



HAL
open science

Trajectoires évolutives des populations insulaires d'Apis mellifera dans le sud-ouest de l'océan Indien : congruence des approches morphométriques et génétiques

Julien Galataud

► **To cite this version:**

Julien Galataud. Trajectoires évolutives des populations insulaires d'Apis mellifera dans le sud-ouest de l'océan Indien : congruence des approches morphométriques et génétiques. Biologie animale. Université de la Réunion, 2019. Français. NNT : 2019LARE0042 . tel-02951325

HAL Id: tel-02951325

<https://theses.hal.science/tel-02951325>

Submitted on 28 Sep 2020

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.

Ecole Doctorale Sciences, Technologies et Santé (EDSTS-542)

UMR PVBMT Peuplement Végétaux et Bioagresseurs en Milieu Tropical

CIRAD – Université de La Réunion

THESE

Présentée à l'Université de La Réunion pour obtenir le

DIPLOME DE DOCTORAT EN SCIENCES

Discipline : Biologie des Populations et Ecologie

Trajectoires évolutives des populations insulaires d'*Apis mellifera* dans le Sud-Ouest de l'Océan Indien : congruence des approches morphométriques et génétiques

Par

Julien GALATAUD

Soutenue publiquement le 19 décembre 2019, devant le jury suivant :

Stéphane POUSSIER, Professeur, Université de La Réunion

Président du Jury

Nicolas BLOT, Maître de conférences, HDR, Université de Clermont Auvergne

Rapporteur

Alain RATNADASS, Chercheur, HDR, CIRAD

Rapporteur

Bernard REYNAUD, Professeur, Université de La Réunion

Directeur de thèse

Encadrement de Thèse

Johanna CLEMENCET, Maître de conférences, Université de la Réunion

Encadrante de thèse

Hélène DELATTE, Chercheur HDR, CIRAD, La Réunion

Encadrante de thèse

Remerciements

J'adresse tout d'abord mes plus sincères remerciements à Johanna Clémencet, pour sa gentillesse, son engagement, sa disponibilité, son écoute, son coaching, depuis mon Master et jusqu'à la fin de cette thèse... ainsi qu'à Hélène Delatte, qui a été d'un soutien sans faille et d'une grande aide. Merci à Bernard Reynaud, qui, malgré un emploi du temps surchargé, s'est montré à l'écoute et a su m'orienter en cette fin de thèse difficile.

Je tiens aussi à remercier Maëva Techer, pour la qualité de ses travaux sur la génétique de l'abeille, et pour s'être rendue disponible dès qu'elle en avait l'occasion.

Merci à tous ceux qui ont contribué de prêt ou de loin aux échantillonnages et aux études génétiques, notamment Patrick Turpin, Christophe Simiand, Olivier Esnault, Henriette Rasolofoarivao, Gérard Lebreton, et à l'équipe Abeille dans son ensemble.

Merci encore à Chloé Bernet et Gaëlle Antoine, qui se sont attaquées avec rigueur, patience et précision à la caractérisation morphométrique de l'abeille. Merci à Hélène Jourdan, pour l'encadrement de Gaëlle et tous ses retours, sur ses travaux et comme sur les miens.

Merci enfin à Lydia Begue, pour tout l'amour, la confiance et le bonheur qu'on se porte. Tu as été mon plus grand soutien, je ne serais pas venu à bout de cette thèse sans toi. Ce fût une étape difficile à surmonter et on surmontera toutes les autres c'est certain.

Merci à mon fils Calvin, dont la joie et les rires illuminent mes journées et me rendent si fier...

Résumé

La sous-espèce d'abeille domestique présente dans les îles du Sud-ouest de l'Océan Indien (SOOI) est *Apis mellifera unicolor*. Les populations insulaires du SOOI sont génétiquement structurées, avec des hybridations observées avec des lignées Européennes en proportions variables selon les îles. Afin de mieux comprendre les processus micro-évolutifs mis en œuvre entre les divergences de 10 populations insulaires du SOOI, nous avons étudié la variabilité et la distribution d'un trait en regard de la diversité génétique des individus. Ainsi, le patron de nervation alaire a été caractérisé en utilisant la morphométrie géométrique (méthode Procrustes) sur plus de 1400 ouvrières. Des approches multivariées ont permis de relier les données morphologiques (taille et conformation des ailes) aux données génétiques (14 marqueurs microsatellites).

Premièrement, nous avons étudié un processus d'hybridation en cours à l'île Maurice et mis en évidence la concordance entre les variations morphogénétiques et génétiques, puis montré que le processus d'hybridation a contribué à accroître la variabilité phénotypique de la population. Les introductions humaines et l'apiculture ont donc fortement influencé la trajectoire évolutive de cette population.

Dans un second temps nous avons élargi notre étude à la caractérisation des abeilles de toute la zone SOOI. Les résultats montrent non seulement que ces populations sont autant structurées morphologiquement que génétiquement, mais aussi que la variabilité de la conformation des ailes reflète l'histoire évolutive de ces populations, en soulignant l'influence de la dérive, des effets fondateurs et de l'hybridation sur ces populations.

La forte congruence observée entre la variabilité génétique neutre et morphométrique n'exclue pas d'autres mécanismes, tels que la sélection naturelle et/ou la plasticité phénotypique, qui auraient pu influencer sur la trajectoire évolutive de l'abeille du SOOI.

Mots clés :

Microévolution – morphométrie géométrique – *Apis mellifera unicolor* - hybridation – asymétrie fluctuante – populations insulaires – nervation alaire

Evolutionary trajectories of the island populations of *Apis mellifera* in the South-West Indian Ocean: congruence of morphometric and genetic approaches

Abstract

The honeybee subspecies found in the islands of the southwest Indian Ocean (SOOI) is *Apis mellifera unicolor*. The SOOI island populations are genetically structured, with hybridization patterns observed with European lines in varying proportions depending on the islands. In order to better understand the microevolutionary processes implemented between the divergences of the 10 SOOI island populations, we studied the variability and distribution of a trait with respect to the individual genetic diversity. Thus, the wing venation pattern was characterized by using geometric morphometry (Procrustes method) on more than 1400 female workers. Multivariate approaches used, allowed us to link morphological data (wing size and conformation) to genetic data (14 microsatellite markers).

First, we studied an ongoing hybridization process in Mauritius and highlighted the concordance between morphogenetic and genetic variations, and then showed that the hybridization process contributed to increasing the phenotypic variability of the population. Human introductions and beekeeping have therefore strongly influenced the evolutionary trajectory of this population.

In a second step, we extended our study to the characterization of honeybees throughout the SOOI zone. The results showed, not only, that these populations were morphologically and genetically structured, but also that the variability in wing conformation reflected the evolutionary history of these populations, highlighting the influence of drift, founding effects and hybridization processes on these populations.

The strong congruence observed between neutral and morphometric genetic variability does not exclude other mechanisms, such as natural selection and/or phenotypic plasticity that could have influenced the evolutionary trajectory of the SOOI honeybees.

Keywords :

Microevolution – geometric morphometrics – *Apis mellifera unicolor* - hybridization – fluctuating asymmetry – insular populations – wing venation

Table des matières

I. Introduction générale	6
1. Biogéographie d'<i>Apis mellifera</i>	6
1.1. Aire d'endémicité	6
1.2. Diversité intraspécifique	6
1.3. Histoire évolutive	9
1.4. Une diversité façonnée par l'Homme	9
2. Apports de la génétique dans le Sud-Ouest de l'Océan Indien	11
2.1. <i>Apis mellifera unicolor</i> Latreille (1804)	11
2.2. <i>A. m. unicolor</i> dans la zone Sud-Ouest de l'Océan Indien (SOOI)	13
2.3. Un sous-groupe Africain caractéristique du SOOI	13
2.4. Détection de lignées européennes issues d'importation dans les Mascareignes.....	15
2.5. Des populations fortement structurées génétiquement	15
3. Etudes des trajectoires évolutives des populations du SOOI : approche morphométrique.....	18
4. Apport des approches morphométriques pour caractériser la diversité d'<i>Apis mellifera</i>	18
4.1. Nécessité d'une approche morphométrique multivariée.....	18
4.2. La morphométrie classique, un outil efficace pour caractériser les populations d' <i>Apis mellifera</i>	20
5. Morphométrie alaire et morphométrie géométrique	20
5.1. Les ailes : une structure propice aux études morphométriques	20
5.2. La morphométrie géométrique appliquée aux ailes d'insectes	20
5.3. Le patron de nervation alaire, un marqueur efficace chez <i>Apis mellifera</i>	21
6. Analyse de la conformation des ailes par morphométrie géométrique : méthode de superposition Procrustes.....	24
6.1. Obtention des conformations par la méthode de superposition Procrustes	24
6.2. Espace des conformations et espace tangent	24
6.3. Alignement des conformations par superposition Procruste	27
6.4. Etude des différences de conformations entre groupes : analyses multivariées	27
7. Objectifs de la thèse	28
II. Chapitre 1 : Rencontre entre les abeilles (<i>Apis mellifera</i>) Européennes et Africaines sous les tropiques : changements morphologiques corrélés à la diversité génétique à l'île Maurice (Sud-Ouest de l'Océan Indien)	30
III. Chapitre 2 : Analyse fine de la congruence entre divergences morphométriques et génétiques des populations d'<i>Apis mellifera</i> dans les milieux insulaires de la zone du SOOI.....	71
1. Introduction.....	72
2. Matériel et méthodes.....	73
2.1. Echantillonnages	73
2.2. Acquisition des données morphométriques	74
2.3. Analyses morphométriques.....	75
3. Résultats	79
3.1. Archipel des Mascareignes	79
3.2. Archipel des Seychelles	79
3.3. Archipel des Comores	86
3.4. Madagascar et archipels du Sud-Ouest de l'Océan Indien	86

3.5. Patrons globaux de divergences morphologiques et génétiques.....	87
3.6. Signal phylogénétique.....	87
4. Discussion.....	93
5. Conclusion.....	95
IV. Discussion générale	96
V. Conclusion et perspectives	106
VI. Références bibliographiques	107
VII. ANNEXE	119

Liste des figures

INTRODUCTION GENERALE

- Figure I.1.** a) Phylogénie de la sous-famille, tribu et genre des abeilles Apidae. b) Histogramme indiquant le nombre d'espèces décrites pour chaque groupe. En rouge, position de l'abeille *A. mellifera*. Source : modifié d'après Danforth et al. (2013). 7
- Figure I.2.** Carte de la distribution géographique des 29 sous-espèces reconnues d'*Apis mellifera* dans son aire de répartition naturelle avec indication de la répartition des lignées évolutives A, C, M, O et le sous-groupe Z (sous-lignée africaine mais divergente des 4 lignées évolutives au niveau nucléaire). Source : d'après Techer (2015), modifié d'après Ruttner (1988), Engel (1999), Franck et al. (2001), (Alburaki et al., 2013). Le fond de carte utilisé est Open Layer Landscape 8
- Figure I.3.** Scénarios évolutifs hypothétiques, i) proposé par Ruttner et al. (1978) sur la base des analyses morphométriques suggérant une origine au Moyen Orient et plusieurs routes de colonisation de l'Europe, ii) proposé par Garnery et al. (1992) sur la base de données mitochondriales avec une origine au Moyen Orient et des routes de colonisation de l'Europe, n'impliquant pas un passage par l'Afrique et iii) un scénario avec une origine africaine soutenue par les données SNPs de Whitfield et al. (2006). Source : (Han et al., 2012). 10
- Figure I.4.** Carte de la distribution des points chauds de la biodiversité selon Myers et al. (2000) et Mittermeier et al. (2011). Source : <http://databasin.org>, Conservation Synthesis, Center for Applied Biodiversity Science at Conservation International. 14
- Figure I.5.** Délimitation du point chaud de biodiversité de Madagascar et des îles de l'Océan Indien. Source : <http://www.cepf.net> 14
- Figure I.6.** Lignées évolutives présentes dans le Sud-Ouest de l'Océan Indien, et dans les régions d'Europe, d'Afrique et du Moyen-Orient échantillonnées par Techer *et al.* (2017a). 16
- Figure I.7.** Les populations d'abeilles du Sud-Ouest de l'Océan Indien sont génétiquement structurées. Elles sont à la fois différentes entre elles, et différentes des populations continentales Africaines et Européennes. Ces résultats sont issus de Techer *et al.* (2017b), et de l'analyse Bayésienne de 14 marqueurs microsatellites sous STRUCTURE. 17
- Figure I.8.** Représentation schématique de quelques caractères utilisés en morphométrie classique chez *Apis mellifera* ssp. **A** : patte antérieure (Fe : fémur ; Ti : tibia ; ML : métatarse ; MT : largeur métatarse) ; **B** : aile antérieure (A04 – O26 : 11 angles mesurés) ; **C** : proboscis (« langue » de l'abeille) ; **D** : abdomen (a et b: largeur du tomentum ; h : longueur des poils). Source : Ruttner (1988). 19
- Figure I.9.** Discrimination de trois sous-espèces d'*Apis mellifera* de lignées européennes (*A. m. carnica*, $n = 300$; *A. m. caucasica*, $n = 300$; *A. m. mellifera*, $n = 300$) basée sur la morphométrie géométrique (3a) - coordonnées de 18 points repères - ou classique (3b) - 4 distances et 11 angles - appliquées au patron de nervation alaire (3c). Les grilles de déformation (3d) obtenues grâce à l'outil géométrique illustrent les différences entre l'aile moyenne globale (trois sous-espèces confondues) et l'aile moyenne de chaque sous-espèce (cercles : jonctions de nervures ; flèches : amplitude et direction des déformations). Source : Tofilski, 2008. 22

Figure I.10. A : Image d'une aile antérieure droite d' <i>A. mellifera</i> , avec les 19 point-repères positionnés aux intersections des nervures ; B : variabilité des point-repères après superposition Procrustes des ailes de plusieurs individus. Les liens (25 droites entre point-repères) servent à représenter les nervures principales. Source : Barour <i>et al.</i> (2011).....	23
Figure I.11. Principe du calcul de la taille-centroïde illustré avec un triangle en deux dimensions. L'intersection entre x_c et y_c représente le centroïde (barycentre) du triangle ; la taille-centroïde correspond à la racine carrée de la somme des carrés des distances entre centroïde et point-repères. Source : Cucchi <i>et al.</i> , 2015.	25
Figure I.12. Les trois étapes de superposition Procrustes illustrées à l'aide de triangles : 1) alignement sur la taille-centroïde 2) mise à l'échelle 3) rotation des conformations. Source : Cucchi <i>et al.</i> , 2015.	25
Figure I.13. Représentation du <i>shape-space</i> et de l'espace tangent pour des triangles en 2D décrits par trois point- repères. Dans ce cas, le <i>shape-space</i> est un espace à $(6-4) = 2$ dimensions correspondant à une surface courbe de forme hémisphérique. Un plus grand nombre de point-repères rendrait la représentation graphique des notions de conformation, <i>shape-space</i> , et d'espace tangent beaucoup plus complexe. Source : Perrard (2012).....	26

CHAPITRE 1

Fig 1. Geometric morphometrics of the forewing venation of honeybee workers (<i>Apis mellifera</i>).....	39
Fig 2. Patterns of covariation between forewing morphology and neutral genetic variation assessed <i>via</i> partial least-square analyses (PLS).....	49
Fig 3. Relationships between forewing size (A) and shape (B), as captures by the between-group PCA, and the hybrid index.	50
Fig 4. Shape changes between the means of “pure” African, “pure” European and hybrid clusters along the first axis of the between-group PCA.....	52
Fig 5. Relationships between fluctuating asymmetry of forewing size (A) and shape (B) and the hybrid index.	54
S1 Fig. Patterns of variation within neutral genetic variation (A) and forewing shape (B) from principal component analyses (PCAs).....	70

CHAPITRE 2

Figure III.1. Résultat de l'analyse discriminante (« Canonical variate analysis », CVA) menée sur les îles de l'archipel des Mascareignes (La Réunion, Maurice, Rodrigues), représentées par des ellipses qui enserrent 90% des échantillons.....	80
Figure III.2. Résultat de l'analyse discriminante (« Canonical variate analysis », CVA) menée sur les îles de l'archipel des Seychelles (Mahé, Praslin, La Digue), représentées par des ellipses qui enserrent 90% des échantillons.	82
Figure III.3. Résultat de l'analyse discriminante (« Canonical variate analysis », CVA) menée sur les îles de l'archipel des Comores (Anjouan, Grande Comore, Mohéli), représentées par des ellipses qui enserrent 90% des échantillons.....	84
Figure III.4. Résultats de l'analyse discriminante (« Canonical variate analysis », CVA) menée sur les archipels des Seychelles, des Comores, ainsi que La Réunion, Maurice,	

Rodrigues et Madagascar. Chaque groupe est représenté par des ellipses qui enserrent 90% des échantillons..... 88

Figure III.5. Phylogénies réalisées selon la méthode des plus proches voisins, sur la base de distances morphologiques (**a** : distances Procrustes ; **b** : distances de Mahalanobis) et génétiques (**c** : distances de Nei, 14 marqueurs microsattellites). 91

Figure III.6. Relation entre les populations d'abeilles (*A. mellifera*) échantillonnées dans le Sud-Ouest de l'Océan Indien, en Afrique et en Europe, et la variation de la conformation des ailes dans les espaces morphométriques (19 point-repères)..... 92

DISCUSSION GENERALE

Figure IV.1. Arbre non-raciné représentant les divergences morphologiques entre les populations d'*Apis mellifera* (abeille domestique) échantillonnées dans les archipels du Sud-Ouest de l'Océan Indien (Seychelles, Comores et Mascareignes) et les groupes externes implémentés, qui proviennent de populations et sous-espèces continentales appartenant aux lignées évolutives Africaine (A), Est-Européenne (C) et Ouest-Européenne (M). Ces divergences sont obtenues à partir du pattern de nervation alaire (aile antérieure droite) d'abeilles ouvrières (Chapitre II). 97

Figure IV.2. Distribution de la longueur du palpe labial (proxy du proboscis) dans chacun des sites échantillonnés à Madagascar (Bernet, 2017). Les effectifs échantillonnés sont indiqués entre parenthèse à la suite du nom du site (ce nom pouvant correspondre au nom de la région ou au nom de la ville selon le site). Les lettres en rouge signalent que les populations sont significativement différentes (lettres différentes) ou non (lettres identiques) selon le test de Wilcoxon (correction de Bonferroni). 99

Figure IV.3 : Illustration du clivage environnemental entre les régions Est et Ouest de Madagascar (issu de Bernet 2017). À gauche, la forêt primaire du Parc National de Masoala (Nord-Est) ; à droite, un paysage de savane herbeuse, dans la région de Morondava (Ouest). Sources des images : <http://www.geo.fr/voyages/guides-de-voyage/afrique/madagascar/>..... 99

Figure IV.4. Discrimination des sous-espèces Africaines par le logiciel IdentiFly (Nawrocka et al, 2017). La sous-espèce *A. m. unicolor* est représentée dans le coin inférieur gauche par sept individus. 105

Listes des tables

CHAPITRE 1

Table 1. Genetic, morphological and geographical data from honeybees (<i>A. mellifera</i>) sampled in Mauritius (24 sites).....	38
Table 2. Analysis of variance of forewing size and shape in 36 honeybees photographed and digitized twice.....	45
Table 3. Analysis of variance for both forewing size and shape of honeybee workers (<i>Apis mellifera</i>).....	47
Table 4. Cross-validated classification of worker honeybees as pure Africans (A), pure Europeans (E) and hybrids (H) using forewing shape.....	51

CHAPITRE 2

Table III.1. Distances morphologiques entre les populations insulaires des Mascareignes, exprimées en distances Procrustes (espace des conformations) et en distances de Mahalanobis (espace discriminant), respectivement au-dessus et en-dessous de la diagonale ($P < 0.0001$ toutes distances et toutes paires de populations confondues).....	80
Table III.2. Tests (paramétriques et non-paramétriques) de comparaison de moyennes entre paires de populations examinées par DFA dans l'archipel des Mascareignes (Maurice, Rodrigues, La Réunion), basés sur les distances Procrustes et de Mahalanobis.	81
Table III.3. Résultats des classifications par DFA entre chaque paire d'îles des Mascareignes. Les pourcentages non-biaisés ont été estimés par validation croisée de type Jackknife.	81
Table III.4. Distances morphologiques entre les populations insulaires des Seychelles, exprimées en distances Procrustes (espace des conformations) et en distances de Mahalanobis (espace discriminant), respectivement au-dessus et en-dessous de la diagonale (* : distances non-significatives).....	82
Table III.5. Tests (paramétriques et non-paramétriques) de comparaison de moyennes entre paires de populations examinées par DFA dans l'archipel des Seychelles (Mahé, Praslin, La Digue), basés sur les distances Procrustes et de Mahalanobis.....	83
Table III.6. Résultats des classifications par DFA entre chaque paire d'îles des Seychelles. Les pourcentages non-biaisés ont été estimés par validation croisée de type Jackknife.	83
Table III.7. Tests (paramétriques et non-paramétriques) de comparaison de moyennes entre paires de populations examinées par DFA dans l'archipel des Comores (Anjouan, Mohéli, Grande Comore), basés sur les distances Procrustes et de Mahalanobis.	84
Table III.8. Distances morphologiques entre les populations insulaires des Comores, exprimées en distances Procrustes (espace des conformations) et en distances de Mahalanobis (espace discriminant), respectivement au-dessus et en-dessous de la diagonale.....	85
Table III.9. Résultats des classifications par DFA entre chaque paire d'îles des Comores. Les pourcentages non-biaisés ont été estimés par validation croisée de type Jackknife.....	85
Table III.10. Distances morphologiques entre l'archipel des Comores, les Seychelles, La Réunion, Maurice, Rodrigues et Madagascar, exprimées en distances Procrustes (espace des conformations) et en distances de Mahalanobis (espace discriminant), respectivement au-dessus et en-dessous de la diagonale ($P < 0.0001$ pour toutes les paires de distances).	89
Table III.11. Tests (paramétriques et non-paramétriques) des différences de moyennes entre paires de populations examinées par DFA.....	89
Table III.12. Résultats des classifications par DFA entre chaque paires de groupes (Comores, Seychelles, Madagascar, La Réunion, Maurice, Rodrigues, Madagascar). Les pourcentages non-biaisés ont été estimés par validation croisée de type Jackknife.....	90

ANNEXE 1

Table SIII.1. Synthèse des échantillons utilisés dans le Chapitre 2. La taille des échantillons est indiquée, ainsi que leur origine géographique, évolutive (lignées Africaine A ou Européennes C et M) et les sous-espèces auxquelles elles sont apparentées. 119

ANNEXE 2

Curriculum Vitae.....120

I. Introduction générale

1. Biogéographie d'*Apis mellifera*

1.1. Aire d'endémicité

Du fait de son rôle écologique (Allen-Wardell *et al.*, 1998 ; Michener, 2007) et économique majeur (Southwick and Southwick, 1992 ; Costanza *et al.*, 1997), la taxonomie et la biogéographie d'*Apis mellifera*, abeille domestique de la famille des Apidae (Ordre : Hymenoptera), ont très largement été étudiées (Figure I.1). A l'instar des neuf autres espèces appartenant au genre *Apis*, dont la distribution géographique est limitée à l'Asie (Ruttner, 1988), *Apis mellifera* est naturellement présente sur une vaste étendue géographique qui recouvre l'Afrique, l'Europe et le Moyen-Orient (Sheppard et Meixner, 2003, Whitfield *et al.* 2006 ; Han *et al.*, 2012). Elle occupe des habitats variés, allant des régions désertiques (Shaibi et Moritz, 2010) aux forêts tropicales (Fletcher, 1978), en passant par des milieux montagneux (Le Conte et Navajas, 2008) ou les toundras (Toullec, 2008). Ses populations recouvrent ainsi une large gamme de conditions écologiques et climatiques auxquelles elle a pu s'adapter.

