends of the tables

Table 1: Haplotypes found in the CANIF, in the drone congregation, in the area surrounding the conservation centre (\*) and in populations taken as references (\*\*). Table 1A: haplotypes of the M lineage. Table 1B: haplotypes of the C and A lineages.

Table 2: Values of the Fisher exact test for population differentiation. \* 5%, \*\* 1% threshold.

Table 3: Drone brood production shown by haplotypes in 2010 and 2011 by the CANIF colonies.

## **Legends of the figures**

Figure 1: Geographical position of the conservation center (CANIF) and the known surrounding apiaries in the Ile-de-France region. The number of samples taken is indicated for each apiary.

Figure 2: Haplotype proportions in the surrounding apiaries, in the CANIF and in the DCA during the three years of the study.

Figure 3: Lineage repartitions in the colonies surrounding the conservation center. Each alveoli stands for a colony.

Figure 4: Correspondence Analysis of the lineages found in the surrounding apiaries (dark blue), in the CANIF (light blue) and in the DCA (green). Five Reference populations were added to the analysis, in black in the graph (conservation centers from where some of the CANIF colonies are).

Figure 5: Haplotype proportions of drones produced and of drones found in the DCA in 2010 and 2011.

Figure 1

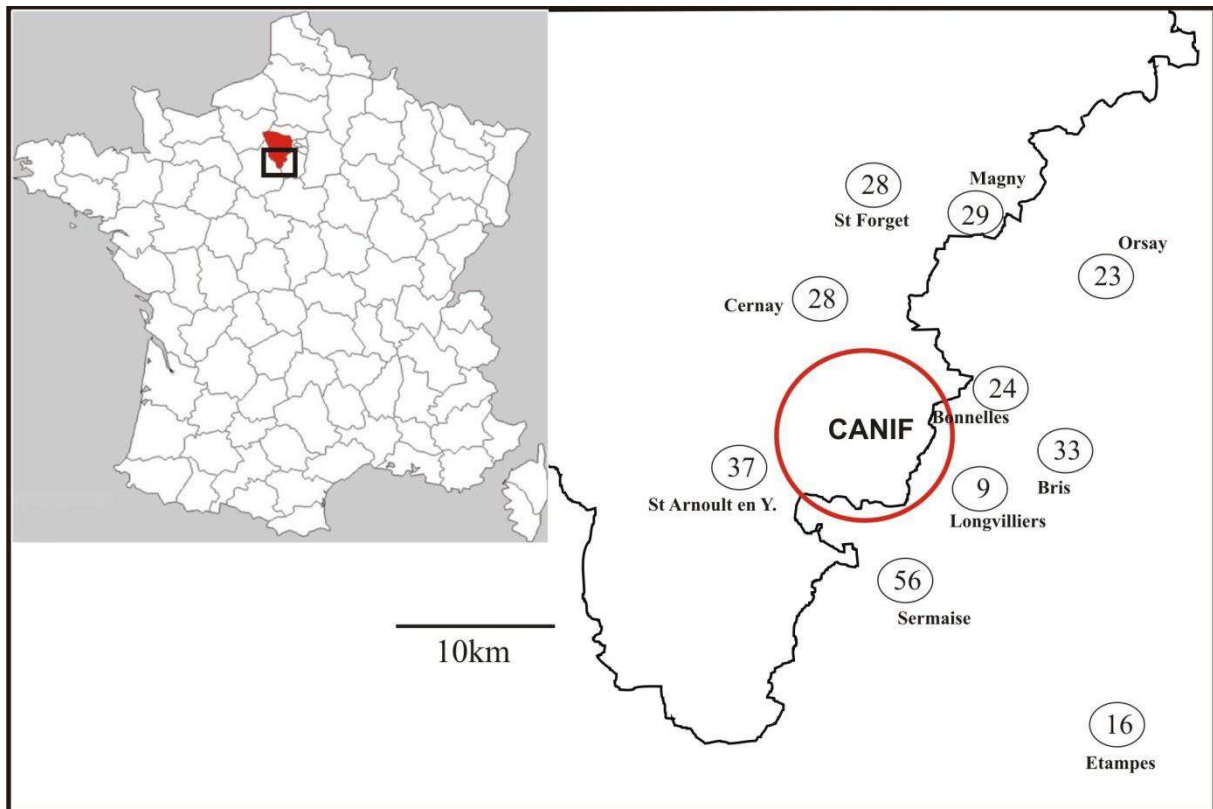


Figure 2

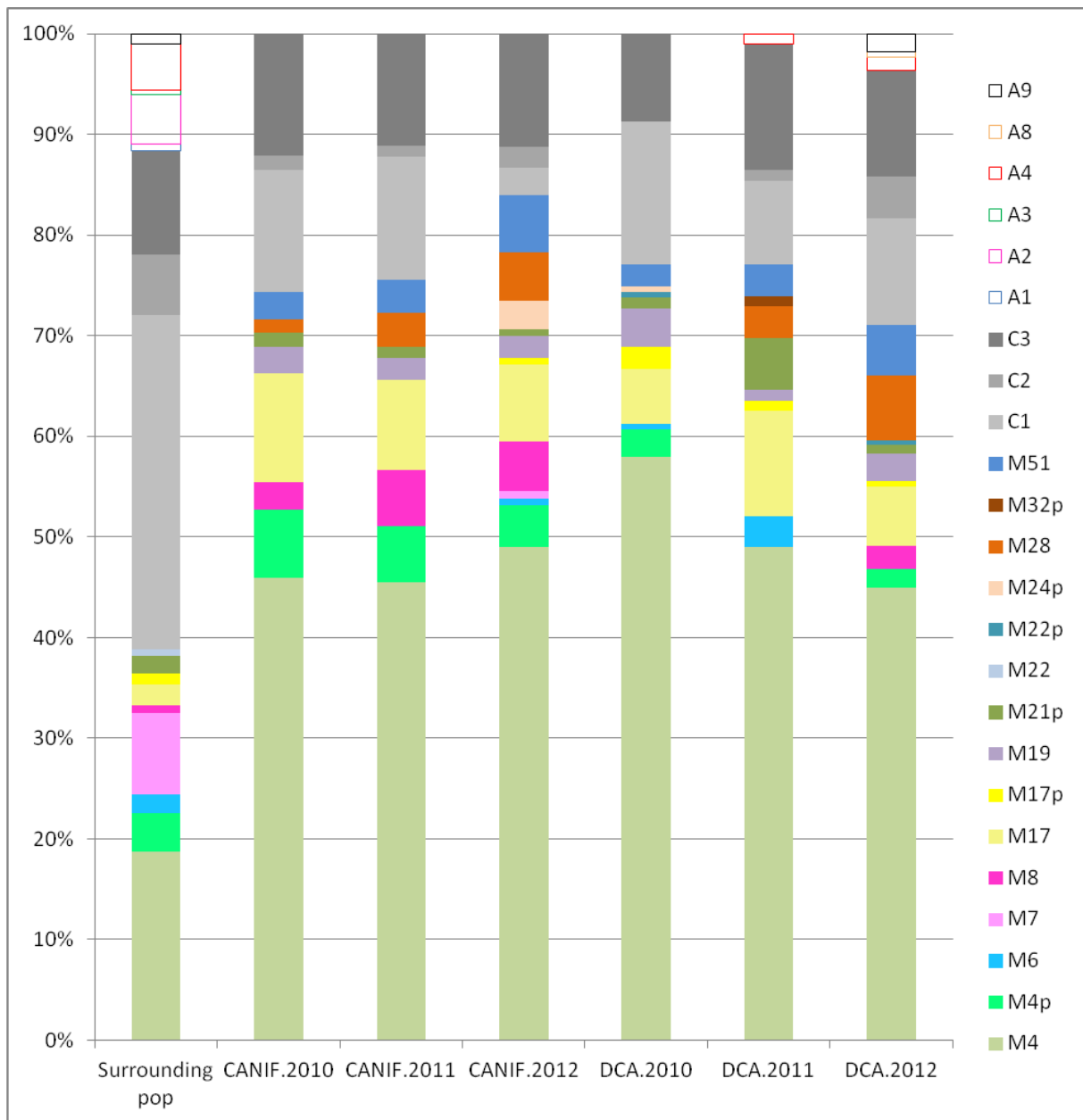




Figure 3

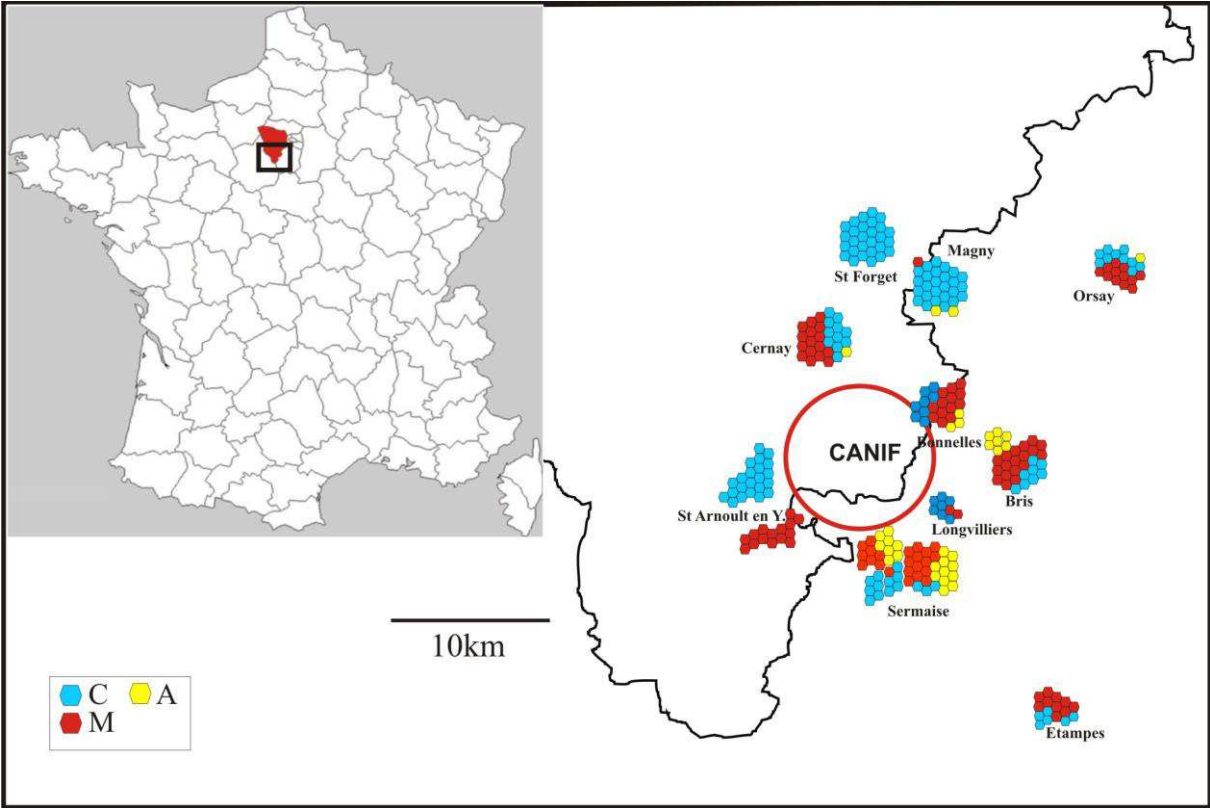


Figure 4

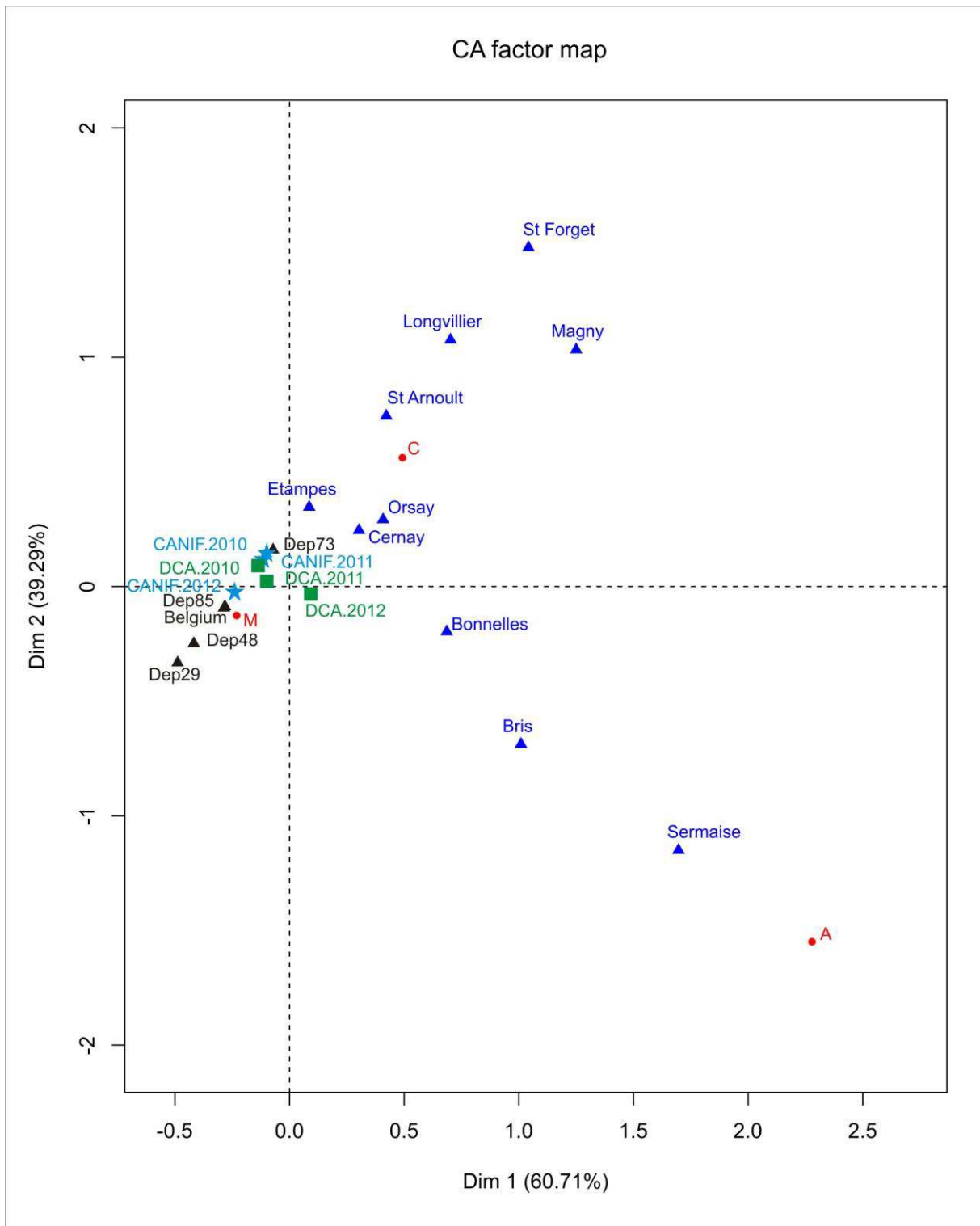
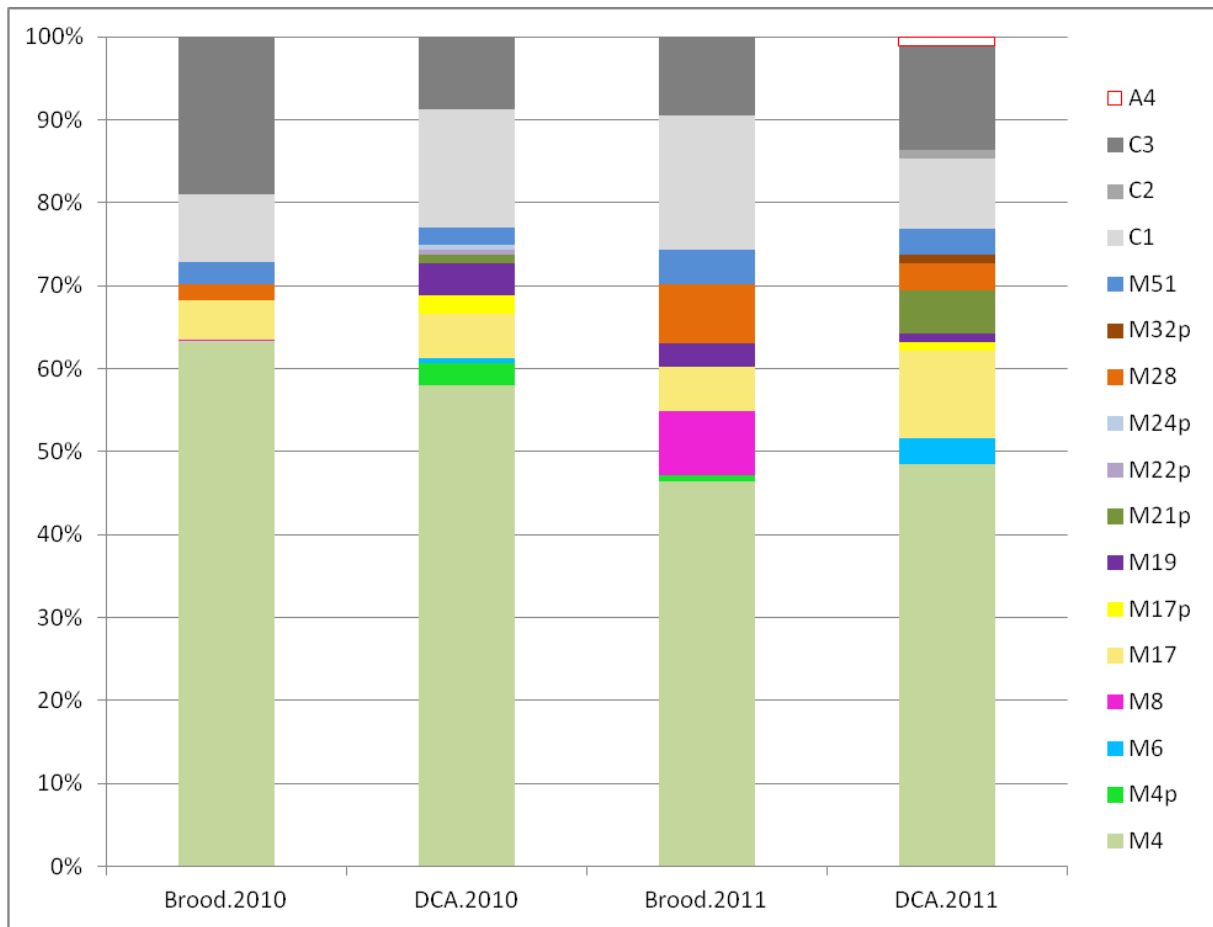


Figure 5



# PARTIE 3

**Etude spatio-temporelle du comportement  
reproducteur d'*Apis mellifera* à travers une  
congrégation de mâles, application à la  
conservation**

## Introduction

L'Abeille mellifère est caractérisée par un comportement reproducteur très spécifique et complexe. En effet, les mâles se rejoignent dans des endroits particuliers appelés congrégations de mâles. Ces congrégations sont en place au cours du printemps et de l'été, les après-midi de beau temps. Les reines vierges se rendent dans ces congrégations afin de se faire féconder par plusieurs mâles au cours de vols nuptiaux.

Il a été estimé que plus de 25000 faux-bourçons formaient une congrégation et qu'ils provenaient de nombreuses colonies environnantes (jusqu'à 15 km de distance). Les congrégations sont donc considérées comme des structures panmictiques (Baudry *et al.* 1998), représentant la diversité locale et permettant les flux de gènes entre colonies.

Ce comportement reproducteur particulier est retrouvé sur l'ensemble de l'aire de répartition géographique de l'Abeille mellifère (Baudry *et al.* 1998, Koeniger *et al.* 1994, 2005, Kraus *et al.* 2008, Wattanachaiyingcharoen *et al.* 2008, Muerrle *et al.* 2007).

*Apis mellifera* est présente, de façon naturelle, sur les continents Africains et Européens. Quatre lignées évolutives ont été identifiées (M, A, C et O) regroupées selon 26 sous-espèces allopatriques (Ruttner 1988, Sheppard and Meixner 2003).

*Apis mellifera mellifera* (*A. m. mellifera*) appartient à la lignée M et est native de la partie Nord-Ouest de l'Europe (Ruttner 1988). Son aire de répartition naturelle est la plus large, comparée aux autres sous-espèces, ce qui suggère une grande capacité d'adaptation aux changements environnementaux et aux biotopes spécifiques (Garnery *et al.* 1992, Ruttner *et al.* 2004).

Des sous-espèces non locales, comme *A. m. ligustica* ou *A. m. carnica* et des races hybrides ont été introduites dans la zone de répartition naturelle de l'Abeille Noire, à causes de performances particulières (productivité, sortie de l'hivernage rapide et efficace, douceur) définies par Ruttner (Ruttner 1972).

Cependant, des conservatoires de l'Abeilles Noires ont été initiés en Europe. Le but de ces conservatoires est d'empêcher l'hybridation et l'introgession entre colonies locales et colonies de lignées importées, par un mécanisme d'isolement. Cet isolement peut être soit géographique (sur une île ou dans des vallées) soit numérique (nombre de colonies locales suffisamment important pour limiter les flux de gènes avec des colonies allochtones).

Un tel conservatoire a été mis en place en région Ile-de-France.

Le but de cette étude est d'analyser le comportement reproducteur dans un contexte spatial (impact des colonies environnantes) et temporel (sur une période de trois années consécutives, de 2010 à 2012), afin de valider l'efficacité des efforts de conservation mis en place au sein du conservatoire.

## Conclusion

Les résultats préliminaires montrent que la congrégation reste stable au cours des trois années d'étude. Le taux d'introgression varie pas d'une année sur l'autre, à l'exception de 2011 mais cette différence est très probablement liée à l'échantillonnage réduit de cette année.

Le niveau d'introgression est également similaire au sein du rucher expérimental localisé à quelques centaines de mètres de la congrégation, et dans les populations autour du conservatoire (de l'ordre de 20% d'introgression). En considérant les résultats des analyses mitochondriales sur ces populations environnantes (60% d'haplotypes spécifiques de lignées importées) et leur distance par rapport à la congrégation, on suggère la présence d'essaims sauvages d'abeilles noires dans la région. Ces essaims locaux auraient fécondé les reines de types importés des colonies environnantes. Cette hypothèse est en opposition avec des études précédentes estimant que les essaims sauvages auraient complètement disparu en Europe à cause notamment de l'invasion du parasite *Varroa destructor* (Jaffé *et al.* 2009).

Pour l'année 2010, 26 mâles ont été identifiés comme provenant du rucher expérimental et seraient issus de 3 colonies.

Il a été estimé que 56 colonies différentes participaient à la formation de la congrégation pour cette même année.

Ainsi, contrairement aux études précédentes, il semblerait que les mâles issus du rucher expérimental ne se rendent pas dans la congrégation la plus proche (Koeniger *et al.* 2005). Ces mâles se comporteraient davantage comme les faux-bourçons d'espèces monoandres et privilégieraient des congrégations plus éloignées afin sans doute de limiter les risques de consanguinité.