1.2. Diversité intraspécifique

Actuellement, 29 sous-espèces ont été décrites sur la base de critères morphologiques, génétiques et comportementaux (Ruttner 1988 ; Sheppard and Meixner, 2003 ; Meixner *et al.*, 2013). Certaines présentent des variations considérables qui justifient leur subdivision en plusieurs écotypes régionaux (Meixner *et al.*, 2013). Les différentes sous-espèces sont issues de cinq lignées évolutives majeurs, et cette histoire évolutive est supportée par les études morphologiques, comportementales et génétiques : la lignée A, qui inclut les sous-espèces d'Afrique, la lignée M, qui inclut les sous-espèces du Nord et de l'Ouest de l'Europe ; la lignée C, qui inclut les sous-espèces d'Europe de l'Est ; la lignée O qui inclut les sous-espèces de Turquie et du Moyen-Orient ; enfin la lignée Y, située au Nord-Est de l'Afrique (Ruttner *et al.* 1978 ; Ruttner 1988 ; Garnery *et al.* 1992 ; Arias and Sheppard 1996 ; Franck *et al.* 2000 ; Franck *et al.* 2001 ; Miguel *et al.* 2011).

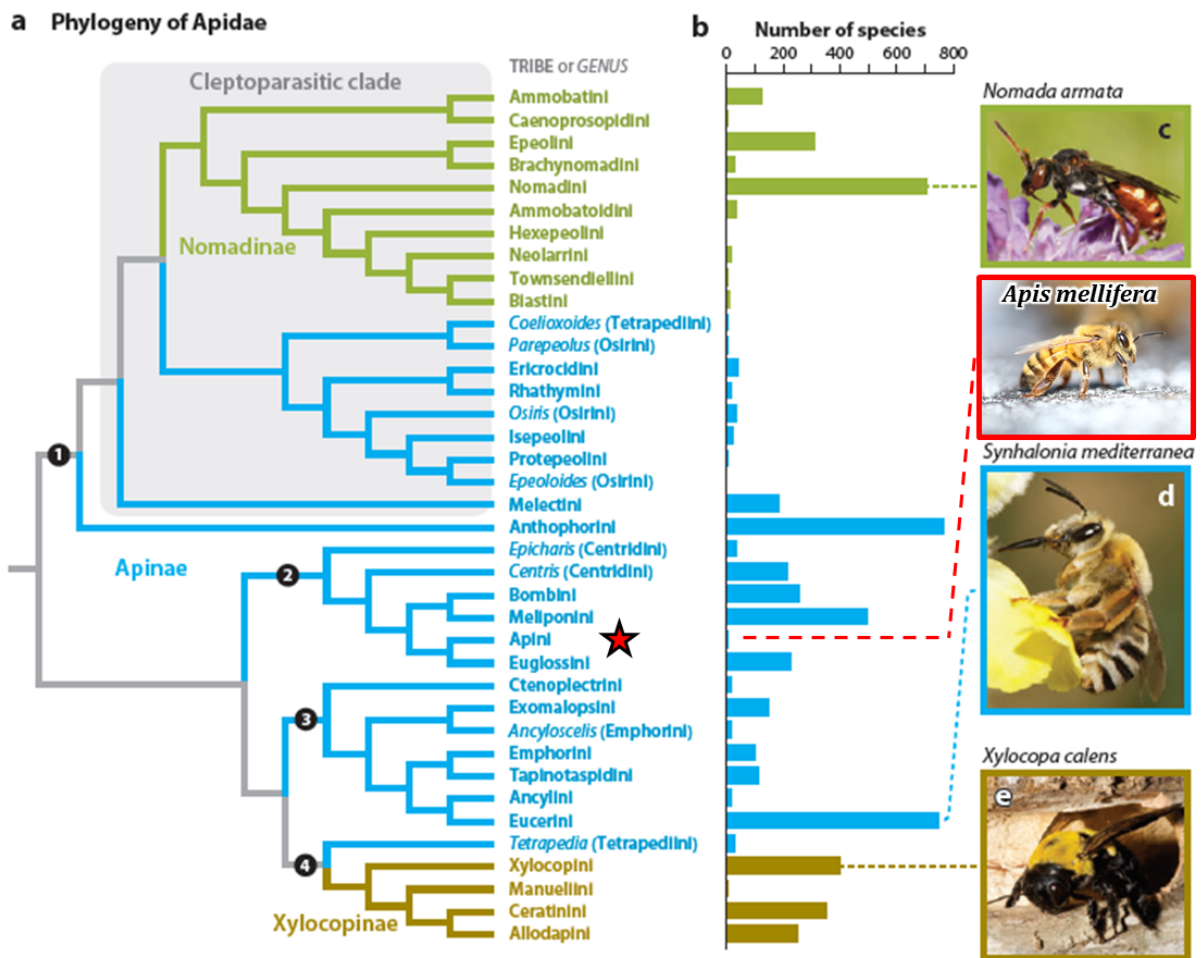


Figure I.1. a) Phylogénie de la sous-famille, tribu et genre des abeilles Apidae. b) Histogramme indiquant le nombre d'espèces décrites pour chaque groupe. En rouge, position de l'abeille *A. mellifera*. Source : modifié d'après Danforth et al. (2013).



Figure I.2. Carte de la distribution géographique des 29 sous-espèces reconnues d'*Apis mellifera* dans son aire de répartition naturelle avec indication de la répartition des lignées évolutives A, C, M, O et le sous-groupe Z (sous-lignée africaine mais divergente des 4 lignées évolutives au niveau nucléaire). Source : d'après Techer (2015), modifié d'après Ruttner (1988), Engel (1999), Franck et al. (2001), (Alburaki et al., 2013). Le fond de carte utilisé est Open Layer Landscape

1.3. Histoire évolutive

Bien que l'origine d'*A. mellifera* ait longtemps été débattue (Sheppard and Meixner 2003 ; Whitfield *et al.* 2006 ; Han *et al.* 2012 ; Wallberg *et al.* 2014) (Figure I.3), les études récentes les plus complètes la situent quelque part entre le Nord-Est de l'Afrique et le Moyen-Orient, i.e. proche des neuf autres espèces du genre *Apis* dont la répartition est limitée à l'Asie. Le scénario le plus probable et le mieux supporté par les analyses génétiques indique (1) que les lignées A et Y sont issues de populations ancestrales d'*A. mellifera*, (2) que la lignée africaine s'est dans un premier temps diversifiée, (3) et que les radiations ultérieures de la lignée M hors d'Afrique vers l'Europe d'une part, (4) et des lignées C/O à nouveau vers le Moyen-Orient puis vers l'Europe centrale d'autre part, ont engendrées les populations modernes d'Europe et d'Asie occidentale (Cridland *et al.* 2017). Wallberg *et al.* (2014) suggèrent que cette séparation remonte à environ 300 000 ans, et que la subdivision en sous-espèces au sein de chaque lignée s'est probablement produite il y a 13 000 à 38 000 ans, lors du dernier maximum glaciaire (Clarke, 2009). L'isolement géographique et l'adaptation à différents milieux ont contribué à l'apparition des 29 sous-espèces et des nombreux écotypes connus à ce jour.

1.4. Une diversité façonnée par l'Homme

Si l'aire de répartition de l'abeille domestique recouvrait autrefois l'Afrique, l'Europe et le Moyen Orient, elle s'est considérablement élargie à partir du 17^{ème} siècle en accompagnant l'Homme dans ses grandes migrations (Crane, 1999). Elle est désormais exploitée sur les cinq continents en tant que productrice de miel et pollinisatrice (Moritz *et al.* 2005).

Dans les régions où l'abeille domestique était naturellement absente (i.e. non-native), la majeure partie des populations sont issues de l'hybridation de plusieurs sous-espèces et hybrides importés, et présentent très souvent une origine Est-Européenne. Cela est lié au fait que les sous-espèces *A. m. carnica* et *A. m. ligustica* (lignée C) ont été exploitées et exportées de manière intensive en raison de leurs caractéristiques recherchées par l'apiculture, telle qu'une forte productivité de miel et un comportement docile (Lodesani and Costa, 2003). La diversité des populations non-natives dépend donc des proportions des diverses populations sources importées, et des pressions de sélection naturelles et/ou engendrées par les apiculteurs qui façonnent ensuite cette diversité. Le cas de l'abeille Africanisée, issu de l'hybridation d'*A. m. scutellata* avec diverses souches Européennes, est un exemple flagrant de la capacité de

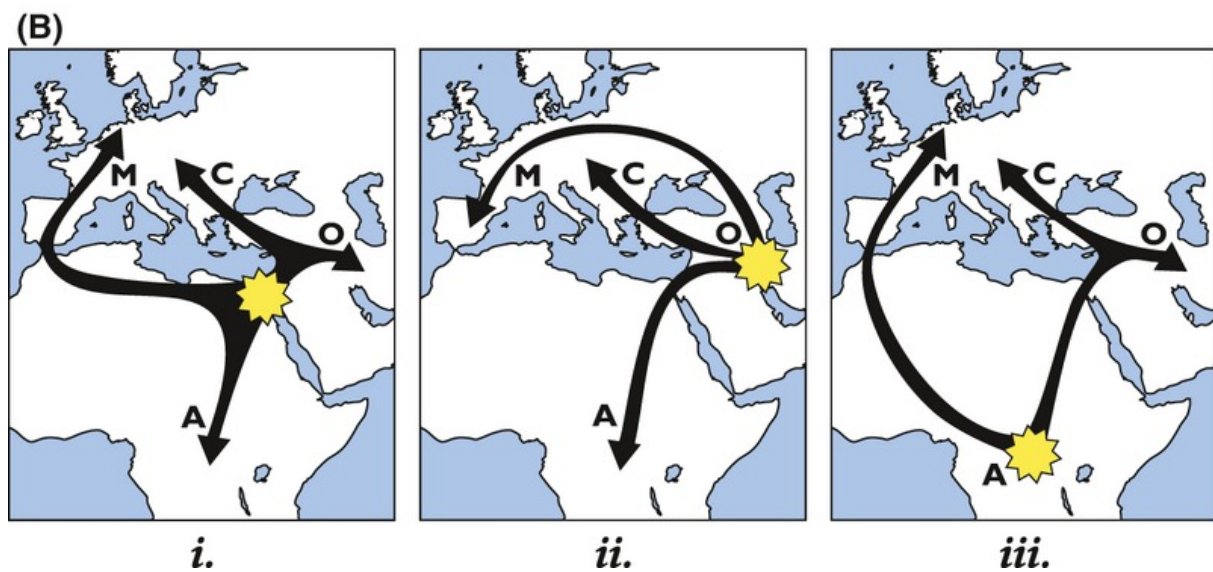
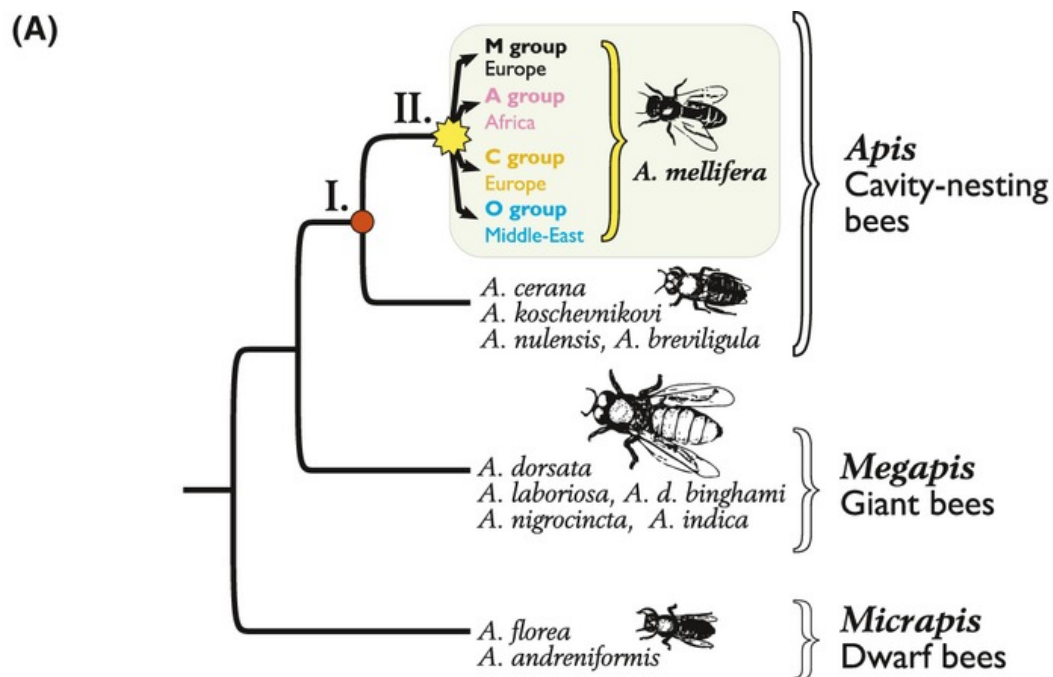


Figure I.3. Scénarios évolutifs hypothétiques, i) proposé par Ruttner et al. (1978) sur la base des analyses morphométriques suggérant une origine au Moyen Orient et plusieurs routes de colonisation de l'Europe, ii) proposé par Garnery et al. (1992) sur la base de données mitochondriales avec une origine au Moyen Orient et des routes de colonisation de l'Europe, n'impliquant pas un passage par l'Afrique et iii) un scénario avec une origine africaine soutenue par les données SNPs de Whitfield et al. (2006). Source : (Han et al., 2012).

l'abeille à tirer parti de sa diversité (génétique, morphologique et comportementale) de manière adaptative : après son introduction au Brésil en 1956, elle a su coloniser toute l'Amérique du Sud et l'Amérique du Nord jusqu'aux Etats-Unis en l'espace de 50 ans (Schneider *et al.*, 2004).

En Europe, l'augmentation des flux géniques entre populations liée aux échanges commerciaux de colonies et aux migrations sur de grandes échelles, conduit à l'hybridation de certaines sous-espèces et de leurs écotypes régionaux. Ces pratiques entraînent parfois la perte de combinaisons de traits avantageuses, façonnées par la sélection naturelle, et menacent sa diversité (Lodesani and Costa, 2003 ; De la Rúa *et al.* 2009 ; Leclercq *et al.*, 2018).

Sur le continent Africain, bien que des menaces pèsent sur l'abeille à cause du changement climatique et de la destruction des habitats naturels, sa diversité semble encore préservée car l'apiculture est y est peu développée et ses sous-espèces sont moins commercialisées (Dietemann *et al.*, 2009 ; Pirk *et al.*, 2016).

2. Apports de la génétique dans le Sud-Ouest de l'Océan Indien

Au total, 11 sous-espèces Africaines sont actuellement reconnues (Engel, 1999 ; Meixner *et al.* 2011) : *A. m. intermissa* et *A. m. sahariensis* en Afrique du Nord, *A. m. lamarckii*, *A. m. simensis* et *A. m. yemenitica* au Nord-Est, *A. m. adansoni* dans la partie Ouest et Centrale, *A. m. scutellata* et *A. m. capensis* en Afrique du Sud, *A. m. monticola* dans les régions montagneuses du Sud-Est, *A. m. litorea* au Sud-Est, et enfin *A. m. unicolor* à Madagascar et les archipels alentours. Si la diversité et le statut des sous-espèces d'*Apis mellifera* ont bien été caractérisés en Europe (Meixner *et al.*, 2013), relativement peu d'études portent sur les divergences entre les sous-espèces et populations Africaines (Franck *et al.*, 2001).

2.1. *Apis mellifera unicolor* Latreille (1804)

A. m. unicolor (Latreille, 1804) est une sous-espèce décrite comme endémique de Madagascar et appartenant à la lignée évolutive africaine A (Ruttner, 1988). D'un point de vue phylogéographique, la présence d'*Apis mellifera* à Madagascar serait due à la migration d'individus issus de populations est-africaines côtières qui ont pu s'établir après avoir franchi le canal du Mozambique. L'isolement insulaire (limitation des flux de gènes par le canal du Mozambique d'une largeur de 400km) et l'adaptation aux conditions locales ont conduit à



Planche 1: *Apis mellifera unicolor* (Latreille, 1804) - (ouvrière, La Réunion). (Photographies Antoine FRANCK/CIRAD)

a. ouvrière en vue dorsale (ailes étalées); **b.** aile antérieure et postérieure droite; **c.** système de couplage de l'aile antérieure; **d.** ouvrière en vue dorsale; **e.** ouvrière en vue latérale; **f.** thorax et tête en vue latérale; **g.** tête en vue latérale; **h.** pièces buccales; **i.** tête vue de face; **j.** ocelles; **k.** corbeille sur patte antérieure; **l.** peigne

l'émergence de la sous-espèce malgache (Franck *et al.*, 2001). Elle se distingue morphologiquement par sa coloration noire uniforme, un proboscis court, des ailes antérieures longues relativement à ses homologues africaines, et ses ouvrières comptent parmi les plus petites du genre *Apis* (Ruttner 1988). Sa morphologie détaillée est représentée par **Planche 1**. Des analyses génétiques récentes (sur la base de marqueurs de type SNP et microsatellites) ont révélé qu'*A. m. unicolor* était génétiquement distincte et relativement éloignées des autres sous-espèces africaines (Whitfield *et al.* 2006 ; Han *et al.*, 2012 ; Rasolofoarivao *et al.*, 2015).

2.2. *A. m. unicolor* dans la zone Sud-Ouest de l'Océan Indien (SOOI)

Si l'abeille domestique est présente à Madagascar, elle est également établie dans tous les archipels alentours, dont les Comores, les Mascareignes et les Seychelles (Crane, 1999). Les îles du SOOI présentent des taux d'endémisme exceptionnellement élevés et forment un des 5 « hotspots » de biodiversité les plus importants au monde (Mittermeier *et al.*, 2011) (**Figures I.4, I.5**). L'interaction de l'abeille, pollinisateur généraliste, avec la flore endémique joue potentiellement un rôle majeur dans la structure, la diversité et la stabilité de ces écosystèmes insulaires uniques. Cependant, sa domestication et son exploitation répandue pour le miel et en tant que pollinisatrice, pose la question de l'histoire évolutive et de l'origine, naturelle ou importée, d'*Apis mellifera* dans les îles du SOOI.

2.3. Un sous-groupe Africain caractéristique du SOOI

Une étude génétique menée par Techer *et al.* (2017a) a récemment révélée l'origine majoritairement africaine des populations d'abeilles sur l'ensemble des îles du SOOI, à l'exception de Rodrigues dans les Mascareignes (**Figure I.6**). En effet, sur la base de marqueurs mitochondriaux et nucléaires, elle a permis de montrer que les populations de La Réunion, Maurice, des Seychelles (Mahé, Praslin, La Digue) et des Comores (Grande Comore, Anjouan, Mayotte) sont majoritairement issues de lignée africaine (A). Cependant, elles diffèrent des populations d'Afrique continentale et sont apparentées à Madagascar (Techer, 2017a), révélant ainsi la présence d'*A. m. unicolor* en dehors de son aire d'endémicité décrite par Ruttner (1988). Ces divergences sont par ailleurs suffisamment marquées (avec notamment des haplotypes spécifiques au SOOI) pour considérer les populations d'*A. m. unicolor* comme formant un sous-groupe africain unique à la zone SOOI.

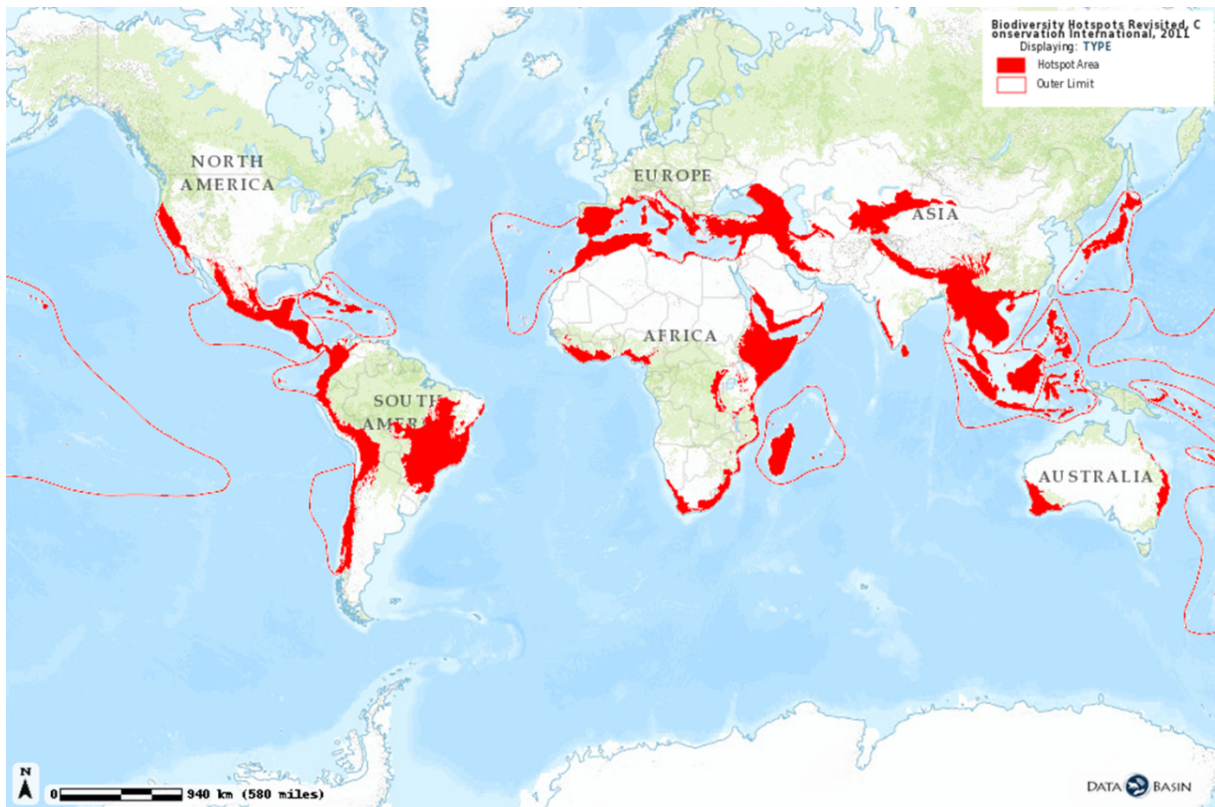


Figure I.4. Carte de la distribution des points chauds de la biodiversité selon Myers et al. (2000) et Mittermeier et al. (2011). *Source* : <http://databasin.org>, Conservation Synthesis, Center for Applied Biodiversity Science at Conservation International.



Figure I.5. Délimitation du point chaud de biodiversité de Madagascar et des îles de l’Océan Indien. *Source* : <http://www.cepf.net>

2.4. Détection de lignées européennes issues d'importation dans les Mascareignes

Si la lignée A est prépondérante dans tous les archipels du SOOI (Techer, 2015), celui des Mascareignes est le seul de la zone pour lequel les lignées évolutives européennes C et M ont été détectées (Figure I.6). Ces lignées proviennent essentiellement d'importations, plus ou moins récentes, des sous-espèces *A. m. carnica*, *A. m. ligustica*, et *A. m. mellifera*, issues de différents stocks et qui subsistent en proportions variables selon les îles. A La Réunion, où les importations ont été interdites en 1982 pour prévenir l'introduction de parasites et de pathogènes, on retrouve ainsi seulement 4.3% et 0.3% de lignée européenne C et M respectivement. L'île Maurice présente 44.7% de lignée C et 1.1% de lignée M, et à Rodrigues, 100% des colonies échantillonnées sont de lignée européenne C (Techer *et al.*, 2017a). Sur ces deux dernières îles, les importations n'ont été bannies officiellement qu'en 2011. Par ailleurs, bien que des importations d'Européennes ont également été consignées historiquement aux Seychelles, elles n'ont pas pu être mises en évidence par les études mitochondriales.