Même si toutes les colonies ne produisent pas un nombre de mâles équivalent, le fait que seules trois colonies aient produits des mâles retrouvés dans la congrégation reste surprenant. Il est fort probable que d'autres congrégations non identifiées existent non loin du rucher expérimental.

Il est donc indispensable, afin de caractériser de façon précise l'efficacité de la conservation dans la région Ile-de-France, de continuer ces analyses pour les années 2011 et 2012, de rechercher les éventuelles congrégations et les échantillonner. Enfin, il serait très intéressant de trouver une méthode afin d'identifier les éventuels essaims sauvages. Leur présence au sein du conservatoire ou dans la région avoisinante serait très rassurante pour la conservation d'*A. m. mellifera* et également de l'espèce en elle-même.

## **Introduction**

Despite its common name, domestic honeybee is only partially managed by Human. In fact, breeding is very difficult to control in this species as a consequence of original mating system. It is characterized by drone congregation areas (DCA) where males from many close colonies group together (BAUDRY *et al.* 1998; KOENIGER *et al.* 2005). Up to 25 000 drones aggregate in a DCA (PAGE JR and METCALF 1982). They preferentially join the closest DCA (KOENIGER *et al.* 2005), but partners have been observed to mate in up to 16km distance (PEER 1957). Virgin queens visit these DCA during nuptial flights and mate with many drones. The degree of multiple mating (polyandry) varies within and between the different *Apis mellifera* subspecies, from 5 to 34 (FRANCK *et al.* 2000b). DCA are thus considered as panmictic units (BAUDRY *et al.* 1998) and represent the most the local diversity. Furthermore, they allow efficient gene flow between proximate colonies.

This mating system is observed over the widespread geographic area of honeybee (KOENIGER *et al.* 1994; BAUDRY *et al.* 1998; WATTANAACHAIYINGCHAROEN *et al.* 2003; KOENIGER *et al.* 2005; MUERRLE *et al.* 2007; KRAUS *et al.* 2008). *Apis mellifera* is distributed all over Africa and Europe where four evolutionary lineages (M, A, C and O) are described and at least 26 allopatric subspecies (RUTTNER 1988; SHEPPARD and MEIXNER 2003). *Apis mellifera mellifera* belongs to the M lineage and is the native subspecies in North-Western Europe (Ruttner 1988). This subspecies is the most widely distributed over Europe, which suggests a high potential of adaptation to changing environments and to special biotopes (GARNERY *et al.* 1992; RUTTNER *et al.* 2004). Non local subspecies, like *A. m. ligustica* or *A. m. carnica*, but also hybrid races were introduced in the natural area of *A. m. mellifera* because of their greater honey production, quicker spring build up, lower swarming tendency and lower defensiveness (RUTTNER 1988). Gene flow occurs commonly between honeybee subspecies artificially or naturally in contact (FRANCK *et al.* 1998a; GARNERY *et al.* 1998b; GARNERY *et al.* 1998a). The gene flow has resulted in hybridization between subspecies, and sometimes in the replacement of one subspecies by another, as in Germany and Denmark. The impact of these hybridizations is potentially very damaging for native subspecies. A genetic homogenization occurs combined with a decrease of natural diversity (RHYMER and SIMBERLOFF 1996).

Beside the disturbance induced by hybridization, the distribution of honeybees has also been affected by other Human activities in Europe (VANENGELSDORP *et al.* 2009) and some



diseases (VANENGELSDORP and MEIXNER 2010). Among those activities, the use (or abuse) of pesticides and the introduction, followed by the propagation, of non-native subspecies are the most damaging ones and lead to global decline of honeybee populations.

*A. m. mellifera* (also called the black European honeybee) possesses traits that are interesting for beekeeping and therefore for conservation programs. It is also important to keep pure gene stocks of *A. m. mellifera* to produce hybrid bees like the Buckfast bee (hybrid between M and C maternal lineages created by the beekeeper Brother Adam).

To put up the loss of *A.m. mellifera* colonies and prevent genetic admixture with non-local subspecies, different black honeybee preservation centers have been started all over Europe (SICAMM Conference, 2012). Most of these centers are based on breeding programs which rely on mating apiaries. To avoid artificial insemination which could be dangerous for queens, the production of specific drones is forced in mating apiaries, so that these specific drones will mate with virgin queens.

Preservation centers will tend to isolate the populations from hybridization and thus introgression from surrounding allochtone populations. This isolation could be either geographical (islands or mountains valleys) or with outnumbers of pure colonies compared to non-local ones. Such a preservation center has been set up in the south-west of Paris. Geographical pattern does not allow the isolation of these colonies and the aim was to settle numerous colonies to limit gene flow with surrounding bees.

The aim of the present study was to investigate the mating characteristics of this preservation center: drone production, participation to proximate DCA and temporal variation of one single drone congregation over a period of 3 years.

## **Material and methods**

### **Sampling and DNA extraction**

In the French Ile-de-France region, a DCA was detected less than 1km away from the experimental apiary of the preservation center.

A total of 471 drones were sampled over 3 years using a helium-filled balloon and pheromone (9-ODA) drone trap, built following Williams (WILLIAMS 1987). In July 2010, 183 drones were captured, in June 2011, 96, and in July and August 2012, 192.

To infer the genotypes of queens from the experimental apiary, 48 workers were sampled in each colony. So in 2010, all the 24 colonies were sampled. So, a total of 1152 workers were analyzed to obtain the genotypes of 24 different queens.