2.5. Des populations fortement structurées génétiquement

L'analyse de la diversité génétique nucléaire de la zone SOOI (14 microsatellites) a mis en évidence une forte structuration entre les populations insulaires du SOOI (Techer, 2015). Non seulement les archipels et Madagascar sont différenciés entre eux, mais les îles au sein de ces archipels sont également différenciées, y compris aux Comores (entre toutes les îles) et aux Seychelles (Mahé vs. Praslin et La Digue) (Figure I.7). De tels patrons de divergences ne sont pas surprenant pour l'abeille, et ont déjà été rapportés dans les archipels des Canaries, à Madère, aux Baléares ou aux Açores (De la Rúa *et al.* 2001, 2006 ; Muñoz *et al.* 2013, 2014), où l'intégrité génétique des populations endémiques est altérée par les importations Européennes. La disparité génétique entre les îles du SOOI peut également résulter des effets combinés de l'isolement géographique, de l'historique des importations, de goulots d'étranglement, ainsi que de diverses pressions de sélection exercées par les apiculteurs et le contexte écologique (diversité des habitats, ressources, degré d'anthropisation, etc), qui peuvent favoriser certaines lignées ou sous-espèces. Si le rôle de l'hybridation avec différentes sous-espèces Européennes ne fait aucun doute pour les Mascareignes et les

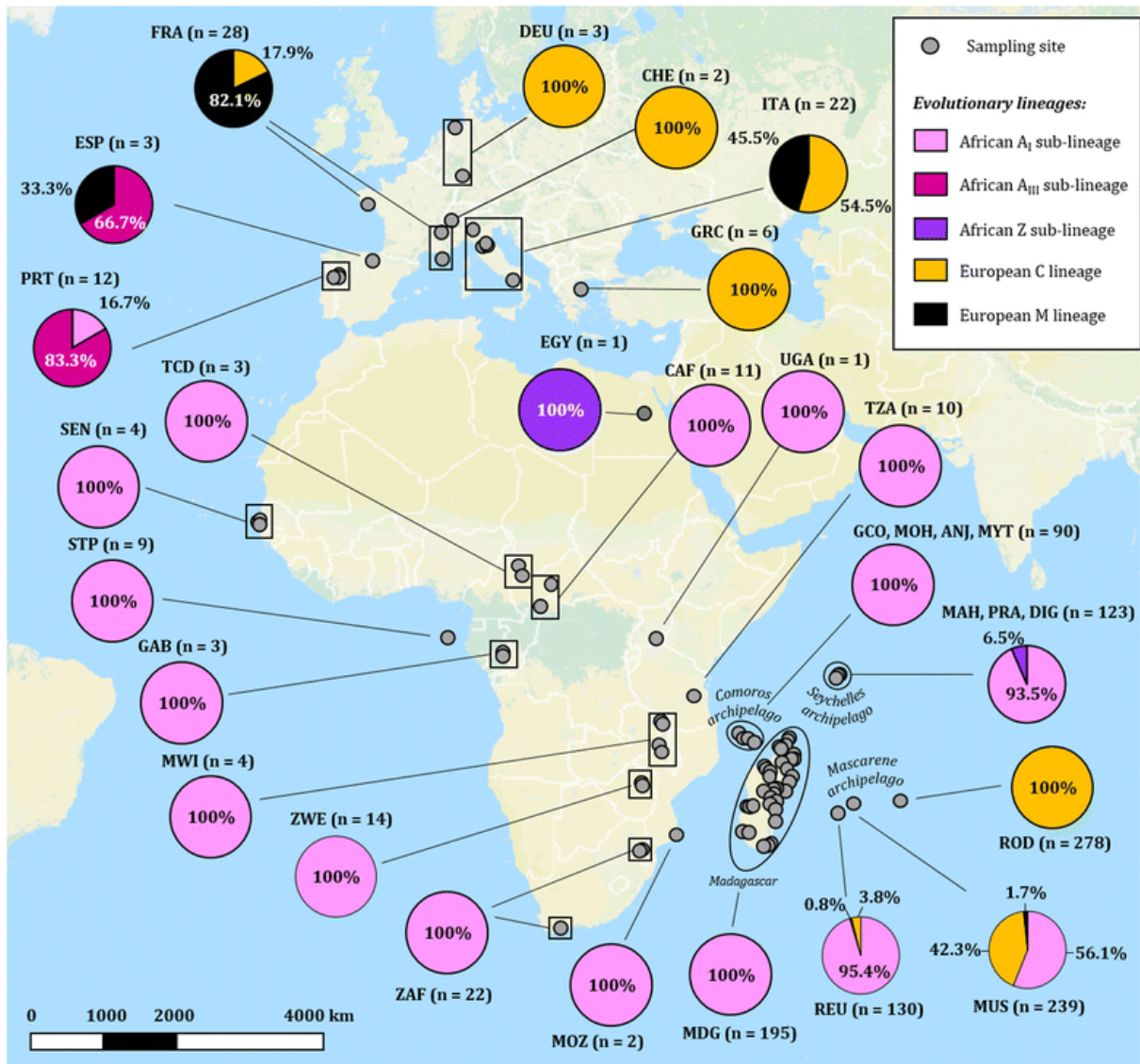


Figure I.6. Lignées évolutives présentes dans le Sud-Ouest de l’Océan Indien, et dans les régions d’Europe, d’Afrique et du Moyen-Orient échantillonnées par Techer *et al.* (2017a). Les lignées évolutives A, C, M sont présentes ainsi que des sous-lignées Africaines (A_I, A_{III}, Z), déterminées par le séquençage de la région mitochondriale intergénétique COI-COII ($n = 1184$). Les codes des pays et des îles sont indiqués à proximité des diagrammes avec les nombres de séquences obtenues. ANJ Anjouan, CAF Centrafrique, CHE Suisse, COM Comores, DEU Allemagne, DIG La Digue, EGY Egypte, ESP Spain, FRA France, GAB Gabon, GCO Grande Comore, GRC Grèce, ITA Italie, MAH Mahé, MDG Madagascar, MOH Mohéli, MOZ Mozambique, MUS Maurice, MYT Mayotte, MWI Malawi, PRA Praslin, PRT Portugal, REU La Réunion, ROD Rodrigues, SEN Sénégal, STP île de São Tomé, SYC Seychelles, UGA Ouganda, ZAF Afrique du Sud, ZWE Zimbabwe et TZA Tanzanie. *Source* : Techer *et al.* (2017a).

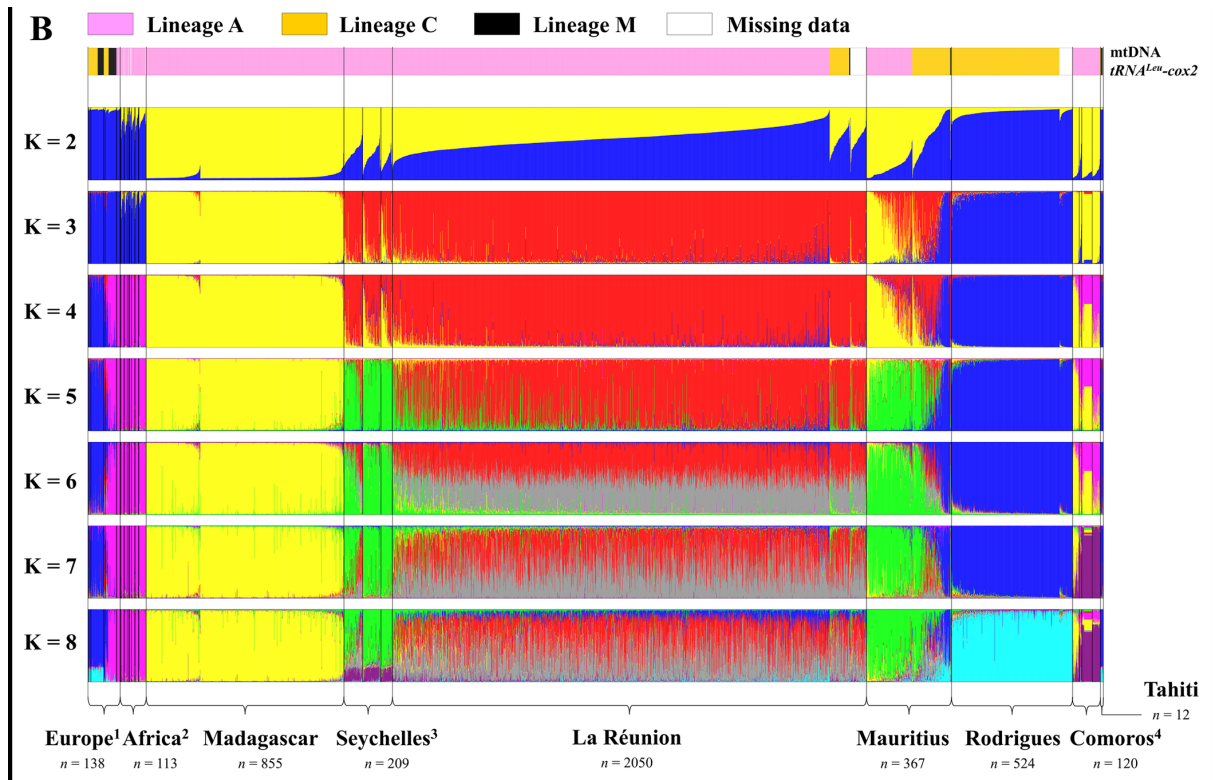


Figure I.7. Les populations d'abeilles du Sud-Ouest de l'Océan Indien sont génétiquement structurées. Elles sont à la fois différentes entre elles, et différentes des populations continentales Africaines et Européennes. Ces résultats sont issus de Techer *et al.* (2017b), et de l'analyse Bayésienne de 14 marqueurs microsatellites sous STRUCTURE.

Seychelles (Wragg et al. 2018), la prédominance du génome mitochondrial d'*A. m. unicolor* dans les populations où aucune introgression récente n'a été rapportée (La Réunion et les Seychelles) permet de faire l'hypothèse d'une sélection préférentielle, probablement liée aux caractéristiques climatiques et écologiques de la région SOOI.

3. Etudes des trajectoires évolutives des populations du SOOI : approche morphométrique

Les divergences génétiques entre populations géographiquement isolées engendrent généralement des divergences morphologiques. L'étude de ces divergences, lorsqu'on les compare à celles obtenues sur la base de marqueurs génétiques neutres, peut permettre de nous éclairer sur les mécanismes sous-jacents responsables de ces disparités et la manière dont ils affectent les trajectoires évolutives des populations. Les trois mécanismes pouvant expliquer les divergences phénotypiques sont les mécanismes stochastiques et neutres (i.e. dérive, effet fondateur, hybridation), la plasticité phénotypique, et l'adaptation aux pressions écologiques du milieu. Ces mécanismes peuvent agir de manière combinée, et différente suivant la population mais aussi le trait étudié.

Afin de mieux comprendre les trajectoires évolutives suivies par les populations d'abeilles du SOOI, les populations sont donc caractérisées morphologiquement. Toutefois, l'utilisation de caractères morphologiques a énormément évolué chez l'abeille. Elle s'est développée en même temps que les analyses statistiques, et de nouvelles approches ont émergées. L'étude morphologique des populations insulaires du SOOI dans le cadre de cette thèse s'inscrit dans une approche moderne, appelée morphométrie géométrique, basée sur une structure particulière : le patron de nervation alaire.

4. Apport des approches morphométriques pour caractériser la diversité d'*Apis mellifera*

4.1. Nécessité d'une approche morphométrique multivariée

Encore aujourd'hui, la description et la classification des sous-espèces d'*Apis mellifera* sont largement issues de l'analyse morphométrique (Francoy et al., 2008). Il n'existe cependant pas de classification de l'ensemble des sous-espèces reposant sur un jeu de quelques caractères discriminants simples (i.e. univariés). En effet, les caractères morphologiques mesurables chez les abeilles (taille du corps et des appendices, pigmentation, etc.) présentent

des changements progressifs et continus dont la gamme de variation conduit le plus souvent à des chevauchements entre sous-espèces (Ruttner, 1988). En général, elles ne diffèrent que légèrement dans les valeurs moyennes des caractères morphologiques mesurés. La caractérisation morphologique d'*Apis mellifera* au niveau infra-spécifique requiert donc des méthodes statistiques capables de prendre en compte de manière combinée un grand nombre de caractères. Ces méthodes, appelées analyses multivariées, ont été introduites chez l'abeille par DuPraw (1964, 1965), puis développées plus en détail par Ruttner *et al.* (1978).

Ces différences morphologiques subtiles et graduelles ont posé la question de savoir combien de caractères devraient être idéalement pris en compte dans les analyses morphométriques et lesquels sélectionner. Toutes les parties du corps des abeilles ont ainsi été explorées par les analyses, fournissant une multitude de marqueurs morphologiques qui peuvent être rangés en quatre catégories : ceux relatifs à la taille du corps et des appendices (ailes, pattes, etc.), les patterns de coloration, les caractéristiques des nervures alaires (angles et distances), et enfin les caractéristiques liées à la pilosité des abeilles (Alpatov, 1929 ; DuPraw, 1964, 1965 ; Ruttner, 1988)

Ruttner *et al.*, (1978) ont décrit et sélectionné 36 traits présentant un pouvoir discriminant suffisant pour caractériser les sous-espèces d'*Apis mellifera*. La mesure et l'analyse statistique de cet ensemble de caractères quantitatifs, comprenant des mesures d'angles, de distances, et de pigmentation, constituent la méthode morphométrique dite « traditionnelle » (Tofilski, 2008). A partir de ces critères morphologiques (Figure I.8), Ruttner *et al.* (1978) ont ainsi été capables d'inférer l'existence des lignées évolutives A, C, M et O.

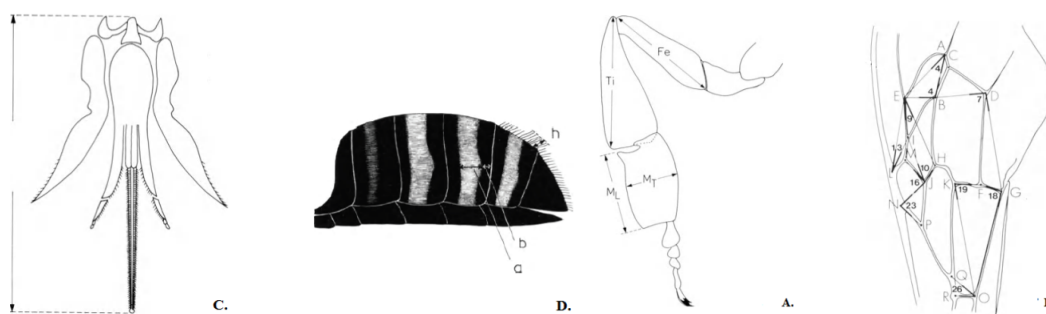


Figure I.8. Représentation schématique de quelques caractères utilisés en morphométrie classique chez *Apis mellifera* ssp. **A** : patte antérieure (Fe : fémur ; Ti : tibia ; ML : métatarse ; MT : largeur métatarse) ; **B** : aile antérieure (A04 – O26 : 11 angles mesurés) ; **C** : proboscis (« langue » de l'abeille) ; **D** : abdomen (a et b : largeur du tomentum ; h : longueur des poils). Source : Ruttner (1988).

4.2. La morphométrie classique, un outil efficace pour caractériser les populations d'*Apis mellifera*

Les avancées en statistiques et logiciels de traitement d'images ont facilité les analyses morphométriques standards (Francoy *et al.*, 2008). Elles permettent de discriminer les lignées évolutives, les sous-espèces jusqu'aux hybrides et écotypes d'*Apis mellifera* L. Par exemple, Sheppard et Meixner (2003) ont utilisé 39 caractères morphométriques issus de Ruttner *et al.* (1978) avec succès pour identifier une nouvelle sous-espèce en Asie centrale (*A. m. pomonella*), et dont les résultats sont corroborés par les analyses moléculaires. Plus récemment, Strange *et al.* (2007, 2008) sont parvenus à distinguer l'écotype régional landais (France) chez la sous-espèce *A. m. mellifera* (lignée M) via une analyse portée sur 36 caractères. La précision de la morphométrie standard est améliorée de manière significative par l'utilisation de nombreux caractères (Tofilski, 2008). Cependant, les procédures de mesures demeurent fastidieuses étant donné la diversité des structures biologiques que cela implique de mesurer.

5. Morphométrie alaire et morphométrie géométrique

5.1. Les ailes : une structure propice aux études morphométriques

Une alternative pour rendre la méthode moins fastidieuse consiste à augmenter le nombre de mesures effectuées sur les ailes des abeilles car, contrairement aux autres parties du corps, les ailes peuvent être mesurées automatiquement (Tofilski, 2008). La procédure est rapide et requiert peu de matériel (microscope, caméra, ordinateur, logiciel adapté). De nombreux caractères peuvent être dérivés du patron de nervation alaire, incluant des mesures de surface, de circonférence et de courbure de l'aile, en plus des traditionnelles mesures de distances et d'angles (Drauschke *et al.*, 2007).

5.2. La morphométrie géométrique appliquée aux ailes d'insectes

Parmi les désavantages de la morphométrie standard est que la forme des structures est difficilement dissociable des effets d'échelle et de taille (Zelditch *et al.*, 2004). Une approche appelée « morphométrie géométrique » a été développée ces vingt dernières années. Au lieu de mesurer les distances et les angles, cette méthode quantifie la géométrie d'une structure à l'aide des coordonnées cartésiennes de points-repères en s'affranchissant des effets d'échelle, de position et d'orientation (Bookstein, 1991). Les points-repères sont généralement placés à des intersections de tissus biologiques et doivent être homologues, c'est-à-dire correspondre aux mêmes structures chez tous les spécimens. Les configurations de points obtenues ne

diffèrent alors que par leur conformation et peuvent être ensuite comparées *via* des méthodes statistiques multivariées.

La morphométrie géométrique peut être appliquée efficacement aux ailes d'insectes car le patron de nervation alaire est une structure essentiellement bidimensionnelle et composée d'éléments homologues, les nervures, dont les intersections fournissent des points-repères idéaux. De nombreux travaux appliquant cette approche ont pu étudier l'héritabilité de la conformation alaire (Monteiro *et al.*, 2002 ; Klingenberg *et al.*, 2010), son développement (Klingenberg *et al.*, 2001), le dimorphisme sexuel (Pretorius, 2005 ; Gidaszewski *et al.*, 2009) ou la (micro-)taxonomie des insectes (Baylac *et al.*, 2003 ; Villemant *et al.*, 2007 ; Perrard *et al.*, 2014 ; Su *et al.*, 2015). Plusieurs logiciels dédiés à la morphométrie géométrique alaire sont désormais disponibles, comme DrawWing (Tofilski, 2004 ; <http://www.drawwing.org>), MorphoJ (Klingenberg, 2010 ; http://morphometrics.uk/MorphoJ_page.html), ou encore le logiciel en ligne ApiClass pour les abeilles (Baylac *et al.*, 2008 ; <http://apiclass.mnhn.fr>).

5.3. Le patron de nervation alaire, un marqueur efficace chez *Apis mellifera*

Dans son étude, Tofilski (2008) a montré que la morphométrie géométrique appliquée à la nervure des ailes peut être plus performante que la méthode standard pour discriminer des sous-espèces d'*A. mellifera*. Grâce à cette méthode, Francoy *et al.* (2008) ont pu discriminer l'abeille africanisée (poly-hybride à prédominance *A. m. scutellata*, lignée A) des sous-espèces européennes et africaines dont elle est issue, avec une précision de 99,2%. En conséquence, la morphométrie géométrique appliquée aux ailes est assez précise et performante pour permettre la discrimination d'individus d'*Apis mellifera* au niveau sous-spécifique (Figure I.9) (Kandemir *et al.*, 2011 ; Nawrocka *et al.*, 2017), écotypique (Strange *et al.*, 2008) et selon leur degré d'hybridation (Francoy *et al.*, 2008, 2009 ; Oleska et Tofilski, 2015). De plus, cette méthode s'est révélée efficace pour détecter des modifications morphologiques rapides (1977 à 2010) chez des populations d'*Apis mellifera* sauvages suite à des modifications brutales des conditions environnementales (Mikheyev *et al.*, 2015).

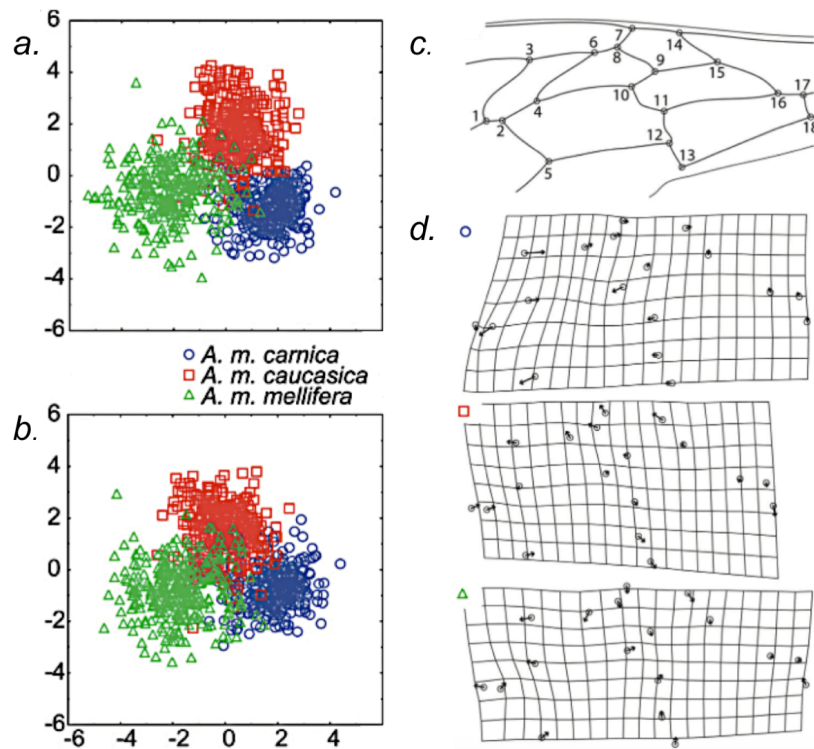


Figure I.9. Discrimination de trois sous-espèces d'*Apis mellifera* de lignées européennes (*A. m. carnica*, $n = 300$; *A. m. caucasica*, $n = 300$; *A. m. mellifera*, $n = 300$) basée sur la morphométrie géométrique (3a) - coordonnées de 18 points repères - ou classique (3b) - 4 distances et 11 angles - appliquées au patron de nervation alaire (3c). Les grilles de déformation (3d) obtenues grâce à l'outil géométrique illustrent les différences entre l'aile moyenne globale (trois sous-espèces confondues) et l'aile moyenne de chaque sous-espèce (cercles : jonctions de nervures ; flèches : amplitude et direction des déformations). Source : [Tofilski, 2008](#).

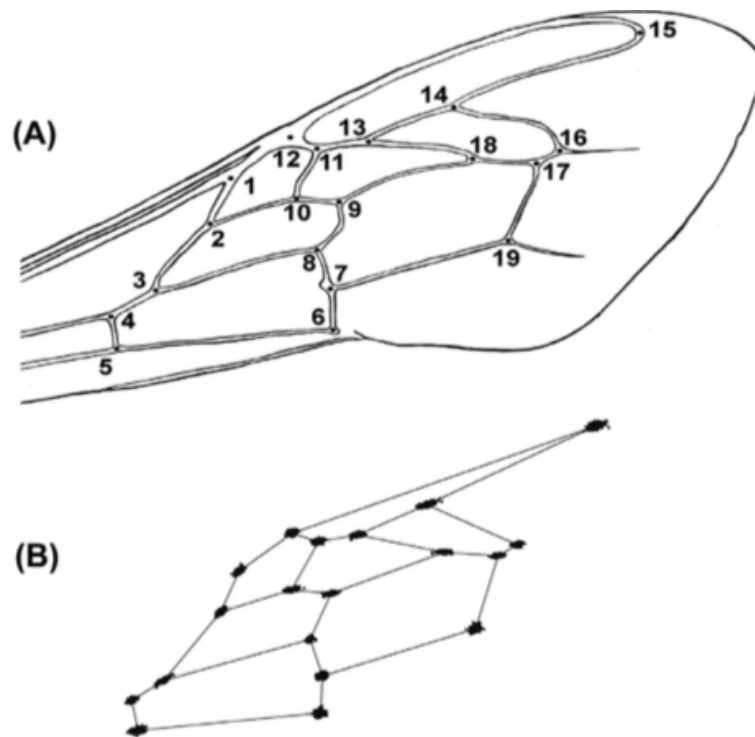


Figure I.10. A : Image d'une aile antérieure droite d'*A. mellifera*, avec les 19 point-repères positionnés aux intersections des nervures ; B : variabilité des point-repères après superposition Procrustes des ailes de plusieurs individus. Les liens (25 droites entre point-repères) servent à représenter les nervures principales. Source : Barour *et al.* (2011).

6. Analyse de la conformation des ailes par morphométrie géométrique : méthode de superposition Procrustes

6.1. Obtention des conformations par la méthode de superposition Procrustes

La géométrie des ailes est décrite par les coordonnées x et y de 19 point-repères placés aux intersections des nervures, soit 38 variables (Figure I.10). Chaque conformation peut alors être perçue comme une position unique au sein d'un espace à 38 dimensions. Cependant, le jeu de données brut n'est pas invariant aux effets d'échelle, d'orientation et de position liées à la phase d'acquisition des images et la taille des ailes. Pour être comparées, les conformations de chaque spécimen doivent être placées dans un référentiel commun, i.e. un même espace morphologique, également appelé « *shape-space* » ou espace des conformations. Cela est permis grâce à la procédure d'alignement par superposition Procrustes (Rohlf et Slice, 1990 ; Bookstein, 1991) qui s'effectue en trois étapes : (i) la translation des configurations afin de les faire converger sur leur centre de gravité, ou centroïde, ce qui supprime les effets de position, (ii) la normalisation des configurations par leur taille-centroïde (Bookstein, 1991), ce qui supprime les effets de taille mais conserve les proportions et les différences de conformations liées à la taille (allométrie), et enfin (iii) la rotation de toutes les configurations, de sorte que les distances entre points-repères deux-à-deux soient minimisées (Figure I.11 et I.12).

Les coordonnées cartésiennes des point-repères obtenues après superposition Procrustes sont appelées coordonnées Procrustes. La moyenne des coordonnées Procrustes d'un échantillon représente la conformation moyenne (« consensus »). Les distances entre deux conformations dans le *shape-space* sont appelées distances Procrustes et permettent de mesurer la (dis-)similarité entre deux ou plusieurs conformations.

6.2. Espace des conformations et espace tangent

Pour une structure donnée, l'ensemble des conformations possibles constitue un espace à $2n-4$ dimensions, où n est le nombre de point-repères utilisés. Les quatre dimensions perdues correspondent à 2 dimensions de position (x et y), une dimension de rotation et une dimension de taille. L'espace des conformations a la particularité d'être courbe (Dryden et Mardia, 1998), or les outils statistiques impliquent de travailler dans un espace euclidien. Pour contourner ce problème, les conformations sont projetées orthogonalement sur un espace euclidien tangent à l'espace des conformations (Figure I.12) (Dryden et Mardia, 1998 ; Rohlf, 1999 ; Slice, 2001). Cette projection entraîne des effets de déformations sur les distances, semblables à celles qui apparaissent lors de la projection du globe terrestre sur un planisphère.

Toutefois, en biologie, la variabilité des conformations des structures étudiées est suffisamment faible pour que les configurations mesurées restent proches du point tangent (Marcus *et al.*, 2000) et que les déformations puissent être considérées comme négligeables.

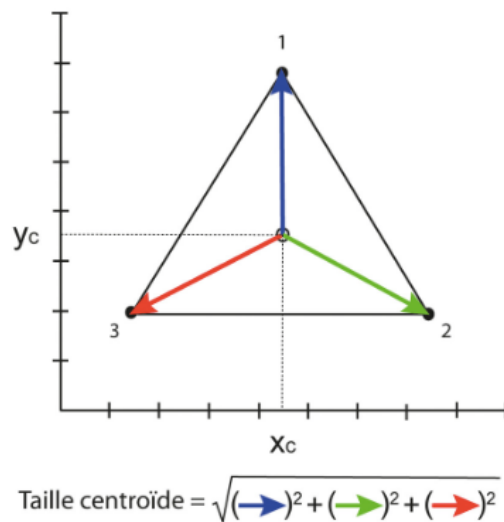


Figure I.11. Principe du calcul de la taille-centroïde illustré avec un triangle en deux dimensions. L'intersection entre x_c et y_c représente le centroïde (barycentre) du triangle ; la taille-centroïde correspond à la racine carrée de la somme des carrés des distances entre centroïde et point-repères. Source : Cucchi *et al.*, 2015.

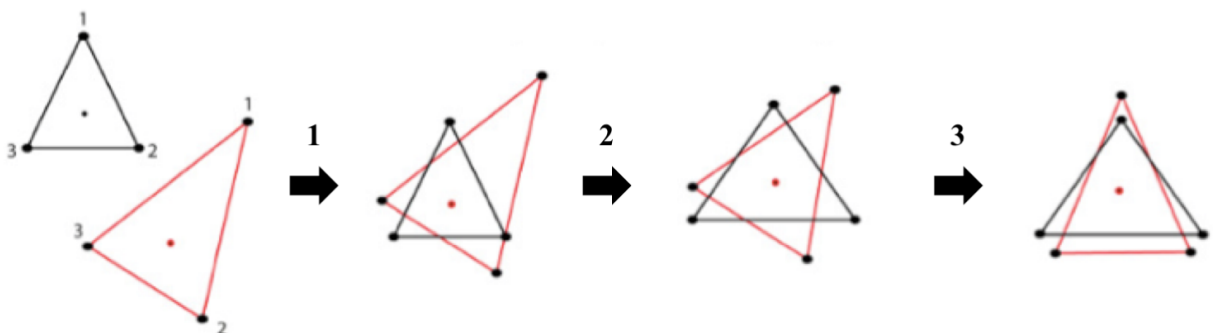


Figure I.12. Les trois étapes de superposition Procrustes illustrées à l'aide de triangles : 1) alignement sur la taille-centroïde 2) mise à l'échelle 3) rotation des conformations. Source : Cucchi *et al.*, 2015.

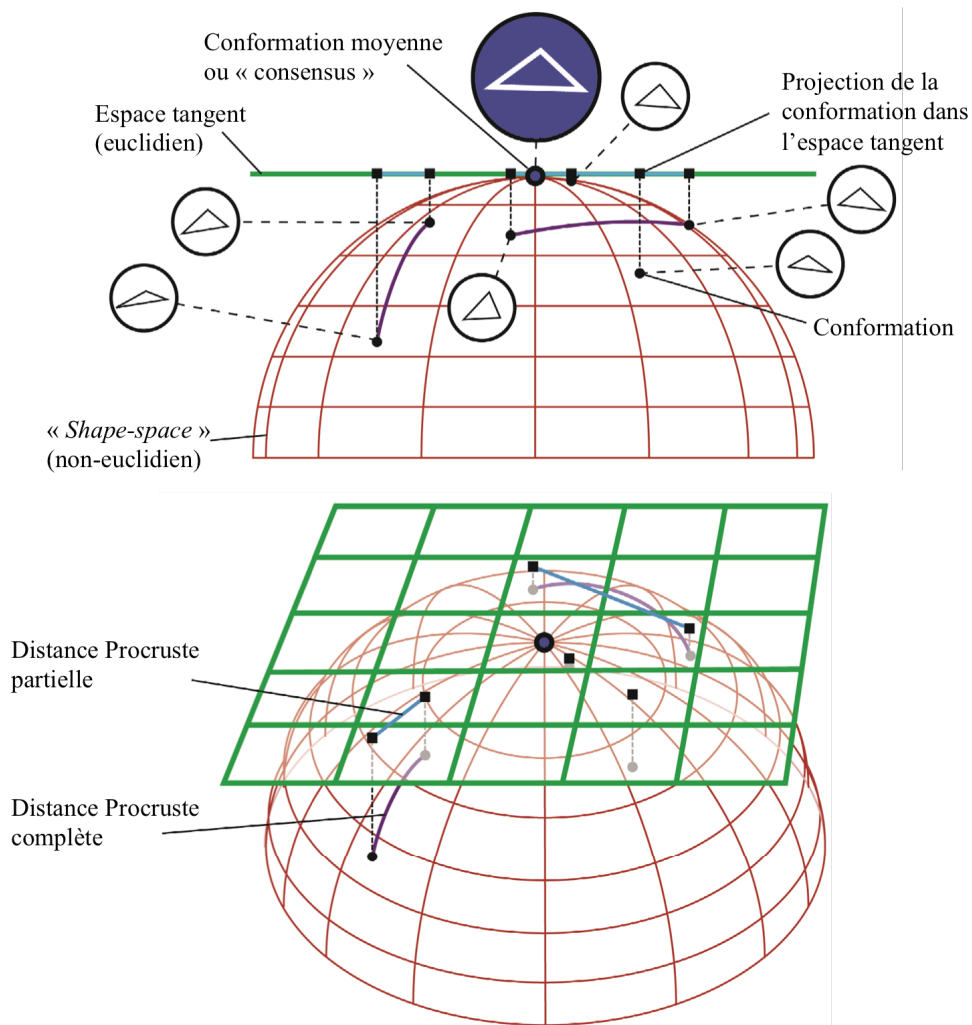


Figure I.13. Représentation du *shape-space* et de l'espace tangent pour des triangles en 2D décrits par trois point- repères. Dans ce cas, le *shape-space* est un espace à $(6-4) = 2$ dimensions correspondant à une surface courbe de forme hémisphérique. Un plus grand nombre de point-repères rendrait la représentation graphique des notions de conformation, *shape-space*, et d'espace tangent beaucoup plus complexe. Source : Perrard (2012).

6.3. Alignement des conformations par superposition Procruste

Il existe plusieurs méthodes d'alignement qui diffèrent dans leur façon d'extraire les effets d'échelle, d'orientation et de localisation (Webster et Sheets, 2010). La méthode utilisée au cours de cette thèse est la superposition Procruste implémentée dans le logiciel MorphoJ version 1.06d (Klingenberg, 2010) nommée « *Generalized Least-Squares Procrustes superimposition* ». Cette méthode minimise la somme des carrés des distances entre point-repères pour l'ensemble des individus, ce qui assure leur regroupement dans l'espace des conformation et une représentation précise (déformations négligeables) dans l'espace-tangent qui sert aux calculs ultérieurs (Dryden et Mardia, 1998 ; Rohlf et Slice, 1990) (Figure 13). Les coordonnées Procrustes peuvent ensuite faire l'objet d'analyses statistiques multivariées et répondre à une large gamme de questions biologiques.

6.4. Etude des différences de conformations entre groupes : analyses multivariées

Les ACP permettent dans un premier temps de visualiser les patrons globaux de structuration des individus sans *a priori* sur leur provenance géographique et/ou appartenance à un groupe génétique donné. Des analyses discriminantes appelées analyses canoniques (CVA, pour « *canonical variate analysis* ») sont ensuite réalisées pour tester et décrire les différences de conformations des ailes entre les populations. Cette méthode permet de maximiser la séparation entre groupes prédéfinis (origine insulaire, lignée génétique, sous-espèce, etc.). Pour une CVA à k variables mesurées sur des spécimens appartenant à G groupes, on s'assure que la taille totale de l'échantillon est supérieure à $[(2k - 4) + (G - 1)]$ pour garantir une estimation fiable de la structure de la matrice des variance-covariances (le nombre de degrés de liberté de la matrice des variance-covariances doit être supérieur au nombre de variables) (Webster and Sheets, 2010).

Des analyses par fonctions discriminantes (DFA, pour « *discriminant function analysis* ») sont ensuite menées afin de tester les divergences entre groupes pris deux-à-deux et calculer le nombre et le pourcentage d'individus correctement assignés à leur groupe d'origine. La performance des multiples DFA est évaluée par validation croisée en utilisant la méthode du Jackknife, procédé au cours duquel chaque spécimen est assigné à un groupe *via* la fonction discriminante calculée sur tous les individus hormis celui en cours de classification. Ceci limite le risque de sur-ajustement aux données et un taux d'assignement exagérément élevé

(Lachenbruch, 1967 ; Kovarovic *et al.*, 2011). Les DFA permettent ainsi de vérifier la fiabilité des divergences obtenues par CVA.

7. Objectifs de la thèse

Les objectifs de recherche de cette thèse sont liés à la caractérisation de la variabilité morphogénétique des populations d'abeille *Apis mellifera* des îles du Sud-Ouest de l'Océan Indien (SOOI).

Pour cela, nous avons caractérisé le patron de nervation alaire de plus de 1400 ouvrières issues de dix îles du SOOI, collectées dans différents sites de Madagascar et des trois archipels alentours : les Mascareignes (La Réunion, Maurice, Rodrigues), les Seychelles (Mahé, Praslin, La Digue) et les Comores (Grande Comore, Anjouan, Mohéli). Afin de pouvoir positionner la variabilité morphologique de l'abeille du SOOI dans un contexte global, il a été nécessaire d'implémenter des populations d'origine continentales (Afrique et Europe). Ainsi, grâce à des analyses multivariées *via* des approches de morphométrie géométrique (méthodes Procrustes) nous avons pu tester la congruence des divergences phénotypiques (estimés via la taille et forme de l'aile antérieure) et génétiques (estimées par 14 marqueurs microsatellites) entre populations issues des différents archipels et continents considérés.

Dans le **chapitre 1**, nous nous sommes concentrés sur le processus d'hybridation en cours à l'île Maurice entre la sous-espèce *A. m. unicolor* et des sous-espèces Européennes introduites récemment à des fins apicoles. Les objectifs étaient 1/ d'évaluer dans quelle mesure la variabilité morphologique mesurée est corrélée à la variabilité génétique neutre, 2/ de déterminer si les hybrides génétiques présentent des traits parentaux (Africains ou Européens), intermédiaires ou transgressifs (inédits) et 3/ de tester si l'asymétrie fluctuante (FA) de la taille et la forme de l'aile, considérée comme un estimateur de la stabilité développementale, est plus élevée chez les hybrides (en raison d'un 'stress génétique') et/ou plus élevée chez les individus de fond génétique Européens (en raison de leur développement dans un environnement tropical, *a priori* différent de celui de leur lignée évolutive d'origine) en comparaison avec les ouvrières de fond génétique Africain.

Dans le **chapitre 2**, nous avons étendu l'étude de la caractérisation de la variabilité phénotypique, estimée par la taille et forme des ailes, à l'ensemble des populations du SOOI. Les principaux objectifs étaient de caractériser la distribution de la variabilité

morphométrique entre et au sein des archipels, et de confronter les distances phénotypiques mesurées (Mahalanobis) aux distances génétiques neutres (indice de Nei et phylogénie).

La congruence éventuelle des approches morphologiques et génétiques devrait affiner notre connaissance des trajectoires évolutives des populations et permettre d'éclaircir les mécanismes évolutifs mis en jeu dans la mise en place des divergences entre populations insulaires du SOOI.

II. Chapitre 1 : Rencontre entre les abeilles (*Apis mellifera*) Européennes et Africaines sous les tropiques : changements morphologiques corrélés à la diversité génétique à l'île Maurice (Sud-Ouest de l'Océan Indien)

Résumé

La caractérisation génétique de la population d'abeilles domestiques de l'île Maurice (Océan Indien) a révélé une structure caractéristique de populations métissées, résultant d'une hybridation en cours entre la sous-espèce *Apis mellifera unicolor* et les sous-espèces Européennes récemment importées (*A. m. ligustica*, *A. m. carnica* et *A. m. mellifera*).

Ce contexte représente une opportunité remarquable pour étudier l'influence d'hybridation entre sous-espèces Africaines et Européennes sur les traits phénotypiques, ceci en dehors du cas bien documenté de l'abeille dite « Africanisée » (hybride entre *A. m. scutellata* d'Afrique du Sud et des sous-espèces Européennes).

Des analyses de morphométrie géométrique ont été conduites sur les ailes antérieures de 302 ouvrières, dont 280 avaient été préalablement génotypées à l'aide de 14 marqueurs microsatellites. Ces analyses ont permis (1) d'évaluer dans quelle mesure la variabilité morphologique mesurée est corrélée à la variabilité génétique neutre, (2) de déterminer si les hybrides génétiques présentent des traits parentaux (Africains ou Européens), intermédiaires ou transgressifs (inédits) et (3) de tester l'asymétrie fluctuante (AF) de la taille et de la forme de l'aile. En effet cette AF est considérée comme un estimateur de la stabilité développementale, et serait plus élevée chez les hybrides (en raison d'un 'stress génétique') et/ou plus élevée chez les individus de fond génétique Européens (en raison de leur développement dans un environnement tropical, *a priori* différent de celui de leur lignée évolutive d'origine) en comparaison avec les ouvrières de fond génétique Africain endémique.

Les analyses de type 'partial least-square' (PLS) ont montré une forte congruence entre la variabilité morphologique et la variabilité génétique neutre. Néanmoins, les ouvrières hybrides présentaient, en moyenne, plus de similarités avec le groupe d'ouvrières de fond génétique Africain, reflétant également la dynamique et le sens de l'introggression mise en évidence par les analyses génétiques. Une AF a été détectée pour la taille et la forme de l'aile,

traduisant un probable stress durant le développement des spécimens étudiés. Toutefois, les degrés d'asymétrie entre groupes génétiques considérés (Africain, Européen, Hybride) se sont révélés similaires.

En conclusion, ce travail montre que le processus d'hybridation en cours a contribué à l'augmentation de la diversité génétique et phénotypique des populations, et a donc influencé son potentiel adaptatif. L'asymétrie fluctuante détectée pour la taille et la forme des ailes sur tous les individus, indépendamment de leur fond génétique ne devrait donc pas engendrer de différence de valeur sélective ou de déplacement de ces traits morphométriques.

Mots clés : hybridation, conformation alaire, taille centroïde, aile antérieure, asymétrie fluctuante, *Apis mellifera*, morphométrie géométrique, partial least-squares, microsatellites, île.

Ce chapitre a été soumis à la revue PloS One.

Title

When European meets African honeybees (*Apis mellifera* L.) in the tropics: morphological changes related to genetics in Mauritius Island (South-West Indian Ocean)

Authors

Julien Galataud¹, Hélène Delatte², Ma  va Angélique Techer³, Christophe Simiand², Preaduth Sookar⁴, Bernard Reynaud⁵, Johanna Cl  mencet¹

¹: Université de La Réunion, UMR PVBMT, F-97715 Saint Denis cedex 9, La Réunion, France

²: CIRAD, UMR PVBMT, 7 chemin de l'Irat, Ligne Paradis, 97410 Saint Pierre, La Réunion, France

³: Okinawa Institute of Science and Technology, 1919-1 Tancha Onna-son, 904-0495 Okinawa, Japan

⁴: Ministry Of Agro Industry and Food Security, Agricultural Services, 80835 Reduit, Mauritius

⁵: Université de La Réunion, UMR PVBMT, 7 chemin de l'Irat, Ligne Paradis, 97410 Saint Pierre, La Réunion, France

Corresponding authors

Julien Galataud & Johanna Clémencet

E-Mail: julien.galataud@univ-reunion.fr; johanna.clemencet@univ-reunion.fr

Tel: 00 262 262 93 82 99

Key words hybridization, shape, centroid size, forewing, fluctuating asymmetry, *Apis mellifera unicolor*, geometric morphometrics, procrustes, partial least-squares, microsatellites, Island

Abstract

The genetic characterization of the honeybee population of Mauritius Island (Indian Ocean) revealed a structure characteristic of an admixed population undergoing hybridization between the previously established African subspecies *Apis mellifera unicolor* and recently imported European subspecies (*A. m. ligustica*, *A. m. carnica* and *A. m. mellifera*). This is a unique opportunity to study the influence of hybridization between African and European honeybees on phenotypic traits out of the case largely studied of the Africanized honeybee (hybrid between *A. m. scutellata* from South Africa and European subspecies). Geometric morphometric analyses have been conducted on forewings of 302 workers of which 280 genetically characterized (14 microsatellites) to evaluate if (1) the morphological variability coincides well with the neutral genetic variability, (2) if hybrids exhibited rather parental, intermediate or transgressive traits, and (3) to test if fluctuating asymmetry (FA) of size and shape, as a measure of developmental stability, is higher in hybrids (due to genetic stress) and higher in Europeans (due to unsuitable environment) compared with Africans. A strong concordance was found between morphological variability and neutral genetic variability, especially for wing shape, using partial least-square analyses (PLS). However, on average, hybrids had more similarities with the African pool, reflecting the dynamics and direction of introgression. Significant FA for wing size as well as wing shape was detected, suggesting the overall presence of stress during the development of the studied specimens. In contrast, the asymmetry levels do not differ according to the genotype (African, European or hybrid) of the individuals. Thus, if ongoing hybridization contributed to increasing the genetic and phenotypic diversity of the populations, and thus influences its adaptive potential, size FA and shape FA should not contribute to fitness and traits displacements.

Introduction

Hybridization, defined as the contact between previously isolated lineages that result in viable and – to a varying degree – fertile offspring [1], has been extensively facilitated by human movements and activities, which intensify and ignore natural boundaries [2, 3]. The recent establishment of gene flows through the dissemination – voluntary or not – of specimens out of their native range may result in increased phenotypic variation, especially in closely related populations with weak or non-existent reproductive barriers. Increased phenotypic variation is typically observed among individuals as a consequence of augmented genetic variability. The import of new alleles and the composition of novel genomic combinations by admixture and repeated backcrossings can generate a variety of phenotypes in offspring. These can range from parental types to intermediate or transgressive (extreme) forms, depending on both gene interactions (e.g. additive effects, over-dominance, epistasis), environmental influences on gene expression (external factors, e.g. temperatures, or internal factors, e.g. metabolism), and the relative part of selective and stochastic processes (dispersal and drift). Yet, inbreeding and exposure to unfamiliar environmental conditions may also affect the ability of individuals to undergo stable development, through disruption of coadapted gene complexes in hybrid offspring, and as a consequence of radical environmental changes for imported genomes [4, 5]. Development instability (DI) refers to slight and random deviations to perfect left-right symmetry in structures, and is classically measured as fluctuating asymmetry (FA). In many taxa, increased levels of FA were associated with (human-mediated) genomic and environmental stress, and reduced adaptive value or fitness of individuals. Thus, relating both components of morphological variation, i.e. between and within individuals variation (*via* FA), with neutral genetic markers permits hybrid characterization, and may provide valuable insight on the extent of hybridization as well as the mechanisms shaping hybrid populations.

This approach is of particular interest in the Western honeybee *Apis mellifera*, whose subspecies distribution is nowadays much influenced by beekeeping activities [6]. Four major evolutionary lineages occupying a wide natural range have been described by combining morphological and molecular approaches (A: African lineage, C and M: West and South-East European lineages, O: Middle East lineage) [7–11]. Nearly thirty *A. mellifera* subspecies and various ecotypes were identified and can supposedly all interbreed due to nonexistent or weak reproductive isolating barriers [12–14]. The highly polyandrous mating system of the honeybee with its extensive mating flights [15], coupled with large-scale migratory beekeeping and trade-in queens, promoted gene flow and introgression between formerly isolated honeybee populations within and outside its natural range [6]. The Africanized honeybee (AHB), a hybrid between *A. m. scutellata* (A lineage) and European-derived strains that rapidly spread across Americas in a few decades, illustrates how human-induced hybridization can promote diversification and colonization success through the creation of new genetic and phenotypic combinations when exploited in an adaptive way [16–19]. AHB is characterized by a predominance of African behavioral and physiological traits, with mid-sized wings harboring patterns of wing venation different from original subspecies – but apparently closer to the African parental [20] – facilitating its identification [21–23]. Predominance of African traits and the rapid loss of European alleles, while some European introgression has occurred, as well as better developmental stability in African honeybees compared to European and hybrids [24]. Such observation may reflect better fit of African genomes in tropical American conditions close to their native environment, as well as genetic incompatibilities, and dominance and epistatic action of African alleles, e.g. responsible for patterns of wing venation [20].