83 colonies surrounding the preservation center were sampled. These colonies are located about 10km away from the experimental apiary. One worker per colony was analyzed.

All bees were stored in 90% ethanol until processing to DNA extraction from the head. Drone DNA was extracted with a phenol-chloroform extraction, followed by ethanol precipitation (KOCHER *et al.* 1989b; GARNERY *et al.* 1992). Worker DNA was extracted using a 10% Chelex protocol (WALSH *et al.* 1991). The Chelex method was used because it is much faster than the phenol-chloroform one. It is therefore well adapted for the great number of workers analyzed in order to have the queen genotypes.

### **Microsatellite analysis**

DNA samples were amplified using multiplex PCR reaction with 14 microsatellite loci : A7, A28, A113, A43, A88, Ap43, Ap55, Ap81, B24, Ap36, Ap66, Ap33, A8 and B124 (ESTOUP *et al.* 1995; FRANCK *et al.* 2001; SOLIGNAC *et al.* 2003a). Three plex were used, respectively containing B24, Ap66, A28, A88, Ap55 and B124 for the first one, A7, Ap43 Ap81 and A113 for the second one and A8, Ap36, A43 and Ap33 for the third one. These 14 loci are considered to be independent from one another: most of them are on separate chromosomes, the smallest distance between markers on the same chromosome is 20 cM (Ap36 and Ap 66; and Ap55 and A43, (SOLIGNAC *et al.* 2003a)).

PCR was carried out in a total volume of 10  $\mu$ L, containing 5  $\mu$ L of the Platinum Multiplex 2X PCR Master mix (Applied Biosystems), 1.0  $\mu$ L of 10X primer mix and 1.0  $\mu$ L of DNA extract with 30 amplification cycles in conditions defined by the provider. PCR products were

visualized by capillary electrophoresis (Applied Biosystems 3130) and sized with the internal size-standard ROX from Applied Biosystems. Fragments were scored with the software GeneMapper 4.0 (Applied Biosystems).

### **Population genetic analysis**

The genotypes of the queens were estimated from the genotypes of the workers, using the program Colony 1.2 (WANG 2004). The program analyzes haplo-diploid systems based on the expression of codominant genetic markers, such as DNA microsatellites. It calculates the probabilities of all possible queen genotypes, based on the observed allele frequencies in the population.

Tests for population differentiation and pairwise  $F_{ST}$  indices between years were performed using the software GenePop (RAYMOND and ROUSSET 1995) to compare the different sample years and the surrounding apiaries.

The genetic structure among the populations was further evaluated using the program Structure 2.0 (FALUSH *et al.* 2003). Simulations were run for all samples simultaneously using 500,000 burn-in steps and MCMC (Markov Chain Monte Carlo algorithm) steps. The true number of clusters ( $K$ ) was defined using the value of  $\Delta K$  as described in Evanno *et al.* (EVANNO *et al.* 2005).

The level of introgression into each sample was investigated using four populations of the C lineage as references (Bertrand *et al.* in prep). These populations belong to *A. m. ligustica*, *A. m. carnica*, *A. m. cecropia* and *A. m. macedonica* subspecies. They were previously characterized using a morphometrical analysis and their lineage was confirmed with mitochondrial DNA marker. The frequency of alleles showing introgression was estimated for twelve loci for which one or several alleles seem to be diagnostic between M and C lineages (GARNERY *et al.* 1998b), (Garnery, personal communication). The proportion of alleles showing introgression (IR) in each sample was calculated as in Garnery *et al.* (1998) (GARNERY *et al.* 1998b), by locus:

$$IR = \frac{\sum_{i \in D} p_i}{\sum_{i \in D} q_i}$$

where D is the set of diagnostic alleles at the locus,  $p_i$  and  $q_i$  are the allelic frequencies in the tested and in the reference populations respectively.

The “putative diagnostic” alleles were identified when comparing the allele frequencies at a specific locus, between C lineage and M lineage populations. When a C lineage population had a high frequency of one allele at a given locus, it was compared to M lineage populations. This allele was called “putative diagnostic” if its frequency was low in the M lineage populations. From 1 to 12 “putative diagnostic” alleles are described for the 12 loci analyzed. They represent from 70% to 92% of allelic diversity in populations from lineage C (mean  $\pm$  STerr).

To see whether a particular subspecies was involved in the introgression, a Neighbor-Joining tree was built including present study samples and reference populations described in (PERRIER *et al.* 2003a). These populations are: Nord-Pas-de-Calais (*A. m. mellifera*) for the M lineage, Chalkidiki (*A. m. macedonica*), Forli (*A. m. ligustica*), Argos (*A. m. cecropia*) and Slovenia (*A. m. carnica*) for the C lineage, Tbilissi and Erevan (*A. m. caucasica*) for the O lineage and Al-Hoceima (*A. m. major*) for the A lineage. The hybrid race Buckfast was also added to this analysis. The Neighbor-Joining tree was built with Populations 1.2.32 software (LANGELLA 1999) using Cavalli-Sforza and Edwards’ standard distances (CAVALLI-SFORZA and EDWARDS 1967b). Bootstrap over individuals was performed using 2000 replicates. Trees were edited with Treeview v32 (PAGE 1996).

So far, no program is available to calculate distances between haploid (drone from the DCA) and diploid populations (reference populations). To do so, the haploid samples were transformed in diploid homozygotes and the already diploid samples from the reference populations were doubled in order to limit the sampling bias resulting from this artificial diploidisation.

The number of drone producing colonies was estimated for 2010 with the program Colony 1.2 (WANG 2004). The dataset was analyzed with different replicate runs using different seed numbers to test the stability of the results. Then, to test the relatedness between queens from the experimental apiary and drones from the DCA for the year 2010, the lod score method was used (MORTON 1995), a statistic based on a likelihood ratio. First, for each drone x queen combination, the likelihood that a given drone was the offspring of a given queen of the experimental apiary was calculated based on shared alleles. Then, the likelihood that the same

drone was randomly issued from the population was calculated considering the allelic frequencies of the population. For several loci, both likelihoods are the product of likelihood at each locus, provided that loci are genetically independent and that there is no linkage disequilibrium between loci. The lod score was calculated from the ratio between these two likelihoods. Lod scores are the decimal logarithms of likelihood ratios, so that multilocus lod scores are sums of lod scores over all loci.

### **Drone brood production**

The drone brood production was analyzed for each colony of the experimental apiary in 2010 in order to see whether it was congruent with the number of colonies presented in the DCA the same year. Pictures of the frames were taken every two weeks for each colony. This experiment was done from March to September 2010, on a set of 24 colonies, the same that were genetically characterized (see above). The number of drone brood cells was counted manually using the Image J software (ABRÀMOFF *et al.* 2004). The possible link between the number of drone producing colonies found in the DCA during the two different samplings (early and late) and the number of drones produced by the colonies of the experimental apiary twelve to forty-six days before the samplings, was also considered. This time frame was chosen to apprehend at best the quantity of drone produced, knowing the time needed between the capping and the full maturation of drones and their lifespan (WINSTON 1987).

## **Results**

### **Population structure**

DCA were significantly differentiated among the three sampling years (Fisher's exact test  $P$ -value $<0.05$ ). Beside this overall differentiation, all pairwise differentiations between samples, the three sampling DCA and the surrounding colonies, were also significant although multilocus  $F_{st}$  values were mostly small (Table 1).

The analysis of the population substructure on the DCA merging the three sampling years was run with the program Structure for 1 to 10 subpopulations and yielded the highest probability for  $K=1$  subpopulation. No recognizable substructure among the three sampling years was observed (Figure 1).

## **Introgression**

Considering the 33 diagnostic alleles between M and C lineages (Bertrand *et al.* in prep), the proportion of alleles issued from introgression process was estimated by population. Table 2 shows the level of introgression by the C lineage in the three sampling years in the DCA and in the surrounding colonies. The level of introgression is similar for the different samplings in the DCA, but 2011 seems to have a lower level than the two other years. Sample from 2011 is however the smallest one and this result may only be a random effect. Indeed, in 2011, only 96 drones were captured, while 183 and 192 were captured in 2010 and 2012 respectively. The same analysis was performed for the queens of the experimental apiary in 2010. The 24 queens of the experimental apiary show a level of introgression similar to the DCA. The surrounding colonies show a similar level of introgression as the samples from the DCA located in the preservation center except for the 2011 sample (Mann-Whitney-Wilcoxon P-values  $>0.05$  after Benjamini and Hochberg correction for multiple testing). This result indicates that the preservation center may be not isolated from the surrounding colonies, considering that the same alleles diagnostic of C lineage were identified in both the DCA and the surrounding colonies.

The unrooted Neighbor-Joining tree based on the Cavalli-Sforza's distances between the sampling years in the DCA, the colonies surrounding the preservation center and populations taken as references for the different lineages (Figure 2) shows results consistent with the  $F_{st}$  analysis. The three sampling years are closer to one another than to any other population. The surrounding colonies are closer to the M lineage population than to other lineages. Furthermore, the terminal branches leading to population samples are far longer than internal branches of the tree, supporting the low level of structure.

## **Number of drone producing colonies and drone assignment**

The samples from the three years were each analyzed with the program Colony to estimate the number of queens providing drones. All the replicate runs gave similar results. The average numbers of reconstructed queens are  $56.4 \pm 0.52$  (mean  $\pm$  SD) for 2010,  $36.2 \pm 0.45$  (mean  $\pm$  SD) for 2011 and  $75 \pm 1.22$  (mean  $\pm$  SD) for 2012. The number of drones per colony ranges from one to thirteen.

The results obtained with the lod score method were congruent with the estimation of the drone producing colonies. Indeed among the 56 reconstructed queens, three are located in the

experimental apiary of the preservation center. These three colonies produced 13, 12 and 1 drones respectively (Table 3). So, 26 drones found in the DCA were produced in the experimental apiary. These three sibships were also given in the reconstruction made by Colony except for the lonely drone which was associated to other drones in a “putative family”. Furthermore when we considered the two samplings in the DCA (June and July), among the 63 drones sampled in June, 2 were produced in the experimental apiary, and 24 among the 120 sampled in July were produced in the experimental apiary.

Interestingly, the contribution of the queens (or colonies) to the DCA can be compared with the drone production of each colony, which was counted from brood cell observation every two weeks from March to September. The total quantity of drones produced by each colony in 2010 was not homogeneous among the colonies (Table 4): the number of drones produced varies from 13 (colony LR1) to 6397 (colony LR56), with a mean value of  $2017.4 \pm 1661.7$ . No direct relation is observed between drone production and contribution to the DCA: among the 3 colonies which participate to the DCA, one produced very few drones (LR25, 57 drones). Furthermore, no drones from colonies LR44, LR7, LR8 or LR16 were found in the DCA while they produced the highest number of drones (just below LR56). The low contribution of some colonies could result from a shift in the period of production. Temporal analysis of the drone production (Figure 3) shows however that it was equivalent for the different colonies. Production mostly initiates at mid-April and stopped at the end of July. A second peak is observed in the second half of August for LR34, LR8 and with smallest intensity for LR14. However, considering the sampling period (June and July), all the colonies should have provided drones in proportion corresponding to their global production.

## **Discussion**

The mitochondrial introgression by the C lineage is about 23% in this DCA (Bertrand *et al.* submitted). The level of mitochondrial introgression is similar to the nuclear one although slightly higher. This supports a non recent hybridization between M and C lineages and the absence of massive importation over a short period of time (GARNERY *et al.* 1998b; BERTRAND in preparation). Most of the samples show introgression on one to three loci among 12 (data not shown) and no introgression level was observed at more than 8 markers. Such introgression level resulting from recent importation should result in admixture of

individuals with introgression on all the 12 loci and individuals with no introgression at all. The picture depicted by the introgression level over the 12 loci reveals a well installed admixture between M and C lineages.

When considering the surrounding colonies, the level of nuclear introgression is similar to that observed in the DCA. On the contrary, the mitochondrial introgression of the surrounding colonies is about 60% according to the results obtained by Bertrand *et al.* (BERTRAND *et al.* submitted). This difference between the mitochondrial and nuclear introgressions could be due to the importation of non-local queens in the surrounding area. If these queens mated with local drones, their nuclear alleles are rapidly diluted by local alleles, while their mitochondrial DNA is directly maintained in their descent. A such difference between mitochondrial and nuclear introgression has already been observed in previous studies (GARNERY *et al.* 1998b).

The fact that only 26 drones among 183 (14%) were produced in the experimental apiary is very surprising. According to Koeniger *et al.* (KOENIGER *et al.* 2005) drones go to the closest DCA. So, either the other drones die before gathering in a DCA, or they go to a not yet detected DCA. If we consider that the hypothesis of another DCA is the most likely regarding the field work observations (no dead drones on the apiary ground), this other DCA should be as close to the experimental apiary as the DCA studied here. Further investigation concerning finding other DCAs should be undertaken. According to the lod score results, 2 drones from the experimental apiary were sampled in June in the DCA while 24 were sampled in July. These observations are in agreement with the drone brood productions. Indeed, 12 to 46 days before the July sampling, colonies were at their maximum production of drones (Figure 3). Whereas 12 to 46 days before the June sampling, they were at about their minimum production. This indicates that surrounding colonies would produce drones earlier than colonies from the experimental apiary, which is a characteristic of non-local subspecies (ADAM 1983; RUTTNER 1988).

Moreover the 26 drones were produced by three different colonies only. These colonies were not the most productive ones (except for LR56). Indeed, the colony LR56 was the most productive colony, but it appeared that it had a specific drone frame (frame with drone size alveoli, human made for the production of drones). So, it was not surprising that 13 drones from this colony were found at the same time in the DCA. The case of the colonies LR32 and LR25 are trickier. Finding drones from the LR32 colony was not that surprising, but, not



detecting drones from as productive colonies (like LR8, LR34 and LR44) is. On the contrary, finding drone from a low productive colony (LR25) was unexpected.

The number of colonies estimated as genitor of the DCA sample is low. Indeed, only 56 different queen genotypes were observed in the DCA sample in 2010. Even if the real effective number of participating colonies to the DCA is likely higher, this number is low compared to previous observations made by Baudry *et al.* (BAUDRY *et al.* 1998) in similar environment. Among their 142 drones they had 107 observed siblings, whereas in the present study, among 183 drones only 56 siblings are observed. The effective number of colonies contributing to the DCA has been observed to be set up with up to 240 colonies (BAUDRY *et al.* 1998). However, in wild African populations, only about 50 different colonies have been identified contributing to a DCA (MORITZ *et al.* 2008). Many hypotheses could explain this low number of participating colonies. First, if the formation of drone congregations is, as described by Mueller *et al.* (MUELLER *et al.* 2012a), “an effective behavioural mechanism to decrease the chances of inbreeding and to lower the probability of sister-brother matings”, drones could avoid a close congregation. But this observation is particularly true for monoandrous species, and not observed in polyandrous species until now (KOENIGER *et al.* 2005; MUELLER *et al.* 2012a). Nevertheless, the presence of others DCA should be investigated in order to check the presence of drones from the experimental apiary. Second, the low number of contributing colonies could be due to a low colony density in the area. Indeed, only amateur beekeepers are established with a few numbers of colonies each. Third, this low number of colonies could be explained by the presence of numerous “cousin drones” in the DCA. These cousin drones would lead to an underestimation of the total number of colonies contributing to the DCA (BAUDRY *et al.* 1998). As the experimental apiary was initiated in 2005 with 15 colonies and then enlarged by colony divisions until 2010, it is very likely that colony swarming occurred in the area since 2005 leading to closely related undetected colonies (feral cousin swarms). This is in opposition to the observations made by Jaffé *et al.* (JAFFÉ *et al.* 2009). They indeed saw that wild honeybee populations seem to be absent in Europe, and that European honeybee populations are mainly composed of managed bees. Even if disease dissemination and land use are of great concern for honeybees in Europe (BROWN and PAXTON 2009), the present study suggest the existence of wild populations in some nature reserves where no professional beekeeper is established.

## References

- ABRÀMOFF, M. D., P. J. MAGALHÃES and S. J. RAM, 2004 Image processing with ImageJ. *Biophotonics international* **11**: 36-42.
- ADAM, B., 1983 *In search of the best strains of bees*. Northern Bee Books.
- BAUDRY, E., M. SOLIGNAC, L. GARNERY, M. GRIES, J. CORNUET *et al.*, 1998 Relatedness among honeybees (*Apis mellifera*) of a drone congregation. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* **265**: 2009-2014.
- BERTRAND, B., in preparation Diversité génétique et introgression de conservatoires d'*Apis mellifera mellifera* en Europe.
- BERTRAND, B., S. MOULIN, H. LEGOUT, F. MOUGEL, M. ALBURAKI *et al.*, submitted The Use of Mitochondrial Markers for The Conservation of Honeybee Populations (*Apis mellifera*, L.): An Applied Approach. *PLoS One*.
- BROWN, M. J., and R. J. PAXTON, 2009 The conservation of bees: a global perspective. *Apidologie* **40**: 410-416.
- CAVALLI-SFORZA, L. L., and A. W. EDWARDS, 1967 Phylogenetic analysis. Models and estimation procedures. *American journal of human genetics* **19**: 233.
- ESTOUP, A., L. GARNERY, M. SOLIGNAC and J.-M. CORNUET, 1995 Microsatellite variation in honey bee (*Apis mellifera* L.) populations: hierarchical genetic structure and test of the infinite allele and stepwise mutation models, pp. 679-695. *Genetics Soc America*.
- EVANNO, G., S. REGNAUT and J. GOUDET, 2005 Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study, pp. 2611-2620. *Wiley Online Library*.
- FALUSH, D., M. STEPHENS and J. K. PRITCHARD, 2003 Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies, pp. 1567-1587. *Genetics Soc America*.
- FRANCK, P., L. GARNERY, A. LOISEAU, B. P. OLDROYD, H. R. HEPBURN *et al.*, 2001 Genetic diversity of the honeybee in Africa: microsatellite and mitochondrial data, pp. 420-430. *Wiley Online Library*.
- FRANCK, P., L. GARNERY, M. SOLIGNAC and J.-M. CORNUET, 1998 The origin of west European subspecies of honeybees (*Apis mellifera*): new insights from microsatellite and mitochondrial data, pp. 1119-1134. *JSTOR*.
- FRANCK, P., L. GARNERY, M. SOLIGNAC and J.-M. CORNUET, 2000 Molecular confirmation of a fourth lineage in honeybees from the Near East. *Apidologie* **31**: 167-180.
- GARNERY, L., J. M. CORNUET and M. SOLIGNAC, 1992 Evolutionary history of the honey bee *Apis mellifera* inferred from mitochondrial DNA analysis, pp. 145-154. *Wiley Online Library*.
- GARNERY, L., P. FRANCK, E. BAUDRY, D. VAUTRIN, J.-M. CORNUET *et al.*, 1998a Genetic diversity of the west European honey bee (*Apis mellifera mellifera* and *A. m. iberica*) I. Mitochondrial DNA. *Genet. Sel. Evol.* **30**, pp. S31-S48.
- GARNERY, L., P. FRANCK, E. BAUDRY, D. VAUTRIN, J.-M. CORNUET *et al.*, 1998b Genetic diversity of the west European honey bee (*Apis mellifera mellifera* and *A. m. iberica*) II. Microsatellite loci. *Genet. Sel. Evol.* **30**, pp. S49-S74.
- JAFFÉ, R., V. DIETEMANN, R. M. CREWE and R. F. A. MORITZ, 2009 Temporal variation in the genetic structure of a drone congregation area: an insight into the population dynamics of wild African honeybees (*Apis mellifera scutellata*), pp. 1511-1522. *Wiley Online Library*.

- KOCHER, T. D., W. K. THOMAS, A. MEYER, S. V. EDWARDS, S. Pääbo *et al.*, 1989 Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers, pp. 6196-6200. National Acad Sciences.
- KOENIGER, N., G. KOENIGER and H. PECHHACKER, 2005 The nearer the better? Drones (*Apis mellifera*) prefer nearer drone congregation areas, pp. 31-35. Springer.
- KOENIGER, N., G. KOENIGER, S. TINGEK, A. KALITU and M. MARDAN, 1994 Drones of *Apis dorsata* (Fabricius 1793) congregate under the canopy of tall emergent trees in Borneo. *Apidologie* **25**: 249-264.
- KRAUS, F., S. WEINHOLD and R. MORITZ, 2008 Genetic structure of drone congregations of the stingless bee *Scaptotrigona mexicana*. *Insectes Sociaux* **55**: 22-27.
- LANGELLA, O., 1999 Populations 1.2. 30: a population genetic software. CNRS UPR9034, pp.
- MORITZ, R. F., V. DIETEMANN and R. CREWE, 2008 Determining colony densities in wild honeybee populations (*Apis mellifera*) with linked microsatellite DNA markers. *Journal of Insect Conservation* **12**: 455-459.
- MORTON, N. E., 1995 LODs past and present. *Genetics* **140**: 7-12.
- MUELLER, M. Y., R. F. MORITZ and F. B. KRAUS, 2012 Outbreeding and lack of temporal genetic structure in a drone congregation of the neotropical stingless bee *Scaptotrigona mexicana*. *Ecology and Evolution* **2**: 1304-1311.
- MUERRLE, T., H. HEPBURN and S. RADLOFF, 2007 Experimental determination of drone congregation areas for *Apis mellifera capensis* Esch. *Journal of apicultural research* **46**: 154-159.
- PAGE JR, R. E., and R. A. METCALF, 1982 Multiple mating, sperm utilization, and social evolution, pp. 263-281. JSTOR.
- PAGE, R. D. M., 1996 Tree View: An application to display phylogenetic trees on personal computers, pp. 357-358. Oxford Univ Press.
- PEER, D. F., 1957 Further Studies on the Mating Range of the Honey Bee, *Apis mellifera* L, pp. 108-110. Cambridge Univ Press.
- PERRIER, C., J. STRANGE, O. LANGELLA, W. S. SHEPPARD and L. GARNERY, 2003 Diversité génétique, introgressions mitochondriales et nucléaires dans une population d'abeilles des Landes de Gascogne, pp. 79-100.
- RAYMOND, M., and F. O. ROUSSET, 1995 GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism, pp. 248-249. Am Genetic Assoc.
- RHYMER, J. M., and D. SIMBERLOFF, 1996 Extinction by hybridization and introgression. *Annual Review of Ecology and Systematics*: 83-109.
- RUTTNER, F., 1988 *Biogeography and taxonomy of honeybees*. Springer-Verlag, Berlin.
- RUTTNER, F., E. MILNER, J. E. DEWS and J. E. DEWS, 2004 *The dark European honeybee: Apis mellifera mellifera Linnaeus 1758*. WritersPrintShop.
- SHEPPARD, W. S., and M. D. MEIXNER, 2003 *Apis mellifera pomonella*, a new honey bee subspecies from Central Asia, pp. 367-376. EDP SCIENCES.
- SOLIGNAC, M., D. VAUTRIN, A. LOISEAU, F. MOUGEL, E. BAUDRY *et al.*, 2003 Five hundred and fifty microsatellite markers for the study of the honeybee (*Apis mellifera* L.) genome, pp. 307-311. Wiley Online Library.
- VANENGELSDORP, D., J. D. EVANS, C. SAEGERMAN, C. MULLIN, E. HAUBRUGE *et al.*, 2009 Colony collapse disorder: a descriptive study. *PLoS One* **4**: e6481.
- VANENGELSDORP, D., and M. D. MEIXNER, 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* **103**.

- WALSH, P. S., D. A. METZGER and R. HIGUCHI, 1991 Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *BioTechniques* **10**: 506-513.
- WANG, J., 2004 Sibship reconstruction from genetic data with typing errors, pp. 1963-1979. *Genetics Soc America*.
- WATTANAACHAIYINGCHAROEN, W., B. P. OLDROYD, S. WONGSIRI, K. PALMER and J. PAAR, 2003 A scientific note on the mating frequency of *Apis dorsata*, pp. 85-86. *EDP SCIENCES*.
- WILLIAMS, J., 1987 Wind-directed pheromone trap for drone honey bees (Hyme, optera : Apidae). *Journal of economic entomology* **80**: 532-536.
- WINSTON, M. L., 1987 *The biology of the honey bee*. Harvard University Press.

## **Tables**

Table 1: Pairwise Fst values between the three sampled years in the DCA and the colonies surrounding the preservation center.

	DCA 2010	DCA 2011	DCA 2012
DCA 2011	0.0121		
DCA 2012	0.0193	0.0288	
Surr apiaries	0.0131	0.0261	0.0101

Table 2: Introgression level of the three sampled years in the DCA and the surrounding colonies calculated from allele frequencies of an admixture of C lineage populations. Values indicated are the mean calculated on 12 out of the 14 loci analysed and the standard error.

	DCA_2010	DCA_2011	DCA_2012	Queens_2010	Surr apiaries
introgression	0.160 ± 0.08	0.098 ± 0.042	0.160 ± 0.057	0.123 ± 0.044	0.216 ± 0.067

Table 3: Lod score values of each drone issued from one of the three drone producing colonies in 2010.

Sample Name	Queen LR25	Queen LR32	Queen LR56
DCA_18	-	3.52	-
DCA_33	-	-	3.75
DCA_68	-	4.67	-
DCA_72	3.67	-	-
DCA_76	-	1.66	-
DCA_78	-	4.07	-
DCA_82	-	4.37	-
DCA_85	-	-	3.77
DCA_88	-	-	4.74
DCA_94	-	-	4.02
DCA_97	-	-	2.95
DCA_98	-	-	2.68
DCA_100	-	5.73	-
DCA_107	-	4.55	-
DCA_108	-	-	4.34
DCA_115	-	-	3.1
DCA_119	-	-	3.71
DCA_126	-	-	4.28
DCA_127	-	2.54	-
DCA_137	-	4.09	-
DCA_140	-	-	2.80
DCA_157	-	5.37	-
DCA_160	-	3.95	-
DCA_169	-	-	4.95
DCA_182	-	-	3.39
DCA_183	-	2.77	-

Table 4: Total drone brood production by the experimental apiary colonies in 2010.

Colonies	Drone brood production
LR1	13
LR6	405
LR7	3617
LR8	4091
LR9	1277
LR11	908
LR14	2803
LR15	1662
LR16	4959
LR22	511
LR24	1280
LR25	57
LR26	1410
LR29	2331
LR30	1562
LR32	3554
LR33	112
LR34	2571
LR35	2291
LR37	1269
LR38	1282
LR42	467
LR44	3589
LR56	6397

## Figures

Figure 1: Graphical visualization of the results obtained with the program Structure when assuming three different subpopulations contributed to the DCA setup

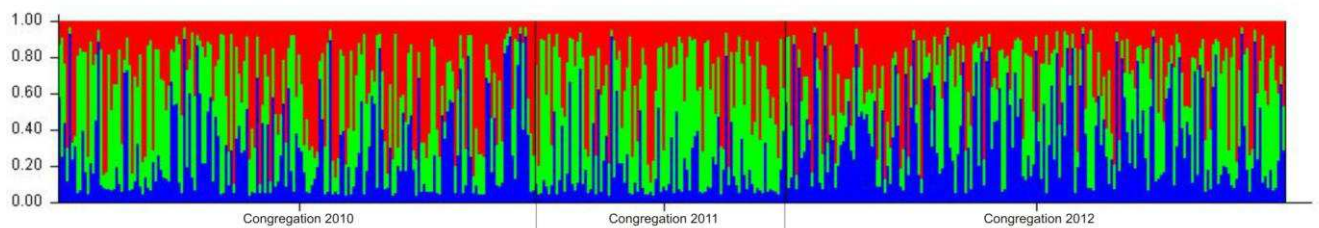


Figure 2: Unrooted neighbor-joining tree based on Cavalli-Sforza's distances between populations. The three sampled year in the DCA, the surrounding colonies, and hybrid selected strain between M and C lineages (Buckfast) and populations taken as references for the four lineages are represented.