In this study, we focused on the honeybee population of Mauritius Island, located in the South-West Indian Ocean and also experiencing ongoing hybridization between African and

European lineages. It offers the opportunity to study the effects of relatively recent introgression on traits variability in tropical and insular environmental conditions. Latest genetic studies confirmed that the initial honeybee population of Mauritius belongs to the African lineage, closely related to *A. m. unicolor* [25] subspecies, endemic of Madagascar and established in surrounding archipelagos [26, 27]. Mitochondrial signatures of repeated importations of European continental subspecies in the current population have been detected, and the analyses of nuclear and mitochondrial genetic diversities revealed the occurrence of two hybridizing gene pools, with European and African ancestries sampled in near-balanced proportions (about 55% of African lineage, 44% of European C lineage, 1% of European M lineage) [27]. Morphological variability of Mauritius honeybees was examined on forewings size and venation patterns of the worker honeybees *via* geometric morphometric methods. Geo-morphometrics are now classically used in insect micro-taxonomy, and have been proved very effective in the identification of honeybee subspecies, ecotypes and hybrids [28, 9, 8, 11]. We then related between- and among-individuals variation of morphometric traits with neutral genetic structuring and the degree of hybridization of the individuals previously inferred from Bayesian analysis of microsatellite markers [27]. The relation between hybridization on developmental instabilities, i.e. individual FA, was also examined on both forewing size and shape.

Materials and methods

Genetic data

Techer et al. [27] previously genetically characterized the honeybee workers studied here, based on both neutral nuclear and mitochondrial markers. DNA was extracted from the legs and the rest of the body was conserved in 90% ethanol at -20°C. Matrilineal origin of individuals was identified by characterizing the COI-COII mitochondrial intergenic region

[29, 30, 8]. Length and sequence variation of this region allowed to assign individuals into three different evolutionary lineages: the African lineage A grouping the African subspecies, the European lineage C including subspecies naturally distributed east and south of the Alps, and the European lineage M including subspecies distributed in north and west of Europe [7]. The study of the nuclear genetic diversity and structuration of the population based on 14 microsatellite loci confirmed the presence of two genetic pools hybridizing in the population, one European derived from subspecies of C and M lineages, and one African related to *A. m. unicolor*. The degree of hybridization of individuals was summarized by a Bayesian hybrid index, which is a probability ranging from 0 (African) to 1 (European). Each specimen considered in this study was therefore genetically characterized by its lineage (A, C or M) based on mitochondrial markers, by the alleles at 14 microsatellite markers and its inferred degree of hybridization.

Wing data acquisition

Only individuals whose left and right forewings were available and properly preserved were used for morphometric measurements, totaling 302 specimens morphologically characterized, of which 283 were also genetically characterized (Table 1). The wings of each worker were cut at their basis, mounted in distilled water on a micrometric slide for scaling, and then photographed with a high-resolution camera mounted on a microscope (Leica DMC5400, Leica Microsystems). Nineteen landmarks were digitized at the vein intersections following Smith et al. [31] procedure (Fig 1A). The x and y Cartesian coordinates of each landmark were collected in ImageJ version 1.49u [32] with the Point Picker plugin (<http://bigwww.epfl.ch/thevenaz/pointpicker/>) [33]. To avoid any user effect, all measurements were made by a single operator. In addition, 36 individuals randomly selected

Table 1. Genetic, morphological and geographical data from honeybees (*A. mellifera*) sampled in Mauritius (24 sites).

Site	Genetic data						Morphological data	Full data	N individuals	Location				Date	N colonies/apiary	
	Lineage (mtDNA)			Hybrid index (nDNA)						Tot.	Latitude	Longitude	GPS X			GPS Y
	A	C	M	A	H	E										
MUS01		1			1		1	1	1	S 20°23'00.1"	EO 57°25'16.4"	-20.38333	57.42111	14/11/12	1	
MUS02	20			13	7		20	19	20	S 20°19'55.4"	EO 57°31'17.5"	-20.33194	57.52139	14/11/12	20	
MUS03		1			1		1	1	1	S 20°11'45.5"	EO 57°35'34.6"	-20.19583	57.59278	13/11/12	1	
MUS04	16			6	8		14	9	16	S 20°12'58.5"	EO 57°32'20.4"	-20.21611	57.53889	13/11/12	16	
MUS05	1	2		1	2		3	3	3	S 20°14'00.0"	EO 57°29'24.9"	-20.23333	57.49	13/11/12	3	
MUS06	10			6	3		9	9	10	S 20°14'33.0"	EO 57°28'38.0"	-	57.477089	15/11/12	10	
MUS07	12	1		3	9		12	13	13	S 20°14'20.7"	EO 57°27'04.1"	-20.23889	57.45111	15/11/12	13	
MUS08	18	2	2	6	15		21	19	22	S 20°12'06.4"	EO 57°25'12.0"	-20.20167	57.42	14/11/12	22	
MUS09	12	16	2	5	20	2	27	24	30	S 20°10'10.7"	EO 57°27'17.2"	-20.16944	57.45472	15/11/12	30	
MUS10	1			1			1		1	S 20°08'54.5"	EO 57°30'16.2"	-20.14833	57.50444	13/11/12	1	
MUS11	2			2			2		2	S 20°08'40.7"	EO 57°33'44.0"	-20.14444	57.56222	13/11/12	2	
MUS12	22	1		10	11		21	20	23	S 20°06'00.9"	EO 57°32'27.4"	-20.1	57.54083	13/11/12	23	
MUS13	1	3		1	3		4	4	4	S 20°06'10.5"	EO 57°34'54.3"	-20.10278	57.58167	12/11/12	4	
MUS14	1			1			1	1	1	S 20°06'18.2"	EO 57°38'56.7"	-20.105	57.64889	15/11/12	1	
MUS15	4	4		3	5		8	8	8	S 20°04'19.5"	EO 57°40'26.7"	-20.07194	57.67389	15/11/12	8	
MUS16	14			8	5		13	13	14	S 20°07'00.5"	EO 57°42'03.3"	-20.11667	57.70083	12/11/12	15	
MUS17	14	1		3	10		13	15	15	S 20°06'38.8"	EO 57°43'08.4"	-20.11056	57.71889	15/11/12	15	
MUS18	27	1		14	14		28	22	28	S 20°07'58.5"	EO 57°43'09.5"	-20.13278	57.71917	16/11/12	45	
MUS19	4	15		2	15	1	18	13	19	S 20°08'17.6"	EO 57°44'41.1"	-20.13806	57.74472	16/11/12	19	
MUS20		99			67	18	85	85	100	S 20°08'56.3"	EO 57°43'35.3"	-20.14889	57.72639	12/11/12	150	
MUS21	1	19			11	7	18	19	20	S 20°11'40.1"	EO 57°43'38.7"	-20.19444	57.72722	12/11/12	21	
MUS22	1			1			1	1	1	S 20°14'53.3"	EO 57°40'52.9"	-20.24806	57.68111	13/11/12	1	
MUS23	1			1			1	1	1	S 20°17'17.2"	EO 57°41'32.2"	-20.28806	57.69222	13/11/12	1	
MUS24	2			1	1		2	2	2	S 20°25'53.2"	EO 57°39'43.4"	-20.43139	57.66194	16/11/12	2	
Total	184	166	4	88	208	28	324	302	355							

mtDNA, mitochondrial DNA (COI-COII intergenic region); A, African lineage; C, Eastern European lineage; M, Western European lineage.

nDNA, nuclear DNA (14 microsatellite markers); Hybrid index (HI), probability of belonging to the African or European genetic cluster, obtained *via* Bayesian analyses of 14 microsatellites (see Techer et al. [27]); A, “pure” Africans (HI ≤ 0.1); H, hybrids (0.1 < HI < 0.9); E, “pure” Europeans (HI ≥ 0.9) [45].

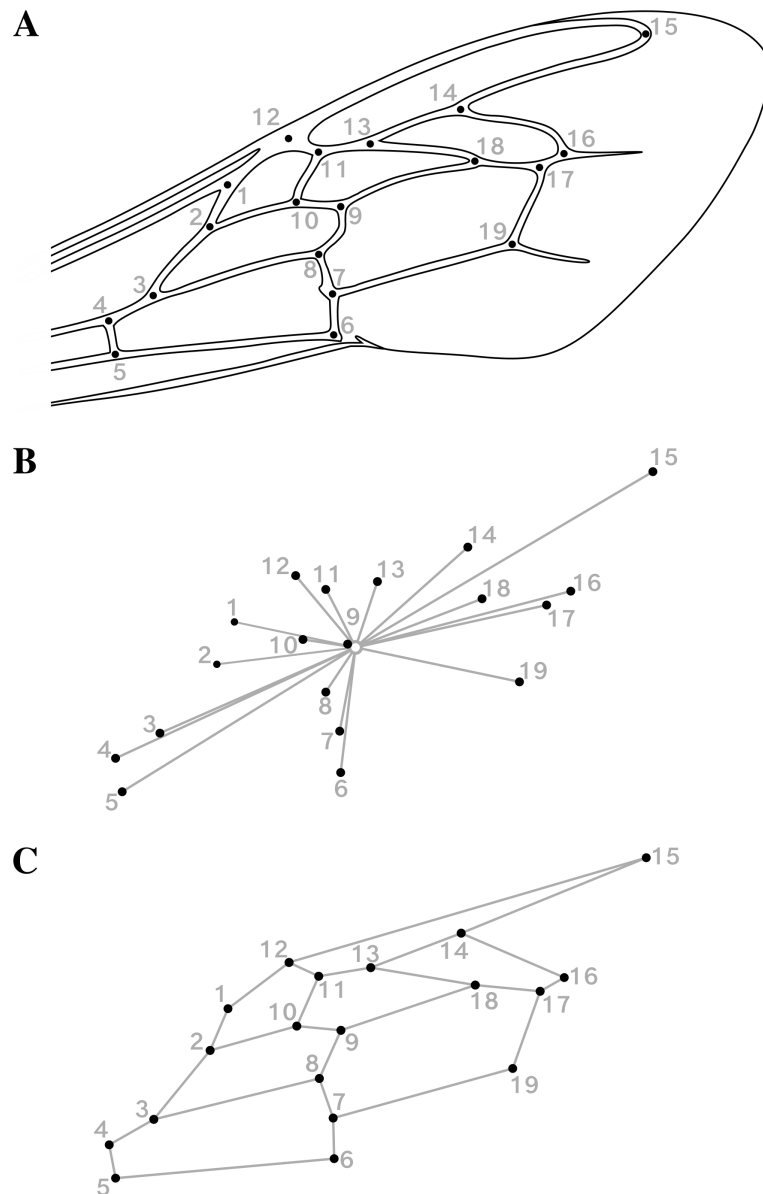


Fig 1. Geometric morphometrics of the forewing venation of honeybee workers (*Apis mellifera*).

(A) Location of the 19 landmarks digitized on the right and (mirrored) left forewings of *Apis mellifera* workers, following Smith et al. [31] procedure. (B) Visual representation of the centroid size as computed for 19 landmarks on a forewing of *Apis mellifera*. The open circle is the centroid (i.e. the barycenter) of the landmark configuration; the segments connecting the centroid to the landmarks represent the distances used to compute centroid size. (C) Wireframe visualization of forewing shape. The landmarks are connected with straight lines depicting the wing venation pattern.

were photographed then digitized twice in separate sessions to quantify measurement errors related to image acquisition and landmark positioning.

Forewing size and shape extraction

Overall wing size was estimated by the centroid size (CS), a measure equal to the square root of the sum of the squared distances between each landmark and the centroid, i.e. the barycenter of the landmark configuration (Fig 1B). Wing shape variables were extracted from x and y coordinates of the 19 landmarks *via* a generalized least-squares Procrustes superimposition with the following steps [34, 35] (Fig 1C): (1) right and – previously mirrored – left wings of each individual were centered on their centroid, then (2) normalized to unit centroid-size (CS = 1.0) to remove size and shape association (i.e. isometry), and (3) iteratively rotated to minimize the sum of squared distances between each configuration and the sample mean. Thus, any difference in Procrustes coordinates of corresponding landmarks between two configurations resulted from (isometry-free) shape differences, expressed in units of Procrustes distances (dimensionless). As a consequence of Procrustes superimposition steps, 4 degrees of freedom are lost (two for centering, one for scaling, and one for rotation) resulting in $38 - 4 = 34$ shape space dimensions.

Amounts of among individuals' variation and asymmetry

The first step consisted in testing the presence of directional and fluctuating asymmetry while accounting for measurement errors relating to both the position and orientation of the wings in the photos and the digitization of the landmarks at vein intersections. An ANOVA on CS for size [36, 37] and a Procrustes ANOVA on Procrustes distances for shape [38, 35] were therefore conducted on the subsample of 36 specimens whose forewings were photographed and digitized twice. Both analyses follow the same two-way mixed model design and partition the total variation into components of symmetric and asymmetric variation. Following this design, the main random effect 'individual' represents

the variation among individuals and is computed as individuals' left-right means (corrected for any type of asymmetry). The second main and fixed effect 'side' represents directional asymmetry (DA) and is computed as mean of left-right differences. Fluctuating asymmetry (FA), expressed as individual left-right differences, is represented by the interaction term 'individual \times side' (a mixed effect). Measurement errors due to imaging (ME1) and digitizing (ME2) are quantified by the variation over replicates for each individual and side. Statistical significance of the various effects was assessed with parametric Goodall's F tests [39], based on summed square Procrustes distances in the case of shape [38]. Ultimately, to determine the proportion of size or shape variation explained by each factor in the whole sample, the same analyses were conducted on the complete data but in the absence of replicates, after proving the measurement errors as negligible (see Results). All the analyses mentioned above were conducted with the software MorphoJ (<https://www.R-project.org/>) [40].

Congruence between morphological and neutral genetic variation

To assess the congruence between morphometric and genetic datasets, we conducted partial least squares (PLS) analyses in MorphoJ using alternatively wings size and shape (i.e., centroid sizes and Procrustes coordinates) against microsatellite allele frequencies. The PLS method is based on a singular value decomposition of the matrix of covariances between two separate blocks of variables [41, 42]. It resulted in paired axes uncorrelated and ordered by decreasing singular values, each forming linear combinations of the variables from each dataset and accounting for as much as possible of the overall covariance. The number of axes was equal to the number of dimensions in the smaller dataset (i.e. 1 for size and 34 for shape). The overall association between morphological and genetic datasets was assessed by the Escoufier's RV coefficient [43], a multivariate generalization of the squared Pearson correlation coefficient (r). Singular values, correlations between paired PLS axes as well as RV coefficients were statistically tested by randomly permuting the individuals (rows) in the

shape block (10,000 iterations), so that the covariance structure between blocks was modified without altering the variance within blocks [41, 42]. Additionally, to parallel dominant patterns of covariance between blocks to the major patterns of variation within each block, PLS singular axes were compared to their counterparts from principal component analyses conducted separately on shape and genetic datasets. For this purpose, angles and correlations between corresponding PLS and PCA axes were computed and statistically tested in MorphoJ [44]. Regarding genetic data, the results of multivariate analyses were faced with the Bayesian clustering method by measuring correlation of PLS and PCA scores with hybrid index values.

Effects of hybridization on wings morphology

The hybrid index (HI) was directly exploited to specifically address how the current intraspecific admixture between two genetic pools, one prior African related to *A. m. unicolor* and one European composed of recently imported subspecies (C and M lineages), affected wings size and shape of honeybees in Mauritius. As a first step, HI was used as a grouping variable to distinct hybridized individuals from non-hybridized. Three clusters were created following Vähä and Primmer [45] recommendations: the workers were classified as ‘pure’ Africans if HI was smaller than 0.1 ($N_{\text{AFR}} = 74$), as ‘pure’ Europeans if HI was larger than 0.9 ($N_{\text{EUR}} = 27$), and as hybrids ($N_{\text{H}} = 177$) if HI was contained between those values [46, 10]. This results in means/medians values of 0.06/0.06 for ‘pure’ Africans, 0.39/0.32 for hybrids, and 0.96/0.97 for ‘pure’ Europeans, denoting that hybrid values are slightly shifted towards the African genetic cluster. A one-way ANOVA with post-hoc tests was conducted to compare group means based on wings size. Regarding wings shape, given the unequal distribution of individuals in different clusters and the high dimensionality of the Procrustes dataset (34 dimensions), a between-group PCA was conducted, as recommended by Mitteroecker and Bookstein [47]. This allowed (*I*) examining the relative arrangement of the

three clusters in a reduced space of two dimensions, (2) evaluating the significance of group separation, and (3) visualizing related shape changes. Pairwise mean differences and reliability of classification rates were assessed by a leave-one-out cross-validation and permutation tests (30,000 iterations). To determine if hybrids presented phenotypic transgression, the angle formed by the vectors joining the cluster means (Hybrids – Africans – Europeans: \widehat{HAE}) in the shape-space was computed and tested. This analyze was achieved in RStudio software (<https://www.R-project.org/>) [48], using the trajectory.analysis function from the package geomorph [49, 50]. Additionally, correlations between size, bgPC1 and bgPC2 scores and HI were estimated.

Effect of hybridization on wings asymmetry

Size FA of each individual was given by the difference between the CS of the left and the right forewing. The amount of shape FA of each individual was synthetized in the form of univariate scores based on either Procrustes distances (Procrustes FA scores) or Mahalanobis distances (Mahalanobis FA scores), which take the covariance structure into account [51, 42]. To establish the reliability of these measures (delivered in MorphoJ when performing ANOVAs), intraclass correlation coefficients (2,1) were computed in the sub-dataset with repeats [52, 53]. The association between the amounts of FA and size variability was then explored with regression analyzes and permutation tests (10,000 iterations). HI was treated as a continuous, rather than a categorical variable to better infer the relationship between the level of hybridization and the amount of developmental instability, while providing precision, flexibility and statistical power compared to ANOVAs [54, 55]. In this perspective, linear and quadratic regressions were conducted to find the optimal fit for data trends, comparing *F*-ratios and fit indices (AIC, AICc and BIC) for model choice. Developmental instability, measured as FA, could indeed express a variety of patterns, characterized by linearity or

monotonous change towards some specific value [56], depending of the underlying mechanisms that drive it.

Results

Estimating measurement errors

The repeated measures ANOVAs performed on a subsample of 36 honeybees photographed and digitized twice showed that mean squares for FA of size (centroid size) and shape (Procrustes distances) exceeded the error component by 64 and 19-fold respectively, and much more for individual variation (Table 2). Although significant, measurement errors accounted for a tiny part of overall variation (size: 0.12%, shape: 1.00%, $P < 0.0001$). In addition, FA was found highly significant in both traits (size: $F = 64.80$, $P < 0.0001$; shape: $F = 18.83$, $P < 0.0001$). Measurement errors were thus considered negligible relative to the biological variation, and measures of asymmetry appear reliable.

Table 2. Analysis of variance of forewing size and shape in 36 honeybees photographed and digitized twice.

Size (Centroid size)	ANOVA					
Effect	SS	df	%Var.	MS	Goodall's <i>F</i>	<i>P</i>
<i>Individuals</i>	12209246.53	35	96.19%	348835.62	26.50	< 0.0001
<i>Sides</i>	6216.62	1	0.05%	6216.62	0.47	0.4965
<i>Individuals × sides</i>	460811.61	35	3.63%	13166.05	64.80	< 0.0001
<i>ME1: imaging</i>	14626.51	72	0.12%	203.15	11.33	< 0.0001
<i>ME2: landmark digitizing</i>	2581.80	144	0.02%	17.93		
Shape (Procrustes distances)	Procrustes ANOVA					
Effect	SS ×10 ⁵	df	%Var.	MS ×10 ⁵	Goodall's <i>F</i>	<i>P</i>
<i>Individuals</i>	13403.27	1190	88.35%	11.26	9.70	< 0.0001
<i>Sides</i>	119.44	34	0.79%	3.51	3.02	< 0.0001
<i>Individuals × sides</i>	1381.96	1190	9.11%	1.16	18.83	< 0.0001
<i>ME1: imaging</i>	150.97	2448	1.00%	0.06	2.63	< 0.0001
<i>ME2: landmark digitizing</i>	114.90	4896	0.76%	0.02		

df, degrees of freedom (in Procrustes ANOVA, df is that for conventional ANOVA multiplied by the shape dimension, i.e. 34); SS, sum of squares; MS, mean squares; %Var., percentage contributions of each variance component to the total variance, computed from SS values.

'Individuals': variation among individuals (i.e. symmetric component); 'Sides': directional asymmetry (DA), 'individuals x sides' interaction: fluctuating asymmetry (FA).

$$F_{Ind.} = MS_{Ind.} / MS_{Ind. \times Sides}$$

$$F_{Sides} = MS_{Sides} / MS_{Ind. \times Sides}$$

$$F_{Ind. \times Sides} = MS_{Ind. \times Sides} / MS_{ME1}$$

$$F_{ME1} = MS_{ME1} / MS_{ME2}$$

Quantifying among individuals variation and asymmetry

The ANOVAs performed on the whole sample (Table 3) indicated that morphological variation among individuals ('individuals' effect) accounts for the largest portion of the variation in the whole sample (99.27% for size and 91.02% for shape, $P < 0.0001$). Directional asymmetry ('sides' effect) was found significant only for shape ($F = 16.69$, $P < 0.0001$), despite a tiny contribution to sample variability (0.79%). Fluctuating asymmetry also contributes to only 0.72% of size variation, compared to 8.51% for wing shape.

Congruence between morphology and neutral genetic variation

Partial least square (PLS) analyses were used to measure the congruence of wing size (centroid size), and then wing shape variation (Procrustes coordinates), with microsatellite allele frequencies. In both cases, we found a relatively strong overall association between morphological and genetic blocks, resulting in a RV coefficient of 0.29 for size ($P_{\text{perm}} < 0.0001$) and 0.32 for shape ($P_{\text{perm}} < 0.0001$). The PLS analysis conducted between size (one dimension) and microsatellites resulted in a single pair of axes whose corresponding PLS scores are moderately and significantly correlated ($SV = 220.98$, $r = 0.58$, $P_{\text{perm}} < 0.0001$). Note that the size vector ordered individuals according to their wings size, so that size-PLS scores and centroid sizes are interchangeable. The PLS analysis conducted between shape and microsatellites resulted in 34 pairs of PLS axes, of which only the first was found significant, taking up 90.02% of the total covariance. Microsatellite and shape PLS1 scores were also highly correlated ($SV1 = 0.014$, $r = 0.71$, $P_{\text{perm}} < 0.0001$). When compared to the PCAs (S1 and S2 Figs) computed separately on the same data, the major shape and genetic PLS axes appear nearly identical to the corresponding first principal components (microsatellite PC1 = 23.35%, shape PC1 = 22.22%), with pairwise correlations displaying values greater than 0.98 and highly significant ($P < 2.2e-16$). Overall, these results suggest that the major dimension

Table 3. Analysis of variance for both forewing size and shape of honeybee workers (*Apis mellifera*).

Size (Centroid size)	ANOVA					
Effect	SS	df	%Var.	MS	Goodall's <i>F</i>	<i>P</i>
<i>Individuals</i>	21922690.35	301	99.27%	72832.86	137.46	< 0.0001
<i>Sides</i>	471.81	1	0.002%	471.81	0.89	0.3461
<i>Individuals</i> × <i>sides</i>	159485.47	301	0.72%	529.85		
Shape (Procrustes coordinates)	Procrustes ANOVA					
Effect	SS (×10 ⁵)	df	%Var.	MS ×10 ⁵	Goodall's <i>F</i>	<i>P</i>
<i>Individuals</i>	27146.97	10234	91.02%	2.65	10.69	< 0.0001
<i>Sides</i>	140.00	34	0.47%	4.12	16.60	< 0.0001
<i>Individuals</i> × <i>sides</i>	2538.83	10234	8.51%	0.25		

df, degrees of freedom (in Procrustes ANOVA, df is that for conventional ANOVA multiplied by the shape dimension, i.e. 34); SS, sum of squares; MS, mean squares; %Var., percentage contributions of each variance component to the total variance, computed from SS values.