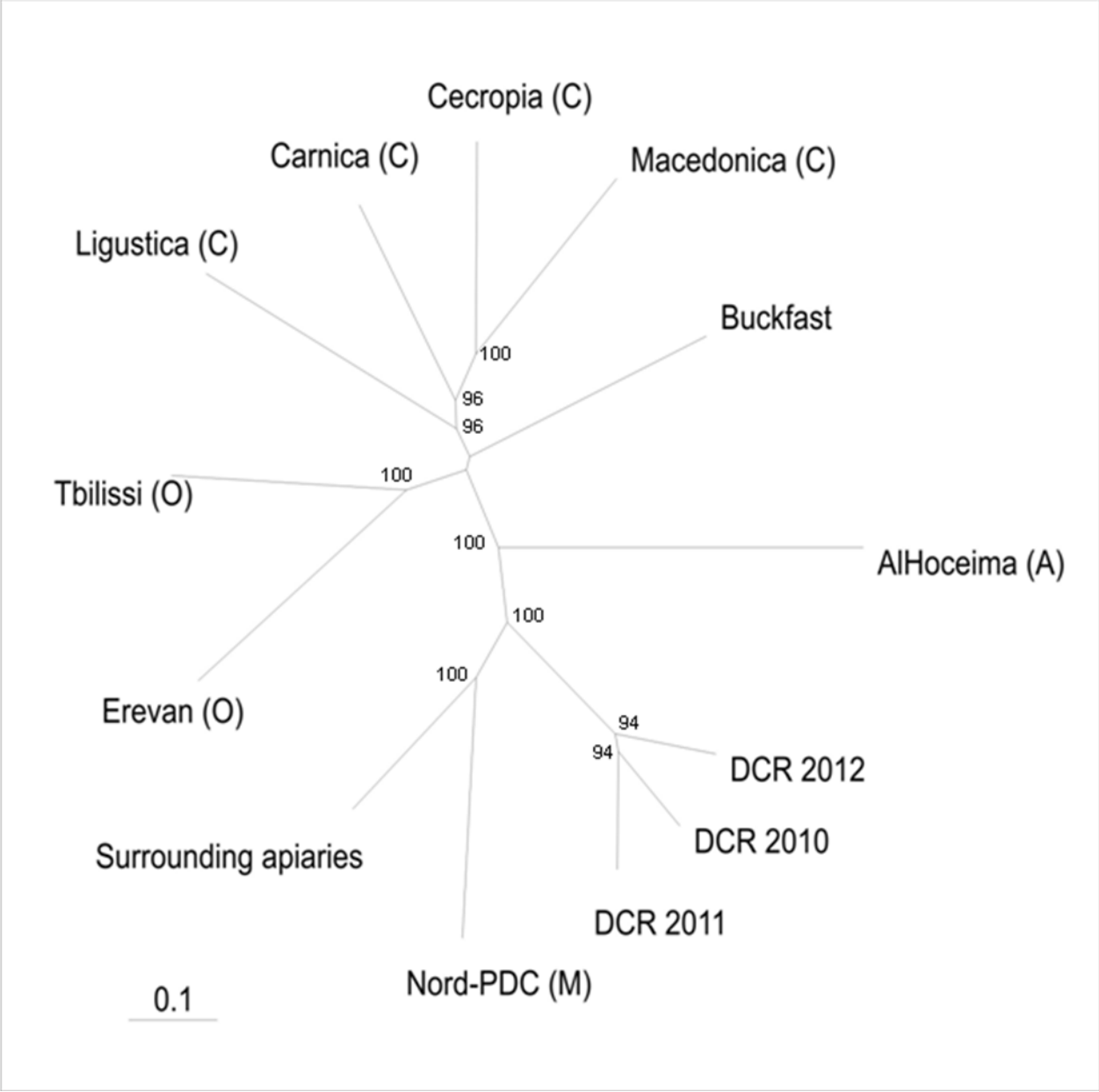
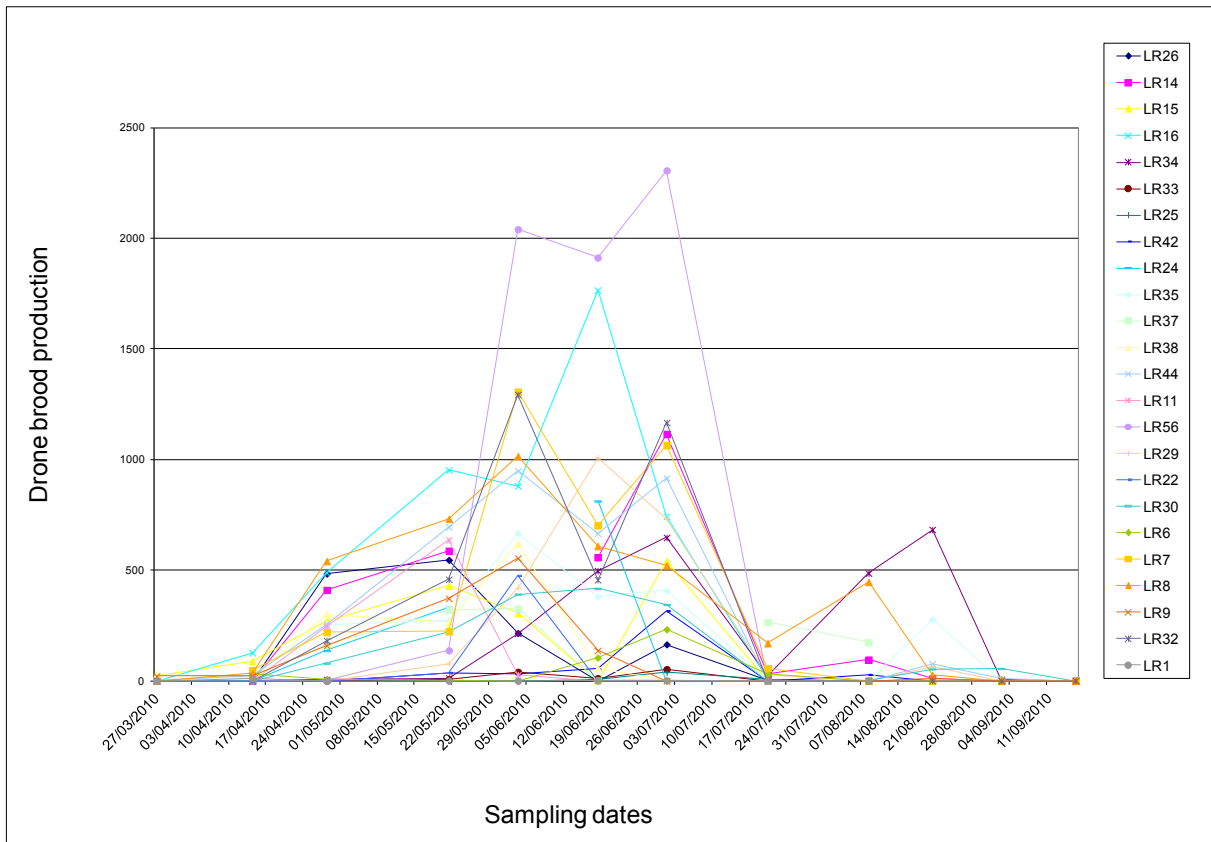


Figure 3: Drone brood production by each of the experimental apiary colonies in 2010.





# CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Cette thèse avait différents objectifs. Dans un premier temps, il s'agissait de caractériser génétiquement et de comparer six conservatoires Européens d'abeilles noires *Apis mellifera mellifera* (*A. m. mellifera*).

Ensuite, en étudiant plus particulièrement le conservatoire d'Ile-de-France (CANIF), j'ai pu déterminer les paramètres de conservation (comme la taille de la population et les flux de gènes), estimer les risques d'introgession liés à l'importation de colonies d'autres lignées évolutives et tester l'efficacité des actions de conservation sur une échelle de trois années consécutives.

Enfin, en analysant une congrégation de mâles au sein de ce même conservatoire, j'ai pu obtenir des résultats préliminaires concernant le comportement reproducteur d'une population à l'état naturel.

Les populations des conservatoires étudiés présentent, de manière générale, un niveau d'introgession d'au moins 10% (correspondant à des allèles allochtones). Cependant, le conservatoire d'Ouessant se distingue particulièrement. Cette étude a permis de montrer que les dernières populations pures d'abeilles noires, situées sur cette île ont une diversité génétique trop faible pour envisager un maintien et une conservation à long terme de la sous-espèce. Il faudrait cependant approfondir les recherches afin de différencier les introgressions naturelles (zones de contact naturelles entre deux sous-espèces, comme en Savoie) des introgressions artificielles liées à l'importation de colonies non locales.

L'utilisation des marqueurs neutres indépendants génétiquement a donc permis de caractériser le niveau d'introgession globale des populations françaises. J'ai pris le parti au cours de cette étude de considérer que tous les marqueurs étaient indépendants bien que certains soient liés physiquement (distance minimale entre marqueurs de 20cM). Cependant, l'analyse des quelques marqueurs, a priori liés physiquement, n'a pas permis de conclure quant à leur liaison génétique dans le cas présent. En effet, il semblerait que la présence d'introgession sur un locus donné ne coïncide pas obligatoirement avec la présence d'introgession sur le locus qui lui est associé. Par conséquent, la présence aléatoire d'allèles introgressés suggère des hybridations plutôt anciennes liées à des importations massives de colonies non locales, notamment dans les régions où l'apiculture professionnelle est rare, comme en Ile-de-France. En revanche, une augmentation du nombre de marqueurs présentant des allèles introgressés, est vraisemblablement le résultat d'hybridations plus récentes dans les zones où l'apiculture

professionnelle est intense, comme en Vendée, où dans des régions de contact naturel entre sous-espèces, comme en Savoie.

Ainsi, l'utilisation de marqueurs réellement liés génétiquement (plusieurs couples) permettrait de renseigner davantage sur l'ancienneté de l'hybridation entre sous-espèces. En effet, compte tenu du fort taux de recombinaison trouvé chez l'Abeille (BEYE *et al.* 2006), le déséquilibre de liaison entre marqueurs aura tendance à être très rapidement perdu avec l'utilisation de marqueurs indépendants. Au contraire, avec des marqueurs génétiquement liés, ce déséquilibre de liaison sera conservé plus longtemps dans la descendance.

Concernant l'étude des fratries, l'utilisation simultanée de marqueurs indépendants avec des marqueurs liés génétiquement permettrait également de réduire la probabilité d'obtenir des génotypes identiques par hasard entre deux individus différents. Cette approche confirmerait les génotypes des reines déjà estimés *via* les génotypes des ouvrières grâce aux marqueurs indépendants. Cela permettrait également de discriminer les fratries réelles dans les congrégations de mâles, et d'avoir une estimation plus fiable du nombre effectif de colonies participant à la formation de la congrégation de mâles.

Toutefois, en considérant le nombre important de locus analysés par individu (14 locus), les études présentées dans ce travail possèdent une finesse non négligeable, bien que réalisées à partir de marqueurs indépendants. Pour caractériser encore davantage ces populations, l'utilisation de technique de manipulation d'ADN « historique » (échantillons de musée datant du XIX<sup>ème</sup> siècle par exemple) semble envisageable. Ces techniques progressent rapidement, et deviennent accessibles pour l'analyse de populations d'invertébrés comme la cicindèle (*Cicindela dorsalis*), insecte menacé d'extinction (GOLDSTEIN and DESALLE 2003). Appliquées à l'Abeille, ces techniques permettraient, à condition d'avoir un échantillonnage suffisant, de donner une vraie caractérisation de la diversité d'*A. m. mellifera* avant les importations. Des haplotypes spécifiques de régions géographiques ainsi que des allèles réellement diagnostiques des différentes lignées pourraient éventuellement même être identifiés.

L'étude du conservatoire d'Ile-de-France a été porteuse sur plusieurs points. L'ADN mitochondrial a montré qu'en dix ans, le nombre de colonies non locales avait significativement augmenté (passage de 50% à plus de 60%). Toutefois les analyses portant

sur l'ADN nucléaires mettent en évidence que ces reines importées ont été fécondées par des mâles locaux (taux d'introgression de l'ordre de 20%), et ce à l'intérieur même du conservatoire comme dans les populations environnantes. Ce résultat semble donc encourageant aux vues des efforts de conservation mis en place.

Une hypothèse suggérée lors de cette thèse serait la présence d'essaïms sauvages dans la région Ile-de-France. En effet, la contribution des colonies à la formation de la congrégation en 2010 est trop faible pour exclure la contribution de colonies avoisinantes. Toutefois, avant d'affirmer que ces essaïms sauvages seraient effectivement présents, il faudrait tout d'abord échantillonner l'ensemble des colonies du conservatoire, ainsi que les populations autour du conservatoire dans un rayon de 15 km (distance maximale observée entre une congrégation et une colonie dont était issue l'un des mâles analysés, (JENSEN *et al.* 2005b)). Cette analyse demanderait un fort investissement financier et temporel, puisqu'elle nécessiterait le génotypage de plus de 10 000 ouvrières (correspondant aux 200 colonies présentes au sein du conservatoire en 2012 ainsi qu'aux 280 colonies autour du conservatoire, sachant que l'obtention du génotype d'une reine demande l'analyse de 22 ouvrières au minimum, l'obtention des fratries quant à elle nécessite l'analyse de 48 ouvrières par colonie).

En ce qui concerne les congrégations de mâles, troisième volet de cette étude, l'hypothèse de la présence d'autres congrégations non loin du rucher expérimental est retenue. Cette hypothèse est en accord avec les observations d'études précédentes (KOENIGER *et al.* 2005; MUELLER *et al.* 2012b). La recherche de ces autres congrégations doit donc être envisagée afin de tester l'une des hypothèses émises au cours de cette thèse, à savoir que comme chez les espèces d'abeilles monoandres, les faux-bourçons ne se rendraient pas préférentiellement dans des congrégations plus proches. Une expérience envisageable serait du marquage/recapture des mâles du rucher expérimental, une fois les congrégations identifiées. Toutefois, il faudrait alors considérer les biais induits par le stress lié au marquage des mâles, à savoir la fatigue des mâles qui seraient donc moins enclin à se rendre dans les congrégations, ainsi que les effets de prédatons, augmentées avec la présence d'un marquage sur le thorax des mâles. Une solution serait alors l'utilisation de poudres fluorescentes, non détectables à l'œil nu. Une autre expérience serait également possible. Il s'agit de l'utilisation de puces RFID (Radio Frequency IDentification) qui permettrait de visualiser le déplacement des faux-bourçons grâce à des images satellites. La détection des différentes congrégations serait alors plus facile, si l'on considère que tous les mâles ont la même probabilité de gagner

chaque congrégation. Cette expérience de marquage avec des puces RFID permettrait également l'étude des mâles issus d'ouvrières (colonies bourdonneuses ou lorsque le « worker-policing » est inefficace). En effet, suite aux observations de surface de couvain, on remarque que les alvéoles de mâles sont regroupées sur les cadres, mais certaines alvéoles sont complètement isolées. Une hypothèse serait que ces alvéoles isolées seraient dues à la ponte d'ouvrières. Toutefois cette technique est très onéreuse et nécessite un nombre important de puces (plus de 600 puces utilisées lors d'une étude sur l'effet des pesticides sur le butinage des ouvrières, (HENRY *et al.* 2012)).

Les questions quant à la conservation de l'Abeille Noire restent multiples, notamment celle de la conservation de sous-espèces. Ce concept est, en effet, sujet à débat. Le terme sous-espèce défini par Linné selon des critères morphologiques, est considéré par certains comme « le concept le plus critique et désordonné de la systématique moderne » (WILSON and BROWN 1953). Les sous-espèces seraient en fait le reflet de l'adaptation locale des espèces et seules des analyses génétiques permettraient de les valider définitivement (CHAMPLOT 2010). Dans le cas de l'Abeille, les sous-espèces déterminées morphologiquement ont été validées par des analyses moléculaires. Ainsi, 26 sous-espèces différentes ont été identifiées, dont 10 présentes en Europe.

En plus des différentes maladies que subissent les abeilles, l'apiculture moderne joue un rôle non négligeable dans le déclin des colonies. En effet, les importations massives de colonies non locales ont tendance à déstructurer et homogénéiser la diversité des lignées géographiquement identifiées. L'élevage de reines influencerait également la baisse de diversité génétique des populations. Des analyses ont montré que seulement 500 éleveurs avaient fourni la majorité des colonies en place aux Etats-Unis (SCHIFF and SHEPPARD 1996; DELANEY *et al.* 2009). En ce qui concerne l'Europe, aucune étude n'a été entreprise pour déterminer le nombre d'éleveurs et les sous-espèces utilisées.

La diversité génétique joue un rôle primordial à l'échelle de la colonie. Elle permet de meilleures résistances aux maladies, thermorégulations, et valeurs adaptatives (TARPY and NIELSEN 2002). Ainsi, en sélectionnant certaines colonies selon des critères de production de miel, une contre-sélection des caractères de résistance aux maladies peut avoir lieu.

La question de la conservation de l'adaptation locale mérite également d'être posée. L'adaptation locale signifie qu'au cours des générations successives, certaines colonies seront meilleures que d'autres. Cela sous entend qu'elles sont mieux adaptées à leur environnement et à leurs pathogènes. En absence d'importation de colonies, cette adaptation se fait selon le principe de sélection naturelle. Toutefois, cette sélection naturelle se fait de moins en moins en apiculture moderne. (RUTTNER and RUTTNER 1972) a défini des caractéristiques appelées « performances » (production de miel, essaimage, douceur) liées à chaque lignée évolutive. Ces performances sont reconnues dans l'Europe entière et servent de base pour la commercialisation de colonies. Ainsi, en favorisant ces performances au détriment de caractères liés à la résistance aux pathogènes, des colonies moins bien adaptées seront artificiellement maintenues par nourrissage et traitement contre les parasites. Ces colonies moins adaptées pourraient sembler à tort en meilleure santé que des colonies non traitées et pourraient alors servir de référence dans l'élevage de reine et la production de mâles (DUAY *et al.* 2002). En définitive, ces colonies artificiellement maintenues auraient plus de chance de perdurer au cours des générations futures que celles qui seraient, selon la sélection naturelle, les mieux adaptées.

Une expérience intéressante afin de discriminer ces colonies naturellement mieux adaptées serait que tous les conservatoires européens laissent les colonies « se débrouiller seules ». En absence de traitement contre *Varroa destructor* (acarien importé, parasite de l'Abeille) et de nourriture autre que les récoltes faites par la colonie elle-même, seules les colonies les plus adaptées survivront (communication personnelle avec Dorian Pritchard). Ainsi, l'adaptation locale serait mise en avant. Les colonies ayant survécu à l'expérience pourraient alors servir de base à la mise en place d'un conservatoire Européen d'*A. m. mellifera*.

Les conservatoires d'abeilles ne peuvent être maintenus qu'avec l'aide des apiculteurs locaux. Le cas du conservatoire mis en place sur l'île danoise de Læsø peut servir d'exemple dans ce cas précis. Une décision de justice a rendu dès 1998 l'importation d'espèces et de sous-espèces non-locales illégale sur l'île, afin de favoriser la conservation d'*A. m. mellifera*. Toutefois, un recensement génétique des colonies fait en 2003 a démontré que seulement 35% des colonies étaient identifiées comme *A. m. mellifera* alors que 55% étaient identifiées comme hybrides et 10% comme *A. m. ligustica*, sous-espèce appartenant à la lignée C (JENSEN *et al.* 2005a). Cette démarche répressive s'est donc avérée peu efficace.

L'arrêt de l'importation de colonies à fort rendement ne sera pas facile. Cette pratique est très couramment utilisée en apiculture moderne. Dans l'apiculture professionnelle, les abeilles mellifères ont un intérêt économique très important, rendant donc l'utilisation de lignées allochtones plus productrices d'autant plus tentante. Si l'on considère le faible impact que la législation a eu sur la conservation de l'Abeille Noire sur l'île de Læsø, une alternative serait de récompenser les efforts de conservation. Ces récompenses pourraient être soit l'augmentation des prix des produits issus d'*A. m. mellifera*, soit la subvention des apiculteurs utilisant les sous-espèces locales. La réglementation européenne de l'apiculture biologique (EC n° 1804/1999) statue « qu'il est préférable d'utiliser les lignées Européennes d'*A. mellifera* et les écotypes locaux ». Rendre cette clause, non plus préférable, mais obligatoire pour l'obtention du label apiculture biologique serait un premier pas vers la protection légale de l'Abeille Noire *A. m. mellifera*.

Dans le cadre plus global de la conservation de l'espèce, si l'on se réfère aux critères nécessaires pour qu'un taxon soit inclus dans la Liste Rouge de l'Union Internationale pour la Conservation de la Nature (CATEGORIES 2001), l'Abeille Mellifère devrait être considérée au minimum comme Taxon Vulnérable. En effet, au cours des dernières décennies, le syndrome d'effondrement des colonies, dont les raisons sont multiples, a causé la perte aux Etats-Unis de plus de 25% du cheptel total (allant jusqu'à 90% localement). De même, selon des publications récentes, les colonies sauvages pourraient avoir complètement disparues en Europe (JAFTE *et al.* 2009). Ceci confirme l'urgence de l'entrée de l'Abeille Mellifère dans la Liste Rouge de l'UICN.

En considérant que les populations d'abeilles des Etats-Unis sont issues d'un nombre trop restreint de colonies (diversité génétique trop basse), le fait que le syndrome d'effondrement y soit plus important qu'en Europe est donc compréhensible. Les colonies n'ont plus la capacité d'adaptation et de résistance aux pathogènes, nécessaire à leur survie. Ainsi, non seulement cela souligne le caractère indispensable de la diversité génétique, mais également l'importance de l'adaptation locale des différentes sous-espèces (dont *A. m. mellifera* dans cette étude). Il apparaît donc que l'Abeille Noire *A. m. mellifera* doit être considérée comme en danger, et ce sans attendre.

Malgré ce déclin de populations quasi généralisé, on estime souvent que l'Abeille n'est pas en danger. La production relativement stable de miel ainsi que les critères peu applicables aux insectes de l'UICN peuvent paraître faussement rassurants. Le statut de l'Abeille reste

relativement à part, étant donné la visibilité scientifique donnée à cette espèce. Les résultats assez préoccupants obtenus dans cette étude et qui corroborent des hypothèses précédemment émises semblent toutefois appeler à la vigilance. L'Abeille reflète, en effet, au sein de son habitat naturel non seulement l'état des populations d'insectes mais au-delà, celui de son écosystème dans son ensemble.



REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

- ABRÀMOFF, M. D., P. J. MAGALHÃES and S. J. RAM, 2004 Image processing with ImageJ. *Biophotonics international* **11**: 36-42.
- ADAM, B., 1983 *In search of the best strains of bees*. Northern Bee Books.
- ALLENDORF, F. W., R. F. LEARY, P. SPRUELL and J. K. WENBURG, 2001 The problems with hybrids: setting conservation guidelines, pp. 613-622. Elsevier.
- ARIAS, M. C., and W. S. SHEPPARD, 2005 Phylogenetic relationships of honey bees (Hymenoptera: Apinae: Apini) inferred from nuclear and mitochondrial DNA sequence data, pp. 25-35. Elsevier.
- ARISTOTLE, and P. LOUIS, 1964 *Aristote: Histoire des animaux*. Société d'Edition "Les Belles Lettres".
- ARNOLD, G., B. QUENET, C. PAPIN, C. MASSON and W. H. KIRCHNER, 2002 Intra-Colonial Variability in the Dance Communication in Honeybees (*Apis mellifera*). *Ethology* **108**: 751-761.
- ARNQVIST, G. R., and T. NILSSON, 2000 The evolution of polyandry: multiple mating and female fitness in insects, pp. 145-164. Elsevier.
- BAUDRY, E., M. SOLIGNAC, L. GARNERY, M. GRIES, J. CORNUET *et al.*, 1998 Relatedness among honeybees (*Apis mellifera*) of a drone congregation. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* **265**: 2009-2014.
- BENJAMINI, Y., and Y. HOCHBERG, 1995 Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)* **57**: 289-300.
- BERTRAND, B., in preparation Diversité génétique et introgression de conservatoires d'*Apis mellifera mellifera* en Europe.
- BERTRAND, B., S. MOULIN, H. LEGOUT, F. MOUGEL, M. ALBURAKI *et al.*, submitted The Use of Mitochondrial Markers for The Conservation of Honeybee Populations (*Apis mellifera*, L.): An Applied Approach. *PLoS One*.
- BEYE, M., I. GATTERMEIER, M. HASSELMANN, T. GEMPE, M. SCHIOETT *et al.*, 2006 Exceptionally high levels of recombination across the honey bee genome. *Genome Res* **16**: 1339-1344.
- BEYE, M., M. HASSELMANN, M. K. FONDRK, R. E. PAGE JR and S. W. OMHOLT, 2003 The Gene "csd" Is the Primary Signal for Sexual Development in the Honeybee and Encodes an SR-Type Protein, pp. 419-429. Elsevier.
- BIESMEIJER, J. C., S. P. ROBERTS, M. REEMER, R. OHLEMULLER, M. EDWARDS *et al.*, 2006 Parallel declines in pollinators and insect-pollinated plants in Britain and the Netherlands. *Science* **313**: 351-354.
- BOOMSMA, J. J., and F. L. W. RATNIEKS, 1996 Paternity in eusocial Hymenoptera, pp. 947-975. The Royal Society.
- BOOMSMA, J. J., and L. SUNDSTRÖM, 1998 Patterns of paternity skew in *Formica* ants, pp. 85-92. Springer.
- BOUGA, M., P. C. HARIZANIS, G. KILIAS and S. ALAHOTIS, 2005 Genetic divergence and phylogenetic relationships of honey bee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) populations from Greece and Cyprus using PCR-RFLP analysis of three mtDNA segments, pp. 335. EDP SCIENCES.
- BOURSOT, P., and F. BONHOMME, 1986 Génétique et évolution du génome mitochondrial des Métazoaires, pp. 73.
- BROWN, M. J., and R. J. PAXTON, 2009 The conservation of bees: a global perspective. *Apidologie* **40**: 410-416.
- BROWN, W. M., 1983 *Evolution of animal mitochondrial DNA*, pp. New York: Sinauer Assotition Inc Press.

- BRUFORD, M. W., D. G. BRADLEY and G. LUIKART, 2003 DNA markers reveal the complexity of livestock domestication. *Nat Rev Genet* **4**: 900-910.
- BUTCHART, S. H. M., M. WALPOLE, B. COLLEN, A. VAN STRIEN, J. P. W. SCHARLEMANN *et al.*, 2010 Global Biodiversity: Indicators of Recent Declines, pp. 1164-1168. Science.
- CATEGORIES, I. R. L., 2001 Criteria, version 3.1. IUCN Species Survival Commission, Gland, Switzerland.
- CAVALLI-SFORZA, L. L., and A. W. EDWARDS, 1967a Phylogenetic analysis. Models and estimation procedures. *Am J Hum Genet* **19**: 233-257.
- CAVALLI-SFORZA, L. L., and A. W. EDWARDS, 1967b Phylogenetic analysis. Models and estimation procedures. *American journal of human genetics* **19**: 233.
- CHÂLINE, N., F. L. RATNIEKS, N. E. RAINE, N. S. BADCOCK and T. BURKE, 2004 Non lethal sampling of honey bee, *Apis mellifera*, DNA using wing tips. *Apidologie* **35**: 311-318.
- CHAMPLLOT, S., 2010 Phylogéographie au Pléistocène et à l'Holocène et domestication des Equidés, pp. Paris-Sud XI.
- CHAPUISAT, M., 1998 Mating frequency of ant queens with alternative dispersal strategies, as revealed by microsatellite analysis of sperm, pp. 1097-1105. Wiley Online Library.
- CHINNERY, P. F., and E. A. SCHON, 2003 Mitochondria, pp. 1188-1199. BMJ Publishing Group Ltd.
- COLE, B. J., 1983 Multiple mating and the evolution of social behavior in the Hymenoptera, pp. 191-201. Springer.
- COOK, J. M., 1993 Sex determination in the Hymenoptera: a review of models and evidence, pp. 421-421. BLACKWELL SCIENTIFIC PUBLICATIONS.
- COOK, J. M., and R. H. CROZIER, 1995 Sex determination and population biology in the Hymenoptera, pp. 281-286. Elsevier.
- CORNUET, J.-M., L. GARNERY and M. SOLIGNAC, 1991 Putative origin and function of the intergenic region between COI and COII of *Apis mellifera* L. mitochondrial DNA, pp. 393-403. Genetics Soc America.
- CRANE, E., 1999 *The world history of beekeeping and honey hunting*. Taylor & Francis.
- CROZIER, R. H., and P. C. CONSUL, 1976 Conditions for genetic polymorphism in social Hymenoptera under selection at the colony level, pp. 1-9. Elsevier.
- CROZIER, R. H., and E. J. FJERDINGSTAD, 2001 Polyandry in social Hymenoptera-disunity in diversity, pp. 267-285 in *Annales Zoologici Fennici*.
- CROZIER, R. H., and R. E. PAGE, 1985 On being the right size: male contributions and multiple mating in social Hymenoptera, pp. 105-115. Springer.
- CROZIER, R. H., and P. PAMILO, 1996 Evolution of socialinsect colonies, pp. Oxford University Press, Oxford, UK.
- DANFORTH, B. N., J. FANG and S. SIPES, 2006a Analysis of family-level relationships in bees (Hymenoptera: Apiformes) using 28S and two previously unexplored nuclear genes: CAD and RNA polymerase II, pp. 358-372. Elsevier.
- DANFORTH, B. N., S. SIPES, J. FANG and S. N. G. BRADY, 2006b The history of early bee diversification based on five genes plus morphology, pp. 15118-15123. National Acad Sciences.
- DAVIES, K. F., C. R. MARGULES and J. F. LAWRENCE, 2000 Which traits of species predict population declines in experimental forest fragments? *Ecology* **81**: 1450-1461.
- DE LA RUA, P., J. SERRANO and J. GALIAN, 2002 Biodiversity of *Apis mellifera* populations from Tenerife (Canary Islands) and hybridisation with East European races, pp. 59-67. Springer.
- DELANEY, D. A., M. D. MEIXNER, N. M. SCHIFF and W. S. SHEPPARD, 2009 Genetic characterization of commercial honey bee (Hymenoptera: Apidae) populations in the