‘Individuals’: variation among individuals (i.e. symmetric component); ‘Sides’: directional asymmetry (DA), ‘individuals x sides’ interaction: fluctuating asymmetry (FA).

$$F_{Ind.} = MS_{Ind.} / MS_{Ind. \times Sides}$$

$$F_{Sides} = MS_{Sides} / MS_{Ind. \times Sides}$$

of variation between morphological and genetic blocks is equivalent to the dominant variation within the same blocks. The associated patterns illustrated in **Figs 2A** and **2B** reveal a (essentially) one-dimensional morphogenetic continuum polarized between African and European lineages and reflecting the ongoing hybridization process. Besides, high similarities found between the hybrid index (HI) and the dominant genetic PCA and PLS axes ($r = 0.98$, $P < 2.2e-16$) prove multivariate analyses as accurate as the Bayesian method.

Effects of hybridization on wing size

The one-way ANOVA conducted on centroid sizes determined that differences exist among clusters, and both Tukey and Games-Howell (equal variances not assumed) post-hoc tests found highly significant differences for all pairwise comparisons of means ($P_{\text{adj}} < 0.0001$). The African cluster presents the smaller wings ($6453 \mu\text{m}$, $\text{sd} = 145 \mu\text{m}$, $\text{se} = 17 \mu\text{m}$, $\text{ci} = 33 \mu\text{m}$), the greatest ones corresponding to the European cluster ($6778 \mu\text{m}$, $\text{sd} = 195 \mu\text{m}$, $\text{se} = 38 \mu\text{m}$, $\text{ci} = 77 \mu\text{m}$), and hybrids occupying an intermediate place closer to the African cluster ($6560 \mu\text{m}$, $\text{sd} = 176 \mu\text{m}$, $\text{se} = 13 \mu\text{m}$, $\text{ci} = 26 \mu\text{m}$). Finally, as expected, wing size – treated as continuous – is positively correlated with HI ($r = 0.59$, $P < 0.0001$) and coincides well with the continuum of introgression between African and European genetic pools (**Fig 3A**).

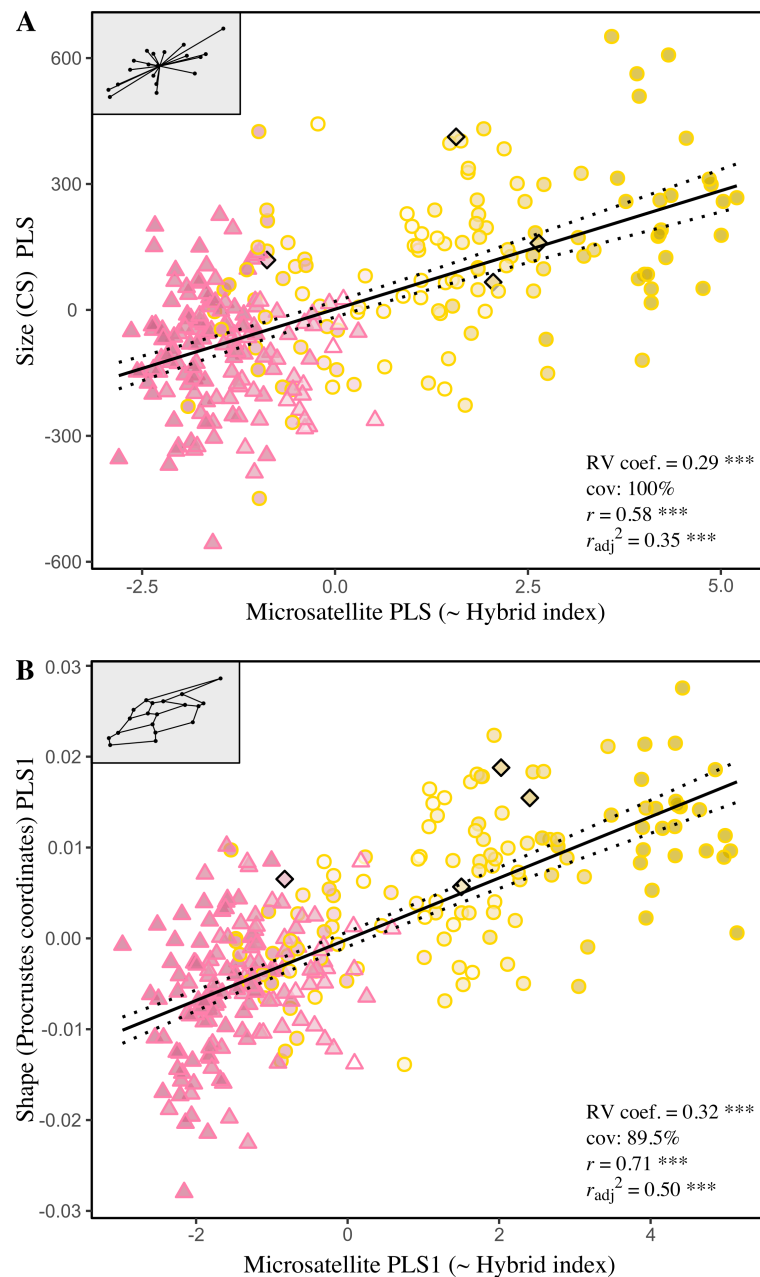


Fig 2. Patterns of covariation between forewing morphology and neutral genetic variation assessed *via* partial least-square analyses (PLS).

(A) Scatter plot of the PLS of the forewing size (centroid size) and neutral genetic variation (14 microsatellite allele frequencies). The analysis resulted in one significant pair of PLS axes (10,000 permutations) accounting for 100% of covariation since size is a one-dimensional variable. (B) Scatter plot of the PLS of the forewing shape (Procrustes coordinates) and neutral genetic variation (14 microsatellite allele frequencies). The first pair of PLS axes is shown, which is also the only pair found significant by the permutation test (10,000 perm.). In the graphs, each point represents one individual. The symbol and outline color represents the maternal origin of individuals (Δ African lineage, \circ European C lineage, \diamond European M lineage). The fill color symbolizes the hybrid index (HI), i.e. the hybridization gradient from African genotypes (pink) to European genotypes (yellow). Regressions lines with 95% confidence intervals (dotted lines) are shown.

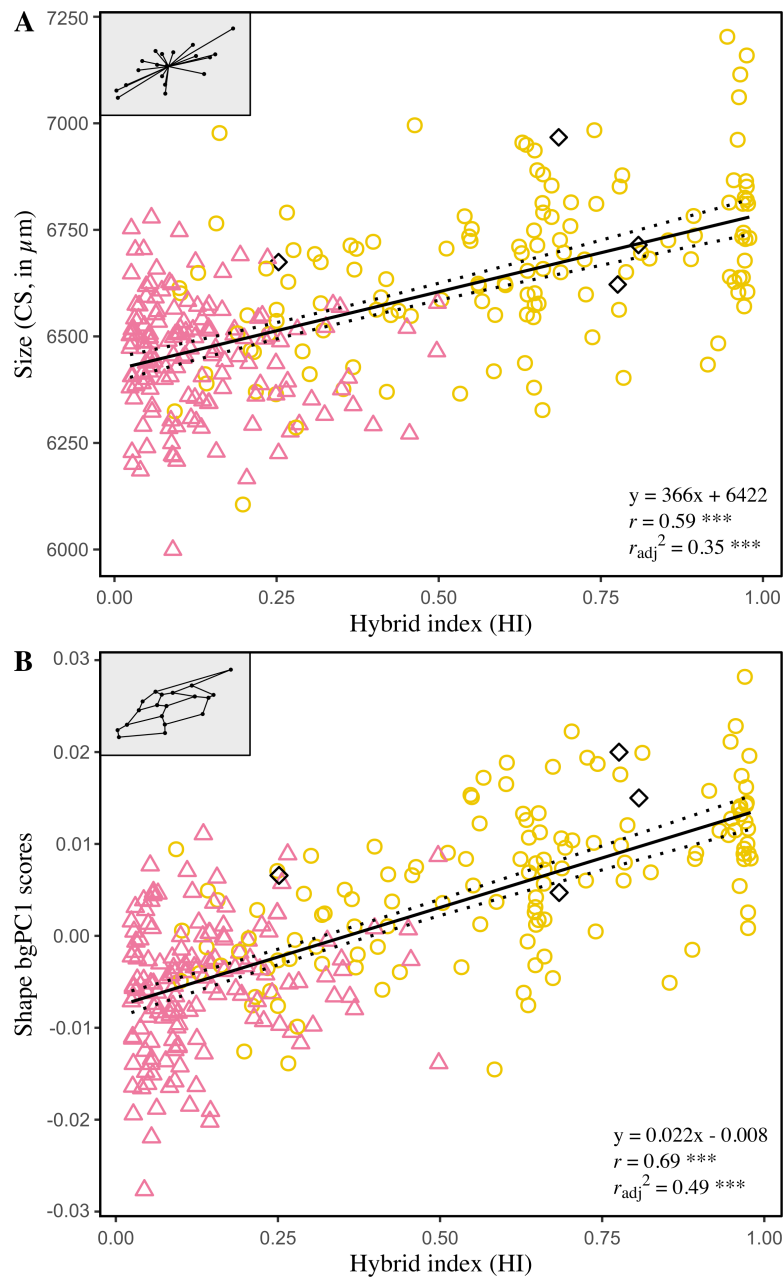


Fig 3. Relationships between forewing size (A) and shape (B), as captures by the between-group PCA, and the hybrid index.

CS: average centroid sizes, i.e. mean of right and the left forewing computed for each individual, in μm ; bgPC1: first axis of the between-group PCA conducted on individuals classified as “pure” Africans, “pure” European and hybrids. The symbol and outline color represents the maternal origin of individuals (\triangle African lineage, \circ European C lineage, \diamond European M lineage) inferred from mitochondrial markers. Regressions lines with 95% confidence intervals (dotted lines) are shown.

Effects of hybridization on wing shape

The between-group PCA conducted on wings shape (left-right mean of Procrustes coordinates) resulted in two orthogonal axes representing the Euclidean distances among the three cluster means. The first axis (bgPC1), accounts for 90.69% of the variation between group means, against 9.31% for bgPC2. Cross-validated classification revealed poor overall accuracy with only 57.14% of individuals correctly classified, which is largely attributable to the strong overlap of the hybrids on other clusters (correct classification rate rises to 90.20% when hybrids are excluded). ‘Pure’ Africans and ‘pure’ Europeans appear more distinct, and each presents a single misclassified individual attributed to the opposite group (‘pure’ Afr.: 72.97%, ‘pure’ Eur.: 81.48 %) (Table 4). The trajectory analysis failed to find an angle statistically different from 0° between the vector connecting the mean shapes of the three clusters ($\widehat{HAE} = 26.13^\circ$, $P = 0.29$). Instead, it revealed significant differences of magnitudes (i.e. vectors size), suggesting intermediacy rather than transgressive phenotypes in hybrids shape with greater proximity toward ‘pure’ Africans (A – E: 0.020; A – H: 0.009; E – H: 0.013, $P < 0.0001$ for all distances). The associated shape changes as captured by bgPCA components are depicted in the form of wireframe graphs [58] in Fig 4. Notice that the joint analysis of size and shape (not shown) did not improved classification rates [47]. Again, strong association is observed between bgPC1 and HI ($r = 0.70$, $P < 0.0001$), while it is absent for bgPC2 ($r = -0.01$, $P = 0.87$) (Fig 3B).

Table 4. Cross-validated classification of worker honeybees as pure Africans (A), pure Europeans (E) and hybrids (H) using forewing shape.

Cluster	classified as			Correct assignments (%)
	“Pure” A	“Pure” E	Hybrids	
“Pure” A	54	1	20	72.00%
“Pure” E	1	22	4	81.48%
Hybrids	57	37	84	47.19%

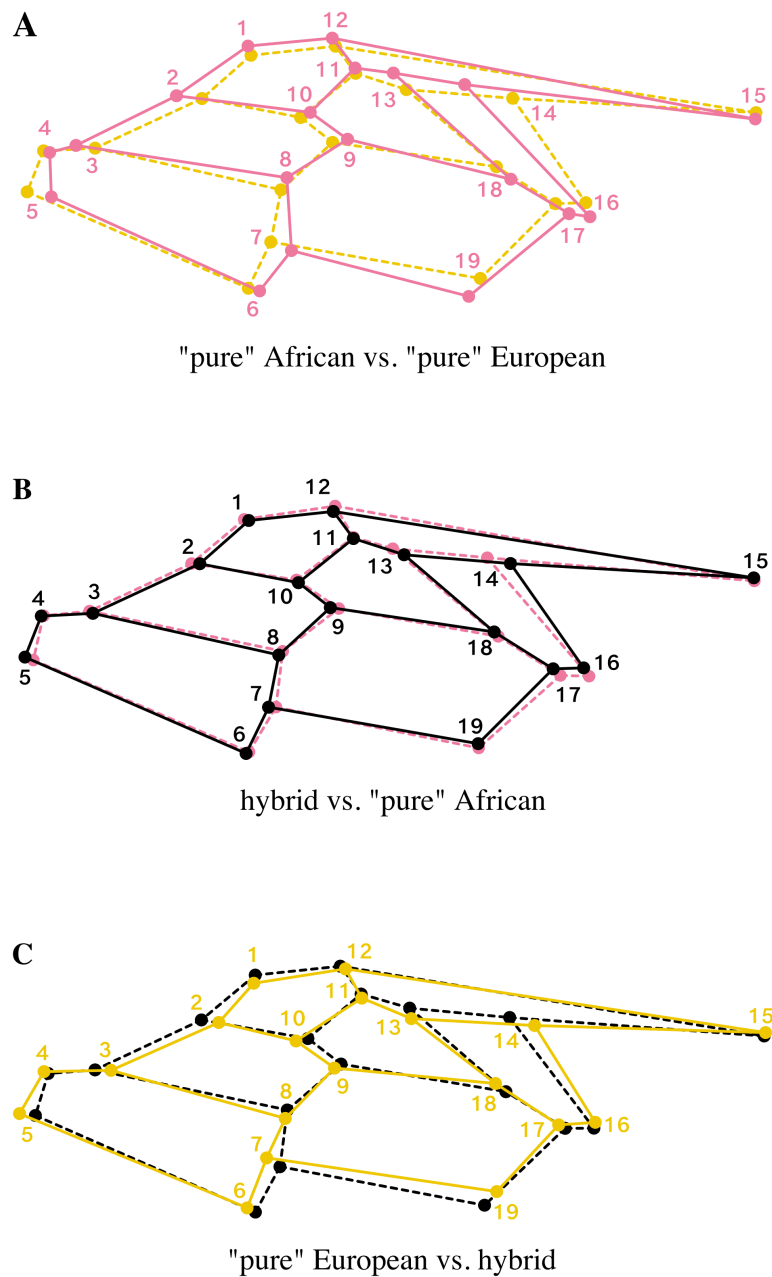


Fig 4. Shape changes between the means of “pure” African, “pure” European and hybrid clusters along the first axis of the between-group PCA.

(A) “Pure” Africans *versus* “pure” Europeans. (B) “Pure” Africans *versus* hybrids. (C) “Pure” Europeans *versus* hybrids. Shape changes are displayed as wireframe graphs symbolizing the pattern of forewing venation of *Apis mellifera*. Pink: “pure” African mean shape; yellow: “pure” European mean shape; black: hybrid mean shape.

Effects of hybridization on fluctuating asymmetry

Single measure intraclass correlation coefficients (2, 1) are reported to establish the reliability of univariate measures of size FA (CSFA) and shape FA (based on Procrustes or Mahalanobis distances), used to infer levels of developmental instability. Results obtained from the subsample with repeats – 36 individuals, four measurements per wing and a single examiner – indicate that repeatability is high for CSFA (0.99, 95% IC [0.987, 0.996]) and Procrustes FA scores (0.91, 95% IC [0.86, 0.95]), but low for Mahalanobis FA scores (0.02, 95% IC [-0.10, 0.19]). Consequently, Mahalanobis FA scores were excluded from the following analyzes. Linear regression analyses failed to find significant association between size and CSFA ($r = 0.07$, $P = 0.25$). On the other hand, significant effect of size on Procrustes FA scores indicates that the smaller wings tend to be more asymmetrical ($r = -0.12$, $P = 0.04$). Regression residuals were therefore used as size-corrected FA values for shape. To assess the ability of HI to predict the amount of FA, two models were constructed. The first is a linear model; the second is quadratic (polynomial of degree two), and both were compared in terms of goodness of fit. As a result, adding a quadratic term does not improve the model fits (i.e. higher values of AIC, AICc and BIC), and both are equivalent, so that the simplest (linear) has been privileged. The slope and coefficient of determination are found not significant for both CSFA (slope = -0.74, $r = -0.01$, $P = 0.84$) and size-corrected Procrustes FA scores (slope = $-1.36 \cdot 10^{-10}$, $r = 5.01 \cdot 10^{-10}$, $P = 1.00$), indicating no association between FA and HI (Fig 5).

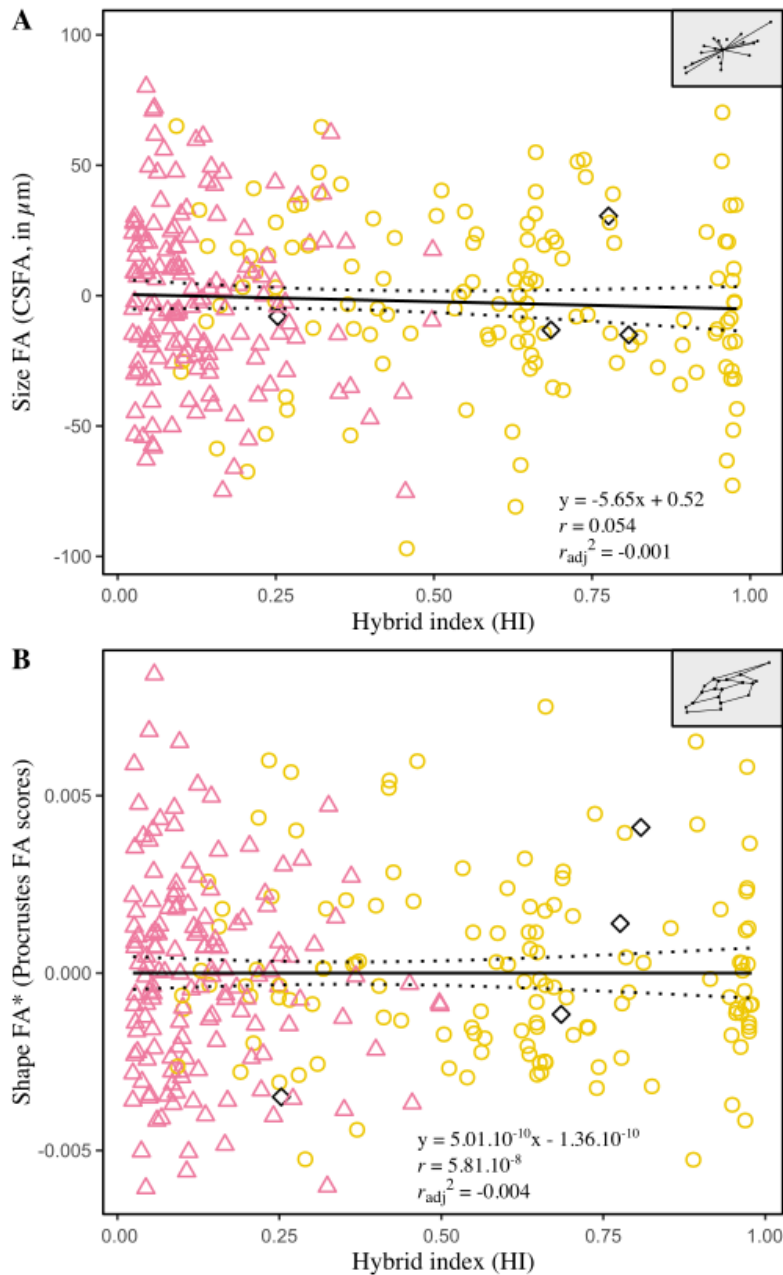


Fig 5. Relationships between fluctuating asymmetry of forewing size (A) and shape (B) and the hybrid index.

CSFA: difference between the centroid sizes of the right and the left forewing, in μm ; Procrustes FA scores: Procrustes distance between the shapes of the right and the left forewing. The asterisk (*) designates FA values corrected for size effect. Each point represents one individual. The symbol and outline color represents the maternal origin of individuals (Δ African lineage, \circ European C lineage, \diamond European M lineage) inferred from mitochondrial markers. Regressions lines with 95% confidence intervals (dotted lines) are shown.

Discussion

This study aims to investigate the influence of ongoing hybridization in Mauritius Island, as evidenced by genetics [27], between an initial population related to the subspecies *Apis mellifera unicolor* from Madagascar and imported European subspecies, at the phenotype level. For this purpose, individual variation and fluctuating asymmetry in forewing size and shape of honeybee workers were quantified *via* geometric morphometric methods. These traits were then confronted with neutral genetic variation to assess the effects of hybridization with exotic subspecies on phenotypic variability and developmental instability.

Effect of hybridization with European-related subspecies on wings size and shape

Results from multivariate analyses show that morphological variation coincides well with variation in microsatellite allele frequencies. The patterns of covariance for both wings size and shape, revealed by partial least-square analyses, are (essentially) one-dimensional and parallel the level of hybridization of the individuals (Fig 2). It results in an Afro-European continuum of admixture, which also emerges in PCAs as the dominant and only intelligible pattern of variation within shape and microsatellite datasets (except unstructured phenotypic plasticity) (S1 Fig). Overall, this highlights that demographic and stochastic processes, initiated by the recent successive imports of continental European subspecies in Mauritius, are still ongoing and prevail over possible selective processes. Oleska and Tofilski [10] previously reported such agreement between morphometrics and microsatellites, but in a context of admixture between two European subspecies, *A.m. carnica* and *A.m. mellifera*. Thus, these results reaffirm the usefulness of wing geometric morphometrics for hybrid detection and to infer patterns of introgression in honeybee populations. Yet, classification of workers as pure European, pure African and hybrids show that non-introgressed individuals

are still well distinct morphologically, as suggested by wings size comparisons (Fig 3A) and shape based assignment tests (Table 4; Figs 3B and 4); besides, the analyses failed to find transgressive phenotypes (i.e., exhibiting unique morphological components) in hybrid descendant. If wings size clearly reflects ancestries of the two genetic pools, i.e. smaller wings in African-related individuals and larger wings in individuals related to European commercial subspecies [58–62, 7, 24], it can only be suspected concerning wing shape, which could have been further affected by secondary evolutionary or stochastic processes [63]. Ultimately, in the absence of breeding programs and new imports – officially banned since 2011 on the island [64, 65] – the honeybee population of Mauritius should evolve towards complete admixture. Unlike the Africanized honeybee (*A.m. scutellata* × various European subspecies), which is partly characterized by a shift of European towards African traits leading notably to smaller wings and unique shapes [22], the Mauritian honeybees exhibit on average larger forewings as well as shape changes as a result of “Europeanization” of its population. A comparison with the surrounding islands and archipelagos of the SWIO where *A.m. unicolor* occurs, as well as with continental European sources, should shed light on the particular evolutionary trajectory followed by the population of Mauritius.