- United States by using mitochondrial and microsatellite markers. *Annals of the Entomological Society of America* **102**: 666-673.
- DELAPLANE, K. S., and D. F. MAYER, 2000 *Crop pollination by bees*. Cabi.
- DUAY, P., D. DE JONG and W. ENGELS, 2002 Decreased flight performance and sperm production in drones of the honey bee (*Apis mellifera*) slightly infested by *Varroa destructor* mites during pupal development. *Genet. Mol. Res* **1**: 227-232.
- ESTOUP, A., L. GARNERY, M. SOLIGNAC and J.-M. CORNUET, 1995 Microsatellite variation in honey bee (*Apis mellifera* L.) populations: hierarchical genetic structure and test of the infinite allele and stepwise mutation models, pp. 679-695. *Genetics Soc America*.
- ESTOUP, A., M. SOLIGNAC and J.-M. CORNUET, 1994 Precise assessment of the number of patriline and of genetic relatedness in honeybee colonies, pp. 1-7. *The Royal Society*.
- EVANNO, G., S. REGNAUT and J. GOUDET, 2005 Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study, pp. 2611-2620. *Wiley Online Library*.
- FALUSH, D., M. STEPHENS and J. K. PRITCHARD, 2003 Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies, pp. 1567-1587. *Genetics Soc America*.
- FEWELL, J. H., and R. E. PAGE JR, 1993 Genotypic variation in foraging responses to environmental stimuli by honey bees, *Apis mellifera*, pp. 1106-1112. *Springer*.
- FRANCK, P., L. GARNERY, G. CELEBRANO, M. SOLIGNAC and J. M. CORNUET, 2000a Hybrid origins of honeybees from Italy (*Apis mellifera ligustica*) and Sicily (*A. m. sicula*), pp. 907-921. *Wiley Online Library*.
- FRANCK, P., L. GARNERY, A. LOISEAU, B. P. OLDROYD, H. R. HEPBURN *et al.*, 2001 Genetic diversity of the honeybee in Africa: microsatellite and mitochondrial data, pp. 420-430. *Wiley Online Library*.
- FRANCK, P., L. GARNERY, M. SOLIGNAC and J.-M. CORNUET, 1998b The origin of west European subspecies of honeybees (*Apis mellifera*): new insights from microsatellite and mitochondrial data. *Evolution*: 1119-1134.
- FRANCK, P., L. GARNERY, M. SOLIGNAC and J.-M. CORNUET, 2000b Molecular confirmation of a fourth lineage in honeybees from the Near East. *Apidologie* **31**: 167-180.
- FRANKHAM, R., and K. RALLS, 1998 Conservation biology: inbreeding leads to extinction. *Nature* **392**: 441-442.
- GARNERY, L., J. M. CORNUET and M. SOLIGNAC, 1992 Evolutionary history of the honey bee *Apis mellifera* inferred from mitochondrial DNA analysis, pp. 145-154. *Wiley Online Library*.
- GARNERY, L., P. FRANCK, E. BAUDRY, D. VAUTRIN, J.-M. CORNUET *et al.*, 1998a Genetic diversity of the west European honey bee (*Apis mellifera mellifera* and *A. m. iberica*) I. Mitochondrial DNA. *Genet. Sel. Evol.* **30**, pp. S31-S48.
- GARNERY, L., P. FRANCK, E. BAUDRY, D. VAUTRIN, J.-M. CORNUET *et al.*, 1998b Genetic diversity of the west European honey bee (*Apis mellifera mellifera* and *A. m. iberica*) II. Microsatellite loci. *Genet. Sel. Evol.* **30**, pp. S49-S74.
- GARNERY, L., M. SOLIGNAC, G. CELEBRANO and J. M. CORNUET, 1993 A simple test using restricted PCR-amplified mitochondrial DNA to study the genetic structure of *Apis mellifera* L. *Experientia* **49**: 1016-1021.
- GOLDSTEIN, P. Z., and R. DESALLE, 2003 Calibrating phylogenetic species formation in a threatened insect using DNA from historical specimens. *Mol Ecol* **12**: 1993-1998.
- HABERL, M., and D. TAUTZ, 1998 Sperm usage in honey bees, pp. 247-255. *Springer*.
- HALE, E. B., 1969 Domestication and the evolution of behaviour, pp. 22-42.

- HAMILTON, W. D., 1987 Kinship, recognition, disease, and intelligence: constraints of social evolution, pp. 81-102. Japan Sci. Soc. Press, Tokyo.
- HENRY, M., M. BEGUIN, F. REQUIER, O. ROLLIN, J. F. ODOUX *et al.*, 2012 A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. *Science* **336**: 348-350.
- HILTON-TAYLOR, C., and R. A. MITTERMEIER, 2000 *2000 IUCN red list of threatened species*. Iucn.
- HOOD, J. L., A. P. JALLOUK, N. CAMPBELL, L. RATNER and S. A. WICKLINE, 2013 Cytolytic nanoparticles attenuate HIV-1 infectivity. *Antivir Ther* **18**: 95-103.
- HURST, L. D., and J. R. PECK, 1996 Recent advances in understanding of the evolution and maintenance of sex, pp. 46-52. Elsevier.
- JAFFÉ, R., V. DIETEMANN, R. M. CREWE and R. F. A. MORITZ, 2009 Temporal variation in the genetic structure of a drone congregation area: an insight into the population dynamics of wild African honeybees (*Apis mellifera scutellata*), pp. 1511-1522. Wiley Online Library.
- JEAN-PROST, P., 1957 Observation sur le vol nuptial des reines d'abeilles. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*.
- JENSEN, A. B., K. A. PALMER, J. J. BOOMSMA and B. V. PEDERSEN, 2005a Varying degrees of *Apis mellifera ligustica* introgression in protected populations of the black honeybee, *Apis mellifera mellifera*, in northwest Europe. *Molecular Ecology* **14**: 93-106.
- JENSEN, A. B., K. A. PALMER, N. CHALINE, N. E. RAINE, A. TOFILSKI *et al.*, 2005b Quantifying honey bee mating range and isolation in semi-isolated valleys by DNA microsatellite paternity analysis, pp. 527-537. Springer.
- JENSEN, A. B., K. A. PALMER, N. CHALINE, N. E. RAINE, A. TOFILSKI *et al.*, 2005b Quantifying honey bee mating range and isolation in semi-isolated valleys by DNA microsatellite paternity analysis, pp. 527-537. Springer.
- KAUHAUSEN-KELLER, D., and R. KELLER, 1994 Morphometrical control of pure race breeding in the honeybee (*Apis mellifera* L), pp. 133-143.
- KELLER, L. F., and D. M. WALLER, 2002 Inbreeding effects in wild populations. *Trends in Ecology & Evolution* **17**: 230-241.
- KLEIN, A.-M., B. E. VAISSIERE, J. H. CANE, I. STEFFAN-DEWENTER, S. A. CUNNINGHAM *et al.*, 2007 Importance of pollinators in changing landscapes for world crops, pp. 303-313. The Royal Society.
- KOCHER, T. D., W. K. THOMAS, A. MEYER, S. V. EDWARDS, S. PÄÄBO *et al.*, 1989a Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **86**: 6196-6200.
- KOENIGER, N., G. KOENIGER and H. PECHHACKER, 2005 The nearer the better? Drones (*Apis mellifera*) prefer nearer drone congregation areas, pp. 31-35. Springer.
- KOENIGER, N., G. KOENIGER, S. TINGEK, A. KALITU and M. MARDAN, 1994 Drones of *Apis dorsata* (Fabricius 1793) congregate under the canopy of tall emergent trees in Borneo. *Apidologie* **25**: 249-264.
- KRAUS, F., S. WEINHOLD and R. MORITZ, 2008 Genetic structure of drone congregations of the stingless bee *Scaptotrigona mexicana*. *Insectes Sociaux* **55**: 22-27.
- KREMEN, C., N. M. WILLIAMS, M. A. AIZEN, B. GEMMILL, H. HERREN, G. LEBUHN *et al.*, 2007 Pollination and other ecosystem services produced by mobile organisms: A conceptual framework for the effects of land use change, pp. 299-314. Wiley Online Library.
- KRIEGER, M. J. B., K. G. ROSS, C. W. Y. CHANG and L. KELLER, 1999 Frequency and origin of triploidy in the fire ant *Solenopsis invicta*, pp. 142-150. Nature Publishing Group.

- KRYGER, P., and R. F. A. MORITZ, 1997 Lack of kin recognition in swarming honeybees (*Apis mellifera*), pp. 271-276. Springer.
- LANGELLA, O., 1999 Populations 1.2. 30: a population genetic software. CNRS UPR9034, pp.
- LEARY, R. F., F. W. ALLENDORF and S. H. FORBES, 1993 Conservation genetics of bull trout in the Columbia and Klamath River drainages. *Conservation Biology* **7**: 856-865.
- LEONARD, J. A., and R. K. WAYNE, 2008 Native Great Lakes wolves were not restored, pp. 95-98.
- LINNAEUS, C., 1758 *Systema naturae*, vol. 1, pp.
- LOPER, G. M., W. W. WOLF and O. R. TAYLOR, 1987 Detection and monitoring of honeybee drone congregation areas by radar, pp.
- LYNCH, M., and B. WALSH, 1998 *Genetics and analysis of quantitative traits*.
- MANK, J. E., J. E. CARLSON and M. C. BRITTINGHAM, 2004 A century of hybridization: decreasing genetic distance between American black ducks and mallards. *Conservation Genetics* **5**: 395-403.
- MICHENER, C. D., 1944 Comparative external morphology, phylogeny, and a classification of the bees (Hymenoptera). *Bulletin of the AMNH*; v. 82, article 6, pp. New York:[American Museum of Natural History].
- MICHENER, C. D., 2000 *The bees of the world*. JHU Press.
- MORITZ, R., 1991 The limitations of biometric control on pure race breeding in. *Apis mellifera*: 54-59.
- MORITZ, R. F., V. DIETEMANN and R. CREWE, 2008 Determining colony densities in wild honeybee populations (*Apis mellifera*) with linked microsatellite DNA markers. *Journal of Insect Conservation* **12**: 455-459.
- MORITZ, R. F. A., C. F. HAWKINS, R. H. CROZIER and A. G. MACKINLEY, 1986 A mitochondrial DNA polymorphism in honeybees (*Apis mellifera* L.), pp. 322-324. Springer.
- MORITZ, R. F. A., and E. E. SOUTHWICK, 1992 *Bees as superorganisms: an evolutionary reality*. Springer Verlag.
- MORTON, N. E., 1995 LODs past and present. *Genetics* **140**: 7-12.
- MUELLER, M. Y., R. F. MORITZ and F. B. KRAUS, 2012a Outbreeding and lack of temporal genetic structure in a drone congregation of the neotropical stingless bee *Scaptotrigona mexicana*. *Ecology and Evolution* **2**: 1304-1311.
- MUERRLE, T., H. HEPBURN and S. RADLOFF, 2007 Experimental determination of drone congregation areas for *Apis mellifera capensis* Esch. *Journal of apicultural research* **46**: 154-159.
- NADERI, S., H.-R. REZAEI, P. TABERLET, S. ZUNDEL, S.-A. RAFAT *et al.*, 2007 Large-scale mitochondrial DNA analysis of the domestic goat reveals six haplogroups with high diversity, pp. e1012. Public Library of Science.
- NEUMANN, P., and R. F. A. MORITZ, 2000 Testing genetic variance hypotheses for the evolution of polyandry in the honeybee (*Apis mellifera* L.), pp. 271-279. Springer.
- ORLANDO, L., J. A. LEONARD, A. THENOT, V. LAUDET, C. GUERIN *et al.*, 2003 Ancient DNA analysis reveals woolly rhino evolutionary relationships, pp. 485-499. Elsevier.
- PAGE JR, R. E., and R. A. METCALF, 1982 Multiple mating, sperm utilization, and social evolution, pp. 263-281. JSTOR.
- PAGE, R. D. M., 1996 *Tree View: An application to display phylogenetic trees on personal computers*, pp. 357-358. Oxford Univ Press.
- PALMER, K. A., and B. P. OLDROYD, 2000 Evolution of multiple mating in the genus *Apis*. *Apidologie* **31**: 235-248.

- PAMILO, P., L. SUNDSTRÖM, W. FORTELIUS and R. ROSENGREN, 1994 Diploid males and colony-level selection in *Formica* ants, pp. 221-235. Taylor & Francis.
- PEAKALL, R. O. D., and P. E. SMOUSE, 2006 GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research, pp. 288-295. Wiley Online Library.
- PEER, D. F., 1957 Further Studies on the Mating Range of the Honey Bee, *Apis mellifera* L, pp. 108-110. Cambridge Univ Press.
- PERRIER, C., J. STRANGE, O. LANGELLA, W. S. SHEPPARD and L. GARNERY, 2003a Diversité génétique, introgressions mitochondriales et nucléaires dans une population d'abeilles des Landes de Gascogne, pp. 79-100.
- PERRY, W. L., D. M. LODGE and J. L. FEDER, 2002a Importance of Hybridization Between Indigenous and Nonindigenous Freshwater Species: An Overlooked Threat to North American Biodiversity, pp. 255-275.
- PERRY, W. L., D. M. LODGE and J. L. FEDER, 2002b Importance of hybridization between indigenous and nonindigenous freshwater species: an overlooked threat to North American biodiversity. *Systematic Biology* **51**: 255-275.
- PRICE, E. O., 1984 Behavioral aspects of animal domestication, pp. 1-32. JSTOR.
- RAYMOND, M., and F. O. ROUSSET, 1995 GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism, pp. 248-249. Am Genetic Assoc.
- RDEVELOPMENT, C. T., 2011 R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, pp. 3-900051.
- REAUMUR, R. A. D., 1748 Mémoires pour servir à l'histoire des insectes, pp.
- RHYMER, J. M., and D. SIMBERLOFF, 1996 Extinction by hybridization and introgression. *Annual Review of Ecology and Systematics*: 83-109.
- RORTAIS, A., G. ARNOLD, M. ALBURAKI, H. LEGOUT and L. GARNERY, 2010 Review of the DraI COI-COII test for the conservation of the black honeybee (*Apis mellifera mellifera*). *Conservation Genetics Resources* **3**: 383-391.
- RUTTNER, F., I. TASSENCOURT and J. LOUVEAUX, 1978 Biometrical-statistical analysis of the geographic variability of *Apis mellifera* L, pp. 363-381.
- RUTTNER, F., 1966 The life and flight activity of drones. *Bee World* **47**: 93-100.
- RUTTNER, F., 1988 *Biogeography and taxonomy of honeybees*. Springer-Verlag, Berlin.
- RUTTNER, F., E. MILNER, J. E. DEWS and J. E. DEWS, 2004 *The dark European honeybee: Apis mellifera mellifera Linnaeus 1758*. WritersPrintShop.
- RUTTNER, H., and F. RUTTNER, 1972 UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE FLUGAKTIVITÄT UND DAS PAARUNGSVERHALTEN DER DROHNEN. V. - DROHNENSAMMELPLÄTZE UND PAARUNGSDISTANZ. *Apidologie* **3**: 203-232.
- SCHERF, B., 2000 FAO. World watch list for domestic animal diversity. Food and agriculture Organization, Rome.
- SCHIFF, N. M., and W. S. SHEPPARD, 1996 Genetic differentiation in the queen breeding population of the western United States. *Apidologie* **27**: 77-86.
- SCHLÜNS, H., R. F. A. MORITZ, P. NEUMANN, P. KRYGER and G. KOENIGER, 2005 Multiple nuptial flights, sperm transfer and the evolution of extreme polyandry in honeybee queens, pp. 125-131. Elsevier.
- SCHMID-HEMPEL, P., 1994 Infection and colony variability in social insects, pp. 313-321. The Royal Society.
- SCHMID-HEMPEL, P., 1998 *Parasites in social insects*. Princeton University Press.
- SHEPPARD, W. S., M. C. ARIAS, A. GRECH and M. D. MEIXNER, 1997 *Apis mellifera ruttneri*, a new honey bee subspecies from Malta. *Apidologie* **28**: 287-293.

- SHEPPARD, W. S., and M. D. MEIXNER, 2003 *Apis mellifera pomonella*, a new honey bee subspecies from Central Asia, pp. 367-376. EDP SCIENCES.
- SHERMAN, P. W., T. D. SEELEY and H. K. REEVE, 1988 Parasites, pathogens, and polyandry in social Hymenoptera, pp. 602-610. JSTOR.
- SMITH, D. R., 1991 Mitochondrial DNA and honey bee biogeography, pp. 131-176. Westview Press and IBH Publ Oxford.
- SOLAND-RECKEWEG, G., G. HECKEL, P. NEUMANN, P. FLURI and L. EXCOFFIER, 2009 Gene flow in admixed populations and implications for the conservation of the Western honeybee, *Apis mellifera*. *Journal of Insect Conservation* **13**: 317-328.
- SOLIGNAC, M., D. VAUTRIN, E. BAUDRY, F. MOUGEL, A. LOISEAU *et al.*, 2004 A microsatellite-based linkage map of the honeybee, *Apis mellifera* L. *Genetics* **167**: 253-262.
- SOLIGNAC, M., D. VAUTRIN, A. LOISEAU, F. MOUGEL, E. BAUDRY *et al.*, 2003a Five hundred and fifty microsatellite markers for the study of the honeybee (*Apis mellifera* L.) genome, pp. 307-311. Wiley Online Library.
- SOLIGNAC, M., L. ZHANG, F. MOUGEL, B. LI, D. VAUTRIN *et al.*, 2007 The genome of *Apis mellifera*: dialog between linkage mapping and sequence assembly. *Genome Biol* **8**: 4.
- STARR, C. K., 1984 Sperm competition, kinship, and sociality in the aculeate Hymenoptera, pp. 427-464. Academic Press, New York.
- STRANGE, J. P., L. GARNERY and W. S. SHEPPARD, 2007 Persistence of the Landes ecotype of *Apis mellifera mellifera* in southwest France: confirmation of a locally adaptive annual brood cycle trait. *Apidologie* **38**: 259-267.
- STRASSMANN, J., 2001 The rarity of multiple mating by females in the social Hymenoptera, pp. 1-13. Springer.
- TAN, N. Q., M. MARDAN, P. H. THAI and P. H. CHINH, 1999 Observations on multiple mating flights of *Apis dorsata* queens [spermatozoa number], pp.
- TARPY, D. R., and D. NIELSEN, 2002 Sampling error, effective paternity, and estimating the genetic structure of honey bee colonies (Hymenoptera: Apidae), pp. 513-528. BioOne.
- TAUTZ, D., and C. SCHLÖTTERER, 1994 Simple sequences, pp. 832-837. Elsevier.
- THORNHILL, R., and J. ALCOCK, 1983 *The evolution of insect mating systems*. Harvard University Press.
- VANENGELSDORP, D., J. D. EVANS, C. SAEGERMAN, C. MULLIN, E. HAUBRUGE *et al.*, 2009 Colony collapse disorder: a descriptive study. *PLoS One* **4**: e6481.
- VANENGELSDORP, D., and M. D. MEIXNER, 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* **103**.
- VIGNE, J.-D., 2004 *Les débuts de l'élevage*. Pommier.
- VILA, C., J. E. MALDONADO and R. K. WAYNE, 1999 Phylogenetic relationships, evolution, and genetic diversity of the domestic dog, pp. 71-77. *Am Genetic Assoc.*
- WALSH, P. S., D. A. METZGER and R. HIGUCHI, 1991 Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *BioTechniques* **10**: 506-513.
- WANG, J., 2004 Sibship reconstruction from genetic data with typing errors, pp. 1963-1979. *Genetics Soc America.*
- WATTANAACHAIYINGCHAROEN, W., B. P. OLDROYD, S. WONGSIRI, K. PALMER and J. PAAR, 2003 A scientific note on the mating frequency of *Apis dorsata*, pp. 85-86. EDP SCIENCES.



- WHITFIELD, C. W., S. K. BEHURA, S. H. BERLOCHER, A. G. CLARK, J. S. JOHNSTON *et al.*, 2006a Thrice out of Africa: ancient and recent expansions of the honey bee, *Apis mellifera*, pp. 642-645. American Association for the Advancement of Science.
- WILLIAMS, G. C., 1966 Natural selection, the costs of reproduction, and a refinement of Lack's principle, pp. 687-690. JSTOR.
- WILLIAMS, J., 1987 Wind-directed pheromone trap for drone honey bees (Hymenoptera : Apidae). *Journal of economic entomology* **80**: 532-536.
- WILSON, E. O., and W. L. BROWN, 1953 The subspecies concept and its taxonomic application. *Systematic Zoology* **2**: 97-111.
- WINSTON, M. L., 1987 *The biology of the honey bee*. Harvard University Press.
- ZAYED, A., 2009 Bee genetics and conservation. *Apidologie* **40**: 237-262.
- ZAYED, A., and L. PACKER, 2005 Complementary sex determination substantially increases extinction proneness of haplodiploid populations, pp. 10742-10746. *National Acad Sciences*.
- ZMARLICKI, C., and R. MORSE, 1963 Drone congregation areas. *Journal of Apicultural Research*: 64-66.



## Summary

The honeybee species (*Apis mellifera*, L.) is divided in four evolutionary lineages (M: West-Mediterranean, A: African, C: North-Mediterranean and O: Oriental). These lineages are also divided in, at least, 26 subspecies which show a very high geographical structure. This structure is the result of more than thousand years of evolution (from the last Ice Ages to nowadays).

Among the different subspecies, one is naturally found in France and Northern Europe: *Apis mellifera mellifera* (*A. m. mellifera*), also known as the Black Honeybee.

For many reasons, non local subspecies, belonging to the C evolutionary lineage, have been imported in France since the beginning of the sixties.

These massive importations result in the tendency of losing of the *Apis mellifera* geographical repartition and could lead to the loss of the local subspecies (*A. m. mellifera*) and its specific traits.

Many *A. m. mellifera* conservatories, managed by beekeepers, have been initiated in Europe to compensate the importation effects on the subspecies. However, no specifications, combining a scientific approach and beekeeping, regarding the setup and monitoring of a conservation center have been proposed.

The present study genetically characterized and validated, by the analysis of drone congregation areas, different European conservatories.

A protocol regarding the setup and, scientific and beekeeping, monitoring of conservation centers have been proposed.

Finally, a preliminary study, regarding the specific honeybee mating system and its implication on conservation programs, has been initiated in the Ile-de-France region.

This thesis presents interesting results.

First, the conservatories analyzed show a level of introgression, by C lineage, low enough and a genetic diversity high enough to be validated as *A. m. mellifera* conservation centers. But, the introgression cannot increase, and/or the genetic diversity cannot decrease, these criterions are indeed necessary for any Black Honeybee conservation center.

Second, the geographical isolation of conservatories is not needed, it could even be not recommended because of the possible loss of genetic diversity implied, to set up conservation centers. However, it is really important to genetically characterize the colonies surrounding the conservatory. This is, indeed, needed to estimate and limit the risk of introgression by non local colonies.

Different hypotheses proposed in this thesis do not corroborate the conclusions of previous studies on *A. mellifera*.

It seems that drones do not go to the closest drone congregation. But the question whether they go to another congregation or they do not have the same probability to join a congregation is not answer. This analysis has to be more precisely considered in further studies.

The most striking result is the possible presence of feral swarms in the Ile-de-France region. These swarms were supposed to have disappeared because of the invasion of the parasite *Varroa destructor* in Europe. However, this new and interesting hypothesis has to be confirmed by more precise analyses. Nevertheless, the occurrence of feral swarms would be very encouraging for the conservation of *A. m. mellifera*, but also for the conservation of the whole species.

## Résumé

L'abeille mellifère (*Apis mellifera*, L.) est divisée en quatre lignées évolutives (M : Ouest-Méditerranéenne, A : Africaine, C : Nord-Méditerranéenne et O : Orientale), elles-mêmes divisées en au moins 26 sous-espèces. Ces lignées et sous-espèces sont caractérisées par une très forte structuration géographique. Cette structure est le fruit de milliers d'années d'évolution (depuis les dernières glaciations jusqu'à nos jours).

Parmi les différentes sous-espèces, on distingue notamment *Apis mellifera mellifera* (*A. m. mellifera*), également connue sous le nom de « Abeille noire ». Cette sous-espèce est naturellement présente en France et en Europe du Nord.

Pour diverses raisons, des sous-espèces non locales, appartenant en particulier à la lignée C sont importées depuis les années 60 en France.

Ces importations, souvent massives, ont tendance à déstructurer la répartition géographique de l'espèce et pourraient mener à une perte de la sous-espèce locale et de ses caractéristiques spécifiques.

Des conservatoires d'*A. m. mellifera*, gérés par des associations d'apiculteurs, ont progressivement vu le jour en Europe, pour limiter les effets des importations. Toutefois, aucun « cahier des charges », couplant l'aspect scientifique de la conservation avec l'apiculture, n'a encore été émis.

La présente thèse a donc permis, par l'étude de congrégation de mâles d'abeilles, de caractériser et valider des conservatoires Européens.

Un protocole, quant à la mise en place et au suivi scientifique ainsi qu'apicole de ces conservatoires a été proposé.

Enfin, une étude préliminaire du fonctionnement reproducteur d'une population d'abeilles a été menée en Ile-de-France. Cette étude a été entreprise dans le but d'apporter de nouvelles informations pour les programmes de conservation de l'espèce et de l'Abeille noire.

Il ressort de cette thèse que la majorité des conservatoires étudiés présentent un niveau d'introgression (par la lignée Nord-Méditerranéenne) suffisamment faible et une diversité génétique suffisante pour être acceptés comme conservatoires. Il faut cependant maintenir le faible niveau d'introgression, d'une part, et, d'autre part, la diversité génétique suffisante, ces critères étant indispensables pour tout conservatoire d'*A. m. mellifera*.

Il apparaît également que l'isolement géographique n'est pas obligatoire, voire même non recommandé, pour l'établissement d'un conservatoire. Mais, il est important de caractériser l'ensemble des populations situées autour des zones conservatoires. Cette caractérisation a, en effet, pour but d'estimer et de limiter les risques d'introgression par des colonies non locales.

Plusieurs hypothèses émises au cours de cette analyse réfuteraient les conclusions proposées dans des études précédemment réalisées sur l'espèce *A. mellifera*.

En effet, il semblerait que les « faux bourdons » ne se rendent pas à la congrégation de mâles la plus proche. Toutefois, une étude plus approfondie du comportement reproducteur doit être réalisée afin de valider ou d'infirmer cette hypothèse.

Enfin, des essaims naturels pourraient être présents dans la région Ile-de-France. Ces essaims étaient considérés comme complètement disparus, à cause de l'invasion du parasite *Varroa destructor* en Europe. Cette nouvelle hypothèse doit cependant être confirmée par d'autres analyses plus approfondies. La présence de ces essaims naturels serait très encourageante pour la conservation d'*A. m. mellifera*, mais également de l'espèce en générale.