Effects of hybridization with European-related subspecies on developmental instability

Developmental instability, measured as fluctuating asymmetry of bilateral traits (i.e., left-right random variations), is closely related to both the inherent genomic architecture of individuals (heterozygosity, ploidy, intra- and intergenic interactions, genomic coadaptation) and various environmental stressors, which interact in complex – and still misunderstood – ways [66]. A common assumption states that hybridization, by instigating genetic incompatibilities or breaking coadapted gene complexes, can lead to increased developmental instability in organisms; conversely, genotypes may be less able to ensure stable development

under unsuitable habitats [67, 68]. In Mauritius, where individuals from separate lineages have been brought into contact and hybridize, higher levels of developmental instability were therefore expected in hybrid descendant and/or in non-native genotypes from continental European subspecies. Significant FA has been detected in the whole sample, and affects markedly more wing shape (8.51% of variation) than wing size (<1% of variation). Subtle directional asymmetry was also noticed (<1% of variation), but found significant only in shape (Table 3). These results corroborate previous studies reporting the contribution of asymmetry in wing variability in honeybees [69] and other insects [50, 70, 71]. If they suggest the overall presence of stress during the development of the studied specimens, the amounts of individual size FA and shape FA, on the other hand, do not significantly differ between genotypes (native or exotic) and hybridization levels (Fig 5). The only trend observed, and already reported by Łopuch and Tofilski [72], is that individuals with larger wings tend to present less shape asymmetry. To date, only two publications investigated the influence of hybridization between separate lineages on wing asymmetry in *A. mellifera*, and only one involved both European and African lineages. The first, conducted by Smith et al. [31] on two European subspecies of M and C lineages (*A.m. mellifera* and *A.m. carnica* respectively), observed no significant effect of hybridization on the level of asymmetry in workers. The second, conducted by Schneider et al. [24], crossbred the African subspecies *A.m. scutellata* with a European commercial strain (combination of several European subspecies) to mimic the first stages of the emergence of the Africanized honeybee, and found lower shape FA in African honeybees relative to European and hybrid workers. The similar amounts of FA observed in the African workers compared to European (mix of *A.m. ligustica*, *A.m. carnica* and *A.m. mellifera*) and hybrids in Mauritius could therefore result from a more sensitive developmental system inherited from *A.m. unicolor* [66], or may reflect population isolation [73]. One alternative is that other stressors interact and supplant the effects of hybridization

and unsuitable habitat. Indeed, Mauritius is highly subject to human pressures. Terrestrial ecosystems of the island have been largely transformed, sparing less than 2% of native habitats [74, 75], and the majority of land area is devoted to agriculture (53%), resulting in high degrees of human disturbances. Recent studies reported increased asymmetry in honeybees related to urbanization [76, 77], exposition to pesticides [78] and pollution rates [69]. Likewise, such anthropogenic stressors could impact the development of bees in Mauritius and deserve further research.

Conclusion

The Mauritian honeybee is experimenting intraspecific hybridization between *A.m. unicolor*-related specimens (subspecies endemic of Madagascar) and European-related subspecies, following the latter's imports since the 19th century. The strong agreements found between wings morphology, based on wings size and shape, and neutral genetic variation (14 microsatellite markers) show that the process is still going on, and reaffirm that wings morphometry can be used for hybrid detection in honeybees. Developmental instabilities, measured by individual FA and observed in both wing size and shape, affect individuals in comparable levels whatever their origin and level of hybridization. Consequently, wing asymmetry should influence equally fitness and performance (if linked to) of the workers at the population level, and might not contribute directly to trait displacements in the population, as it is suggested for the Africanized honeybee [24]. Measuring more traits, including behavioral ones, would be necessary and could help to clarify the evolutionary mechanisms driving the population. Human-mediated hybridization surely made a lasting change in the evolutionary trajectory of the Mauritian honeybee. In the shorter term, increased genetic and phenotypic variances could have improved its ability to cope with growing anthropogenic threats, as illustrated by the recent and accidental introduction of *Varroa destructor* in Mauritius [79], a mite implicated in elevated colony mortality rates worldwide as a virus

vector [80, 81]. Thus, results presented by Techer et al. [27] and here can benefit to the management of the honeybee in Mauritius in order to preserve its ecosystem and economic roles. More widely, it could provide better understanding on the impact of intraspecific hybridization and contact with new parasites on evolutionary trajectories of populations.

Acknowledgements

The authors are grateful to all beekeepers from Mauritius. The authors acknowledge the Plant Protection Platform (3P, IBISA) where all experiments of genetics were conducted, and would like to thank P. Frouin for providing access to the Leica DMC5400 microscope.

References

1. Woodruff D. Natural hybridization and hybrid zones. *Systematic Biology*. 1973;22(3):213-218. doi: 10.1111/2041-210x.12035
2. Mooney H, Cleland E. The evolutionary impact of invasive species. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2001;98(10):5446-5451. doi: 10.1073/pnas.091093398
3. Vallejo-Marín M, Hiscock S. Hybridization and hybrid speciation under global change. *New Phytologist*. 2016;211(4):1170-1187. doi: 10.1111/nph.14004
4. Clarke G. Patterns of developmental stability of *Chrysopa perla* L. (Neuroptera: Chrysopidae) in response to environmental pollution. *Environmental Entomology*. 1993;22(6):1362-1366. doi: 10.1093/ee/22.6.1362
5. Møller A. Developmental Stability and Fitness: A Review. *The American Naturalist*. 1997;149(5):916-932. doi: 10.1086/286030
6. De la Rúa P, Jaffé R, Dall'Olio R, Muñoz I, Serrano J. Biodiversity, conservation and current threats to European honeybees. *Apidologie*. 2009;40(3):263-284. doi: 10.1051/apido/2009027

7. Ruttner F. *Biogeography and Taxonomy of Honeybees*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1988.
8. Meixner M, Pinto M, Bouga M, Kryger P, Ivanova E, Fuchs S. Standard methods for characterising subspecies and ecotypes of *Apis mellifera*. *Journal of Apicultural Research*. 2013;52(4):1-28. doi: 10.3896/ibra.1.52.4.05
9. Kandemir İ, Özkan A, Fuchs S. Reevaluation of honeybee (*Apis mellifera*) microtaxonomy: a geometric morphometric approach. *Apidologie*. 2011;42(5):618-627. doi: 10.1007/s13592-011-0063-3
10. Oleksa A, Tofilski A. Wing geometric morphometrics and microsatellite analysis provide similar discrimination of honey bee subspecies. *Apidologie*. 2015;46(1):49-60. doi: 10.1007/s13592-013-0212-y
11. Nawrocka A, Kandemir İ, Fuchs S, Tofilski A. Computer software for identification of honey bee subspecies and evolutionary lineages. *Apidologie*. 2017. doi: 10.1007/s13592-017-0538-y
12. Kerr W, Bueno D. Natural crossing between *Apis mellifera adansonii* and *Apis mellifera ligustica*. *Evolution*. 1970;24(1):145-148. doi: 10.1111/j.1558-5646.1970.tb01747.x
13. Koeniger N, Koeniger G. Reproductive isolation among species of the genus *Apis*. *Apidologie*. 2000;31(2):313-339. doi: 10.1051/apido:2000125
14. Oleksa A, Wilde J, Tofilski A, Chybicki I. Partial reproductive isolation between European subspecies of honey bees. *Apidologie*. 2013;44(5):611-619. doi: 10.1007/s13592-013-0212-y
15. Soland-Reckeweg G. Genetic differentiation and hybridization in the honey bee (*Apis mellifera* L.) in Switzerland. Thesis, University of Bern. 2006

16. Hall HG. Parental analysis of introgressive hybridization between African and European honeybees using nuclear DNA RFLPs. *Genetics*. 1990;125(3):611–621.
17. Zayed A, Whitfield C. A genome-wide signature of positive selection in ancient and recent invasive expansions of the honey bee *Apis mellifera*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008;105(9):3421-3426. doi: 10.1073/pnas.0800107105
18. Mikheyev A, Tin M, Arora J, Seeley T. Museum samples reveal rapid evolution by wild honey bees exposed to a novel parasite. *Nature Communications*. 2015;6(1). doi: 10.1038/ncomms8991
19. Nelson R, Wallberg A, Simões Z, Lawson D, Webster M. Genomewide analysis of admixture and adaptation in the Africanized honeybee. *Molecular Ecology*. 2017;26(14):3603-3617. doi: 10.1111/mec.14122
20. Francoy T, Gonçalves L, De Jong D. Rapid morphological changes in populations of hybrids between Africanized and European honey bees. *Genetics and Molecular Research*. 2012;11(3):3349-3356. doi: 10.4238/2012.september.17.5
21. Francoy T, Wittmann D, Drauschke M, Müller S, Steinhage V, Bezerra-Laure M et al. Identification of Africanized honey bees through wing morphometrics: two fast and efficient procedures. *Apidologie*. 2008;39(5):488-494. doi: 10.1051/apido:2008028
22. Francoy T, Wittmann D, Steinhage V, Drauschke M, Muller S, Cunha D et al. Morphometric and genetic changes in a population of *Apis mellifera* after 34 years of Africanization. *Genetics and Molecular Research*. 2009;8(2):709-717. doi: 10.4238/vol8-2kerr019
23. Schneider S, DeGrandi-Hoffman G, Smith D. The African Honeybee: Factors Contributing to a Successful Biological Invasion. *Annual Review of Entomology*. 2004;49(1):351-376. doi: 10.1146/annurev.ento.49.061802.123359

24. Schneider S, Leamy L, Lewis L, DeGrandi-Hoffman G. The Influence of hybridization between African and European honeybees, *Apis mellifera*, on asymmetries in wing size and shape. *Evolution*. 2003;57(10):2350. Doi: 10.1554/02-609
25. Latreille P. Notice des espèces d'abeilles vivant en grande société, ou abeilles proprement dites, et description d'espèces nouvelles. *Ann Mus Hist Nat*. 1804;5:161-178.
26. Techer M, Clémencet J, Simiand C, Portlouis G, Reynaud B, Delatte H. Genetic diversity of the honeybee (*Apis mellifera*L.) populations in the Seychelles archipelago. *Insect Conservation and Diversity*. 2015;9(1):13-26. doi: 10.1111/icad.12138
27. Techer M, Clémencet J, Simiand C, Preaduth S, Azali H, Reynaud B et al. Large-scale mitochondrial DNA analysis of native honey bee *Apis mellifera* populations reveals a new African subgroup private to the South West Indian Ocean islands. *BMC Genetics*. 2017;18(1). doi: 10.1186/s12863-017-0520-
28. Miguel I, Baylac M, Iriondo M, Manzano C, Garnery L, Estonba A. Both geometric morphometric and microsatellite data consistently support the differentiation of the *Apis mellifera* M evolutionary branch. *Apidologie*. 2011;42(2):150-161. doi: 10.1051/apido/2010048
29. Cornuet J, Garnery L, Solignac M. Putative origin and function of the intergenic region between COI and COII of *Apis mellifera* L. mitochondrial DNA. *Genetics*;128(2):393-403.
30. Evans J, Schwarz R, Chen Y, Budge G, Cornman R, De la Rúa P et al. Standard methods for molecular research in *Apis mellifera*. *Journal of Apicultural Research*. 2013;52(4):1-54. doi: 10.3896/IBRA.1.52.4.11

31. Smith D, Crespi B, Bookstein F. Fluctuating asymmetry in the honey bee, *Apis mellifera*: effects of ploidy and hybridization. *Journal of Evolutionary Biology*. 1997;10(4):551-574. doi: 10.1046/j.1420-9101.1997.10040551.x
32. Schneider C, Rasband W, Eliceiri K. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*. 2012;9(7):671-675. doi: 10.1038/nmeth.2089
33. Thévenaz P. Point Picker an interactive ImageJ plugin that allows storage and retrieval of a collection of landmarks. Biomedical Imaging Group, Swiss Federal Institute of Technology Lausanne. 2012. <http://bigwww.epfl.ch/thevenaz/pointpicker/>
34. Rohlf F, Slice D. Extensions of the Procrustes Method for the Optimal Superimposition of Landmarks. *Systematic Zoology*. 1990;39(1):40. doi : 10.2307/2992207
35. Klingenberg C, Barluenga M, Meyer A. Shape analysis of symmetric structures: quantifying variation among individuals and asymmetry. *Evolution*. 2002;56(10):1909-1920. Doi : 10.1111/j.0014-3820.2002.tb00117.x
36. Palmer A, Strobeck C. Fluctuating Asymmetry: Measurement, Analysis, Patterns. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 1986;17(1):391-421.
37. Palmer A. Fluctuating asymmetry analyses: a primer. *Developmental Instability: Its Origins and Evolutionary Implications*. 1994;:335-364.
38. Klingenberg C, McIntyre G. Geometric morphometrics of developmental instability: analyzing patterns of fluctuating asymmetry with Procrustes methods. *Evolution*. 1998;52(5):1363.
39. Goodall C. Procrustes Methods in the Statistical Analysis of Shape. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)*. 1991;53(2):285-321. doi : 10.1111/j.2517-6161.1991.tb01825.x

40. Klingenberg C. MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Molecular Ecology Resources*. 2011;11(2):353-357. doi : 10.1111/j.1755-0998.2010.02924.x
41. Rohlf F, Corti M. Use of Two-Block Partial Least-Squares to study covariation in shape. *Systematic Biology*. 2000;49(4):740-753. doi: 10.1080/106351500750049806
42. Zelditch M, Swiderski D, Sheets H. *Geometric morphometrics for biologists: a primer*. 2nd ed. Amsterdam: Elsevier- Academic Press; 2012.
43. Escoufier Y. Le Traitement des variables vectorielles. *Biometrics*. 1973;29(4):751. doi: 10.2307/2529140
44. Klingenberg C, Marugán-Lobón J. Evolutionary covariation in geometric morphometric data: analyzing integration, modularity, and allometry in a phylogenetic context. *Systematic Biology*. 2013;62(4):591-610. doi: 10.1093/sysbio/syt025
45. Vähä J, Primmer C. Efficiency of model-based Bayesian methods for detecting hybrid individuals under different hybridization scenarios and with different numbers of loci. *Molecular Ecology*. 2006;15(1):63-72. doi: 10.1111/j.1365-294x.2005.02773.x
46. Chavez A, Saltzberg C, Kenagy G. Genetic and phenotypic variation across a hybrid zone between ecologically divergent tree squirrels (*Tamiasciurus*). *Molecular Ecology*. 2011;20(16):3350-3366. doi: 10.1111/j.1365-294x.2011.05184.x
47. Mitteroecker P, Bookstein F. Linear Discrimination, Ordination, and the Visualization of Selection Gradients in Modern Morphometrics. *Evolutionary Biology*. 2011;38(1):100-114. doi: 10.1007/s11692-011-9109-8
48. Team RC. *A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria; 2016.

49. Collyer M, Adams D. Phenotypic trajectory analysis: comparison of shape change patterns in evolution and ecology. *Hystrix*. 2013;40(1). doi: 10.4404/hystrix-24.1-6298
50. Adams D, Otárola-Castillo E. Geomorph: an R package for the collection and analysis of geometric morphometric shape data. *Methods in Ecology and Evolution*. 2013;4(4):393-399. doi: 10.1111/2041-210x.12035
51. Klingenberg C, Monteiro L. Distances and directions in multidimensional shape spaces: implications for morphometric applications. *Systematic Biology*. 2005;54(4):678-688. doi: 10.1080/10635150590947258
52. Shrout P, Fleiss J. Intraclass correlations: Uses in assessing rater reliability. *Psychological Bulletin*. 1979;86(2):420-428. doi : 10.1037//0033-2909.86.2.420
53. Koo T, Li M. A Guideline of Selecting and Reporting Intraclass Correlation Coefficients for Reliability Research. *Journal of Chiropractic Medicine*. 2016;15(2):155-163. doi: 10.1016/j.jcm.2016.02.012
54. Altman D, Royston P. The cost of dichotomising continuous variables. *BMJ*. 2006;332(7549):1080.1. doi : 10.1136/bmj.332.7549.1080
55. Lazic S. Why we should use simpler models if the data allow this: relevance for ANOVA designs in experimental biology. *BMC Physiology*. 2008;8(1):16. doi: 10.1186/1472-6793-8-16
56. Asymmetric size and shape variation in the Central European transect across the house mouse hybrid zone. *Biological Journal of the Linnean Society*. 2010;101(1):13-27. 10.1111/j.1095-8312.2010.01490.x
57. Klingenberg C. Visualizations in geometric morphometrics: how to read and how to make graphs showing shape changes. *Hystrix, the Italian Journal of Mammalogy*. 2013;24(1):15–24. doi : 10.4404/hystrix-24.1-7691

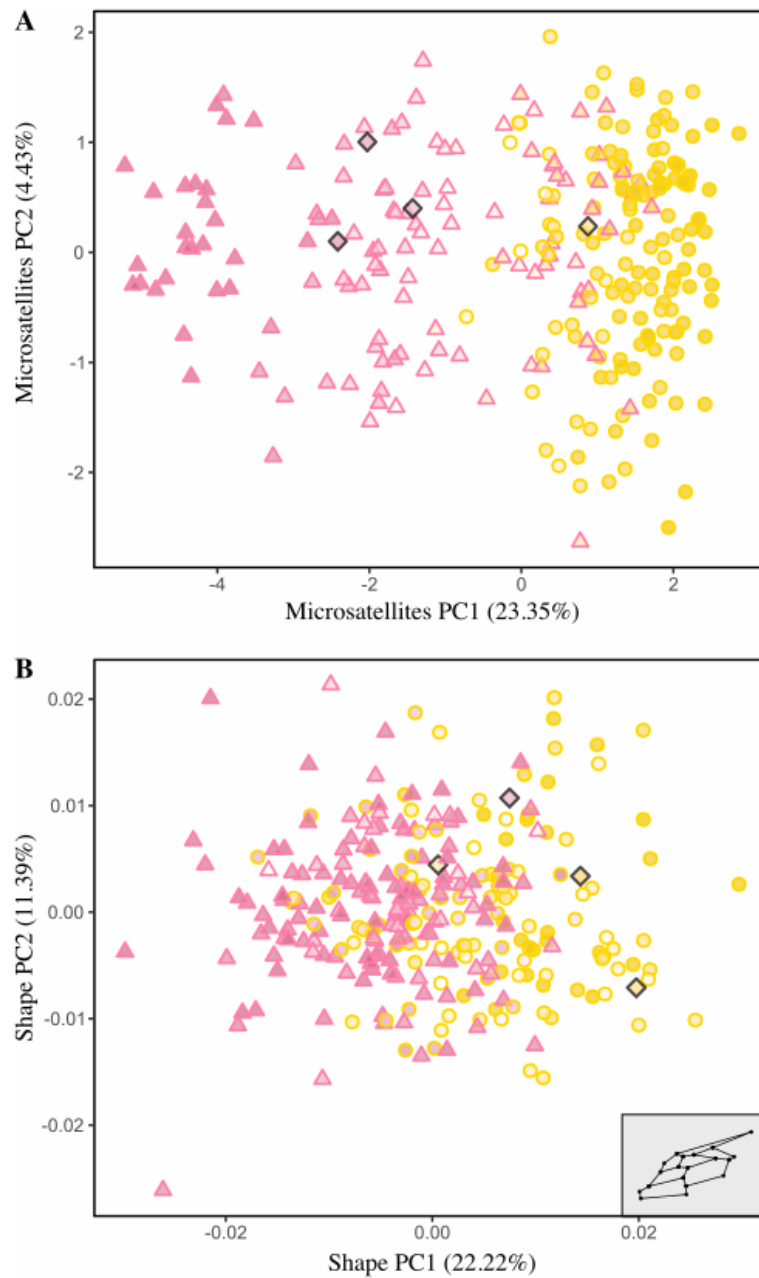
58. Rinderer T, Sylvester H, Brown M, Villa J, Pesante D, Collins A et al. Field and simplified techniques for identifying Africanized and European honey bees. *Apidologie*. 1986;17(1):33-48. doi: 10.1051/apido:19860104
59. Buco S, Rinderer T, Sylvester H, Collins A, Lancaster V, Crewe R et al. Morphometric differences between South American africanized and South African (*Apis mellifera scutellata*) honey bees. *Apidologie*. 1987;18(3):217-222. doi: 10.1051/apido:19870301
60. Rinderer T, Sylvester H, Buco S, Lancaster V, Herbert E, Collins A et al. Improved simple techniques for identifying Africanized and European honey bees. *Apidologie*. 1987;18(2):179-196. doi: 10.1051/apido:19870208
61. Lobo J. Morphometric isozymic and mitochondrial variability of Africanized honeybees in Costa Rica. *Heredity*. 1995;75(2):133-141. doi: 10.1038/hdy.1995.116
62. Quezada-Euán J, Medina L. Hybridization between European and Africanized honeybees (*Apis mellifera* L.) in tropical Yucatan, Mexico. I. Morphometric changes in feral and managed colonies. *Apidologie*. 1998;29(6):555-568. doi: 10.1051/apido:19980608
63. Nolte A, Sheets H. Shape based assignment tests suggest transgressive phenotypes in natural sculpin hybrids (Teleostei, Scorpaeniformes, Cottidae). *Frontiers in Zoology*. 2005;2(1):11. doi: 10.1186/1742-9994-2-11
64. Belmin R. Intérêt et faisabilité d'une Indication Géographique pour le miel de Rodrigues. Thesis, Université Henri Poincaré, Institut National Polytechnique de Lorraine. 2010;. <https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01883408>
65. Jhumun G. Report on Honeybees from Mauritius for OIE conference (Regional Training Seminar on Diseases of Honey Bees for OIE National Focal Points for Animal Disease Notification). In: Ministry of Agro Industry & Food Security M,

- editor. OIE Ezulwini; Swaziland. Mauritius: Ministry of Agro Industry & Food Security; 2011. p. 7.
66. Klingenberg C. Phenotypic plasticity, developmental instability, and robustness: the concepts and how they are connected. *Frontiers in Ecology and Evolution*. 2019;7. doi: 10.3389/fevo.2019.00056
67. Graham J, Raz S, Hel-Or H, Nevo E. Fluctuating Asymmetry: Methods, Theory, and Applications. *Symmetry*. 2010;2(2):466-540. Doi/ 10.3390/sym2020466
68. Maestri R, Fornel R, Galiano D, de Freitas T. Niche Suitability Affects Development: Skull Asymmetry Increases in Less Suitable Areas. *PLOS ONE*. 2015;10(4):e0122412. doi: 10.1371/journal.pone.0122412
69. Nunes L, de Araújo E, Marchini L. Fluctuating asymmetry in *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) as bioindicator of anthropogenic environments. *Rev Biol Trop*. 2015;63(3):673-682.
70. Pélabon C, Hansen T. On the adaptive accuracy of directional asymmetry in insect wing size. *Evolution*. 2008;62(11):2855-2867. doi: 10.1111/j.1558-5646.2008.00495.x
71. Ludoški J, Djurakic M, Ståhls G, Milankov V. Patterns of asymmetry in wing traits of three island and one continental population of *Merodon albifrons* (Diptera, Syrphidae) from Greece. *Evolutionary Ecology Research*. 2012;14(7):933-950. doi: 10.1017/S0007485313000461
72. Łopuch S, Tofilski A. The relationship between asymmetry, size and unusual venation in honey bees (*Apis mellifera*). *Bulletin of Entomological Research*. 2016;106(3):304-313. doi: 10.1017/S0007485315000784
73. Băncilă R, Van Gelder I, Rotteveel E, Loman J, Arntzen J. Fluctuating asymmetry is a function of population isolation in island lizards. *Journal of Zoology*. 2010;282(4):266-275. doi: 10.1111/j.1469-7998.2010.00736.x

74. Florens F, Baider C, Martin G, Strasberg D. Surviving 370 years of human impact: what remains of tree diversity and structure of the lowland wet forests of oceanic island Mauritius?. *Biodiversity and Conservation*. 2012;21(8):2139-2167. doi: 10.1007/s10531-012-0304-4
75. Florens F. The biodiversity of Mauritius and impact resulting from anthropogenic activities including introduction of alien pest species such as the long-tailed macaque, *Macaca fascicularis*. *Translational Science and Drug Discovery 9th International Conference of Society of Free Radical Research-Africa and 4th International Conference of International Association of Medical and Biomedical Researchers*. 2015:42.
76. Banaszak-Cibicka W, Fliszkiewicz M, Langowska A, Żmihorski M. Body size and wing asymmetry in bees along an urbanization gradient. *Apidologie*. 2017;49(3):297-306. doi: 10.1007/s13592-017-0554-y
77. Leonard R, Wat K, McArthur C, Hochuli D. Urbanisation and wing asymmetry in the western honey bee (*Apis mellifera*, Linnaeus 1758) at multiple scales. *PeerJ*. 2018;6:e5940. doi: 10.7717/peerj.5940
78. Ondo Zue Abaga N, Alibert P, Dousset S, Savadogo P, Savadogo M, Sedogo M. Insecticide residues in cotton soils of Burkina Faso and effects of insecticides on fluctuating asymmetry in honey bees (*Apis mellifera* Linnaeus). *Chemosphere*. 2011;83(4):585-592. Doi : 10.1016/j.chemosphere.2010.12.021
79. Esnault O, Meenowa D, Sookar P, Chauzat M, Delatte H. Spread and strain determination of *Varroa destructor* following its introduction to Mauritius and interactions with the bee louse *Braula pretoriensis* in honey bee colonies. *Journal of Apicultural Research*. 2018;58(1):75-83. doi: 10.1080/00218839.2018.1517987

80. Le Conte Y, Ellis M, Ritter W. Varroa mites and honey bee health: can Varroa explain part of the colony losses?. *Apidologie*. 2010;41(3):353-363. Doi: 10.1051/apido/2010017
81. Nazzi F, Brown S, Annoscia D, Del Piccolo F, Di Prisco G, Varricchio P et al. Synergistic Parasite-Pathogen Interactions Mediated by Host Immunity Can Drive the Collapse of Honeybee Colonies. *PLoS Pathogens*. 2012;8(6):e1002735. doi: 10.1371/journal.ppat.1002735

Supporting Information



S1 Fig. Patterns of variation within neutral genetic variation (A) and forewing shape (B) from principal component analyses (PCAs).

Genetic and shape structures are inferred from microsatellite allele frequencies and Procrustes coordinates, respectively. Variables were centered but not scaled. Points represent individuals genotype (A) or forewing shape (B). The symbol and outline color represents the maternal origin of individuals (\triangle African lineage, \circ European C lineage, \diamond European M lineage). The fill color symbolizes the hybrid index (HI), i.e. the hybridization gradient from African genotypes (pink) to European (yellow) genotypes, which is highly similar to the main genetic and shape (PC1) axes.

III. Chapitre 2 : Analyse fine de la congruence entre divergences morphométriques et génétiques des populations d'*Apis mellifera* dans les milieux insulaires de la zone du SOOI

Résumé

L'abeille mellifère, *Apis mellifera*, est présente à Madagascar et sur la plupart des îles des archipels alentours (Comores, Seychelles, Mascareignes). Les études génétiques ont mis en évidence (1) que toutes ces populations étaient apparentées à *A. m. unicolor*, sous-espèce endémique de Madagascar, (2) que des lignées Européennes subsistent en proportions variables dans les Mascareignes suites aux importations passées et récentes, et que (3) les populations sont fortement structurées génétiquement, conséquence de leur isolement géographique, d'hybridations avec des sous-espèces Européennes, et/ou d'adaptations locales. Les divergences phénotypiques entre ces populations ont été analysées sur la base du patron de nervation alaire (nervure des ailes antérieure droite), en utilisant la morphométrie géométrique pour caractériser environ 1400 ouvrières provenant de Madagascar, des Seychelles (Mahé, Praslin, La Digue), des Comores (Grande Comore, Mohéli, Anjouan), des Mascareignes (La Réunion, Maurice, Rodrigues), ainsi que d'Afrique continentale et d'Europe (groupes externes). Ces divergences ont ensuite été confrontées aux distances génétiques neutres (indice de Nei et phylogénie) obtenues sur la base de 14 marqueurs microsatellites. Les résultats montrent non seulement que ces populations sont autant structurées morphologiquement que génétiquement, mais aussi que la variabilité de la conformation des ailes reflète l'histoire évolutive et le fond génétique de ces populations. Ces résultats soulignent l'influence de la dérive, des effets fondateurs et de l'hybridation induite par l'Homme sur les trajectoires évolutives suivies par les populations d'abeilles du Sud-Ouest de l'Océan Indien.

Mots clés : *Apis mellifera unicolor*, morphométrie géométrique, ailes, nervures, signal phylogénétique

1. Introduction

Les archipels et les îles du Sud-Ouest de l'Océan Indien (SOOI) forment une zone géographique présentant des taux d'endémisme élevés et où la biodiversité est fortement menacée. Ils sont donc considérés comme un hotspot de la biodiversité mondiale et constituent un enjeu majeur en biologie de la conservation (Myers *et al.*, 2000). L'abeille domestique, *Apis mellifera*, est un pollinisateur généraliste qui interagit avec de nombreuses espèces endémiques végétales présentes (Kaiser-Bunbury *et al.*, 2010, Rasoloarijao *et al.*, 2017), mais aussi animales (Clémencet *et al.*, 2013), et est donc susceptible de jouer un rôle important dans le fonctionnement et l'évolution de ces écosystèmes insulaires. Leur isolement géographique, la diversité des conditions climatiques et écologiques, ou encore les flores endémiques à chaque île sont autant de facteurs susceptibles d'influer sur l'évolution et la différenciation des populations d'abeilles pollinisatrices présentes. En effet, au sein de l'espèce *Apis mellifera*, 29 sous-espèces ont été différenciées sur la bases de critères morphométriques majoritairement, mais aussi comportementaux, génétiques ou écologiques (Ruttner, 1988 ; Engel, 1999 ; Sheppard and Meixner, 2003 ; Ilyasov *et al.*, 2011 ; Meixner *et al.*, 2011). Parmi ces 29 sous-espèces, *A. m. unicolor* a été décrite comme endémique à Madagascar et probablement indigène des îles du Sud-Ouest de l'Océan Indien. Des sous-espèces européennes ont également été importées dans ces îles par le passé. Ainsi, selon les îles des taux de métissage variables entre *A. m. unicolor* et des sous-espèces européennes ont détectés par l'étude combinée de marqueurs génétiques mitochondriaux et nucléaires (Techer *et al.*, 2017a, 2017b). Ces gradients de métissage sont extrêmement variables, allant de non détectables à Madagascar (100% unicolor), intermédiaire à La Réunion, variable à Maurice, jusqu'à très élevés à Rodrigues, où le fond génétique dominant est *A. m. ligustica* (Techer *et al.*, 2015 ; Techer *et al.* 2017b ; Wragg *et al.*, 2018). Des travaux récents ont ainsi permis de déterminer l'origine évolutive des populations et leur structuration génétique pour l'ensemble des îles du SOOI (Techer *et al.* 2017b, Wragg *et al.*, 2018). Une première étude visant à comprendre l'influence de l'hybridation entre abeilles africaines (*A. m. unicolor*) et européennes sur des caractères phénotypiques à l'île Maurice a pu montrer une forte concordance entre la variabilité morphologique et variabilité génétique neutre, en particulier pour la forme des ailes, en utilisant des analyses morphométriques (Chapitre 1). Ainsi, cette hybridation en cours aurait contribué à accroître la diversité génétique et phénotypique de l'espèce et influencerait son potentiel d'adaptation.

La présente étude s'inscrit dans l'objectif de comprendre les processus micro-évolutifs à l'origine des potentielles divergences entre populations insulaires d'*A. mellifera* de la zone du SOOI. Afin de pouvoir répondre à cet objectif nous avons étendu l'étude réalisée à Maurice à l'ensemble des îles de la zone, caractérisant ainsi la variabilité et la distribution d'un trait morphologique neutre (la conformation des ailes) dans le but de mieux comprendre les processus évolutifs mis en jeu dans la différenciation des populations d'abeilles du SOOI.

2. Matériel et méthodes

2.1. Echantillonnages

Dans le but de confronter les patrons de divergences génétiques aux divergences morphologiques, les abeilles ouvrières caractérisées dans cette étude sont les mêmes que celles génotypées par Techer (2015) et Rasolofoarivao (2014) lors de leurs travaux de thèse. Les ailes ont été conservées intactes car elles n'ont pas fait partie du matériel biologique utilisé pour l'extraction d'ADN en vue des analyses moléculaires. Par ailleurs, la diversité morphologique au sein des populations insulaires est estimée sur la base d'une ouvrière par colonie. Plusieurs dizaines de colonies réparties sur les îles participent au jeu de données, afin de recouvrir la diversité des facteurs – génétiques, environnementaux, développementaux – pouvant affecter les caractéristiques morphologiques des ouvrières (Abou-Sharaa et al. 2013). L'échantillonnage inclus des individus provenant de Rodrigues ($n = 149$), Maurice ($n = 323$) et La Réunion ($n = 186$) pour l'archipel des Mascareignes ; de Mahé ($n = 70$), Praslin ($n = 71$) et La Digue ($n = 41$) pour l'archipel des Seychelles ($n_{\text{tot}} = 182$), d'Anjouan ($n = 42$), Grande Comore ($n = 27$) et Mohéli ($n = 12$) pour l'archipel des Comores ($n_{\text{tot}} = 81$). Des individus provenant de Madagascar ($n = 257$), zone d'endémicité d'*Apis mellifera unicolor* viennent également compléter les échantillons.

Des groupes externes continentaux ont également été inclus dans les analyses, afin (1) de mieux apprécier les distances morphologiques qui séparent les îles et archipels, (2) de situer dans l'espace morphologique les îles par rapport à des populations génétiquement apparentées. Un groupe externe d'Afrique continentale est ainsi implémenté, contenant des spécimens provenant de plusieurs pays d'Afrique et appartenant aux sous-espèces *A. m. adansonii*, *A. m. scutellata*, *A. m. monticola* et *A. m. capensis* ($n_{\text{tot}} = 103$). Un groupe externe Européen a également été constitué à partir de différentes populations (Allemagne, France, Grèce et Italie) issues de sous-espèces qui ont été importées (ou sont susceptibles d'avoir été

importées) dans les Mascareignes. On retrouve ainsi les sous-espèces *A. m. carnica* et *A. m. ligustica*, de lignée évolutive C, et *A. m. mellifera* et *A. m. iberiensis*, de lignée M. La provenance géographique et génétique des échantillons, les collaborateurs ayant permis de les obtenir ainsi que les dates et les sites de collectes sont disponibles en (Table SIII.1 en Annexe).

2.2. Acquisition des données morphométriques

Préparation des ailes d'abeilles

La préparation des ailes est une étape importante car elle peut avoir des conséquences sur la qualité des mesures. Celles qui sont abimées ou déchirées sont donc écartées. L'aile antérieure droite de chaque abeille (préalablement stockée à et conservée dans l'alcool à 95%) est coupée à sa base puis plongée dans une baignoire d'eau distillée contenant une goutte de liquide vaisselle. Le liquide vaisselle fait office d'agent mouillant et permet d'éliminer l'alcool. Les ailes sont ensuite montées entre lames et lamelles en s'assurant qu'elles soient bien planes, sans résidus, et que le montage ne présente pas de bulles d'air qui gêneraient les mesures.

Numérisation des ailes

Cette étape consiste à acquérir les images numériques des ailes d'ouvrières. Elles sont obtenues grâce à une caméra vidéo Nikon (DS-Fi1) montée sur loupe binoculaire (grossissement X70) et reliée à un ordinateur et au système de numérisation NIS-Elements (version 2.30). Les images obtenues sont ensuite importées dans le logiciel open source ImageJ pour y être traitées et analysées.

Digitalisation des ailes : acquisition des coordonnées des point-repères

La géométrie des ailes est décrite par 19 point-repères situés aux intersections des nervures principales des ailes (Bookstein, 1991). Les point-repères sont placés à l'aide du plugin PointPicker du logiciel ImageJ version 1.49u (Schneider *et al.*, 2012). Une seule personne réalise les mesures afin qu'il n'y ait pas d'effet opérateur. Les coordonnées cartésiennes (x, y) des point-repères sont ensuite extraites et constituent les données brutes permettant de caractériser quantitativement le patron de nervation alaire des ouvrières.

2.3. Analyses morphométriques

Extraction de la conformation des ailes : méthode Procrustes

La forme d'un objet ou d'une structure (son aspect physique) est composée de deux éléments : sa taille d'une part, et sa conformation d'autre part, définie selon Kendall (1977) comme l'information géométrique restante après que les informations de localisation, d'échelle et de rotation aient été extraites. Ici, la forme de l'aile est contenue dans l'ensemble des coordonnées cartésiennes des point-repères, dont la position, l'orientation et la dispersion varie d'une image à l'autre (placement de l'aile sous la loupe, grossissement, etc.).

Afin d'analyser la conformation des ailes indépendamment de toute autre source de variabilité, on utilise la morphométrie géométrique, appelée « analyse procrustéenne généralisée » ou superposition Procrustes (Rohlf et Slice, 1990 ; Bookstein, 1991) qui s'effectue en trois étapes : (i) les coordonnées brutes des point-repères sont translattées et alignées sur leur centre de gravité, autrement appelé centroïde, ce qui supprime les effets de position, (ii) puis mises à l'échelle par leur taille-centroïde (Bookstein, 1991) – une mesure globale de la taille – de sorte qu'elle soit égale à 1, et enfin (iii) itérativement « pivotées » pour que la somme des carrés des distances entre les point-repères et la position moyenne de l'échantillon soit minimale. Les coordonnées résultantes sont appelées coordonnées Procrustes, et la distance entre deux configurations est appelée distances Procrustes (sans dimensions) et mesure la (dis-)similarité entre deux conformations.

L'espace morphométrique où se placent les configurations est un espace à $2n-4$ dimensions, où n est le nombre de point-repères utilisés. Les quatre dimensions soustraites correspondent à 2 dimensions de position (x et y), une dimension de rotation et une dimension d'échelle, qui sont « éliminées » lors de la superposition Procrustes. Dans notre cas, l'espace morphométrique est donc de $2*19 - 4 = 34$ dimensions. Par ailleurs, cet espace est courbe (Dryden et Mardia, 1998), or les outils statistiques impliquent de travailler dans un espace plan et Euclidien. Pour palier ce problème, les conformations sont projetées orthogonalement sur un espace Euclidien tangent au point correspondant à la conformation moyenne de l'échantillon (Dryden et Mardia, 1998 ; Rohlf, 1999 ; Slice, 2001). Les déformations qu'entraîne cette projection sur les distances sont analogues à celles qui apparaissent lors de la projection du globe terrestre sur un planisphère. Toutefois, concernant les structures biologiques, la variation est suffisamment faible et concentré pour que les distorsions engendrées puissent être considérées comme totalement négligeables (Marcus *et al.*, 2000).

Ceci est d'autant plus vrai ici car on se situe à l'échelle intraspécifique, et parce que ce trait, le patron de nervation alaire, varie très subtilement (variations indétectables à l'œil nu), y compris entre des lignées et des sous-espèces génétiquement, géographiquement et écologiquement éloignées.

Analyses statistiques

Les différences de taille centroïde entre les populations ont été analysées à l'aide d'une analyse de variance classique (ANOVA). Les différences de conformation des ailes ont été analysées séparément, sur la base des distances Procrustes (Procrustes ANOVA) via une extension multivariée du test F de Goodall (*Goodall's F test*) d'un part, et sur la base des coordonnées Procrustes (MANOVA), via le test de la trace de Pillai (*Pillai's trace*), d'autre part.

Les différences de conformation des ailes entre chaque groupe ont ensuite été testées à l'aide d'une analyse discriminante appelée *Canonical Variate Analysis* (CVA), une analyse multivariée qui optimise la variance inter-groupes tout en minimisant la variance intra-groupes. Les fonctions discriminantes (les axes de la CVA) forment des combinaisons linéaires des variables implémentées. A partir de ces fonctions discriminantes, il est possible de calculer des probabilités d'appartenance à un groupe, ce qui peut être interprété pour estimer le degré de séparation ou de superposition entre différentes populations.

La significativité des distances entre les groupes est éprouvée par une procédure de permutation réitérée 10000 fois par paire de groupe, appliquée séparément sur les distances Procrustes et de Mahalanobis. Le calcul des distances de Mahalanobis repose sur l'hypothèse que les matrices de variance-covariance des différents groupes sont homogènes. Or, étant donné que les échantillons sont déséquilibrés et que cette hypothèse pourrait ne pas être systématiquement vérifiée, des analyses factorielles discriminantes (*Discriminant Function Analysis*, DFA) visant à analyser séparément chaque paire de groupe sont également conduites. Une procédure de validation croisée, qui consiste à retirer à chaque fois un individu du jeu de données (type Jackknife), permet de tester la fiabilité des ré-assignements. En principe, si deux populations sont morphologiquement distinctes, on s'attend à ce que les individus soient parfaitement réassignés à leur population définie *a priori*. Les moyennes entre les groupes sont comparées et testées pour chaque DFA via le T^2 de Hotelling, un équivalent multivarié du test T de Student. Un test non-paramétrique est également conduit sur les distances Procrustes et la statistique T^2 (équivalent à un test utilisant les distances de

Mahalanobis) en effectuant 1000 permutations. Pour les comparaisons multiples, le seuil de significativité des p-values (fixé à 0.05) est corrigé par le nombre de comparaisons.

Toutes ces analyses sont conduites dans MorphoJ (Klingenberg, 2011), un logiciel libre et dédié aux analyses de morphométrie géométrique (http://morphometrics.uk/MorphoJ_page.html).

Organisation des analyses et comparaison avec la génétique

Les analyses discriminantes mentionnées dans le paragraphe précédent (CVA et DFA) sont conduites sur trois échelles : au sein de chacun des archipels (Comores : Grande Comore, Mohéli, Anjouan ; Seychelles : Mahé, Praslin, La Digue ; Mascareignes : La Réunion, Maurice, Rodrigues), sur l'ensemble de la zone du Sud-Ouest de l'Océan Indien (Comores, Seychelles, Mascareignes et Madagascar), puis en incluant tous les groupes externes. Bien que certaines populations continentales contiennent peu d'individus relativement au nombre de variables (38), ce qui peut conduire à des problèmes de sur-ajustement, leur positionnement dans l'espace permet d'estimer les similarités morphologiques entre les groupes. Les distances de Mahalanobis et les distances Procrustes sont ainsi extraites, et comparées aux distances génétiques, calculées sur la base de 14 marqueurs microsatellites (provenant de Techer, 2015) via l'indice de similarité de Nei (Nei, 1978 ; Takezaki and Nei, 1996), un indice adapté aux marqueurs microsatellites. Les différentes mesures de distances sont utilisées pour construire des arbres non-racinés selon la méthode des plus proches voisins, dont les topologies reflètent la disposition des populations insulaires et continentales les unes par rapport aux autres. Les topologies obtenues sur la base des distances morphométriques et génétiques peuvent ainsi être comparées, entre elles et avec la littérature. Pour cela, un test de Mantel est conduit sur les matrices de distances génétiques et morphologiques pour estimer la corrélation entre la disparité génétique neutre et morphologique.

Signal phylogénétique

D'après Klingenberg et Gidaszewski (2010), une autre façon d'analyser le lien entre apparemment génétique et distances morphologiques consiste à mapper les données morphologiques sur l'arbre phylogénétique, ce qui peut être visualisé directement sous forme de projection de l'arbre phylogénétique dans l'espace morphométrique. En présence d'un fort signal phylogénétique dans les données, les espèces étroitement apparentées ont tendance à être proches les unes des autres dans l'espace morphométrique et, par conséquent, la quantité moyenne de changement de conformation le long des branches de l'arbre est relativement

petite. Étant donné que la force du signal phylogénétique est une propriété de la phylogénie entière et que les données morphométriques sont associées, il est nécessaire de résumer l'ampleur des changements de conformation sur tout l'arbre. Un résumé simple est la somme des changements au carré le long de toutes les branches (pour la méthode, voir : [Maddison, 1991](#)). Si le signal phylogénétique est fort, les espèces apparentées seront proches les unes des autres et la somme des modifications au carré devrait donc être relativement faible. En revanche, en l'absence de signal phylogénétique, les espèces apparentées ne seront pas toujours proches les unes des autres, ce qui entraînera de plus grands changements le long des branches de la phylogénie et donc la somme de tous les changements au carré devrait être plus élevée. Pour évaluer statistiquement l'ampleur de ces changements morphométriques, l'hypothèse nulle d'absence totale de signal phylogénétique est testée par une procédure de permutation. Si la phylogénie n'a aucun effet, alors échanger de manière aléatoire les valeurs morphométriques entre les sommets de l'arbre phylogénétique ne devrait pas affecter le total attendu de changement morphométrique le long des branches de l'arbre. En revanche, si le signal phylogénétique est fort, l'échange des valeurs morphométriques entre les extrémités de l'arbre entraînera très probablement un arbre plus long que celui obtenu à l'origine. On simule donc l'hypothèse nulle d'absence de signal phylogénétique en échangeant de manière répétée et aléatoire (10^4 itérations) les valeurs morphométriques entre les taxons terminaux de la phylogénie, en mappant les données morphométriques permutées sur la phylogénie et en calculant la longueur totale de l'arbre en unités de distance morphométrique ([Klingenberg et Gidaszewski, 2010](#)). La présence d'un signal phylogénétique a été testé ici sur les distances Procrustes obtenues par une analyse en composantes principales (ACP), et sur les distances de Mahalanobis issues de l'analyse discriminante (CVA) effectuée précédemment sur l'ensemble des populations échantillonnées (groupes externes inclus). L'arbre phylogénétique (basé sur les distances de Nei) a ensuite été superposé aux graphiques représentant les deux axes principaux de l'ACP et de la CVA.

Les changements de conformations associés aux axes principaux de l'ACP et de la CVA sont représentés sous forme de graphiques qui symbolisent les nervures des ailes en connectant les point-repères par des lignes droites ([Klingenberg, 2013](#)). La superposition de la conformation moyenne de l'échantillon avec une conformation « cible » permet de visualiser le déplacement des point-repères associés aux différentes directions (axes) de l'espace.

3. Résultats

3.1. Archipel des Mascareignes

L'archipel des Mascareignes réunit Maurice ($n = 323$), La Réunion ($n = 186$) et Rodrigues ($n = 149$). L'ANOVA conduite sur les tailles centroïdes des ailes est hautement significative ($F = 152.82$; $P < 0.001$). De même, l'ANOVA Procrustes ($F = 26.70$; $P < 0.0001$) et la MANOVA ($Pillai\ tr. = 1.04$; $P < 0.0001$) mettent toutes deux en évidence des différences hautement significatives entre les conformations moyennes au sein de cet archipel.

La projection des individus le long des axes de l'analyse discriminante (CV1 : 69.58% ; CV2 : 30.42%) permet de distinguer et de séparer les trois îles, malgré un certain degré de superposition (Figure III.1). Les distances de Mahalanobis et les distances Procrustes entre les îles, obtenues par CVA ou DFA, sont toutes données hautement significatives quelque soit le test employé (Tables III.1 et III.2). Les résultats des classifications renvoient par ailleurs des pourcentages de réassignement correct supérieurs à 85% pour chaque paire de population (Table III.3).

3.2. Archipel des Seychelles

Les échantillons des Seychelles proviennent des îles de Mahé ($n = 70$), Praslin ($n = 71$) et La Digue ($n = 41$). Les analyses de variance conduites sur les tailles centroïdes ($F = 38.04$, $P < 0.0001$) et les conformations des ailes (ANOVA Procrustes : $F = 6.60$, $P < 0.0001$; MANOVA : $Pillai\ tr. = 1.00$; $P < 0.0001$) indiquent des différences significatives entre ces trois îles.

La figure III.2 qui correspond à la CVA montre que la population de Mahé est relativement bien distincte de celles de Praslin et La Digue (CV1 : 83.37%, CV2 : 16.64%). Les T^2 de Hotelling, et les test non-paramétriques conduits sur les distances Procrustes et les distances de Mahalanobis délivrent des p-values hautement significatives pour les paires d'îles impliquant Mahé ; en revanche, après correction (seuil de significativité : $0.05/3 = 0.0167$), les p-values sont non-significatives ou proche du seuil de significativité concernant La Digue et Praslin ($T^2 = 87.71$, $P = 0.016$; Procrustes : $P = 0.017$; Mahalanobis : 0.022) (Table III.4 et III.5), indiquant une faible distinction morphologique entre ces deux îles. Ceci est corroboré par les résultats des classifications (Table III.6), puisque les pourcentages d'assignements

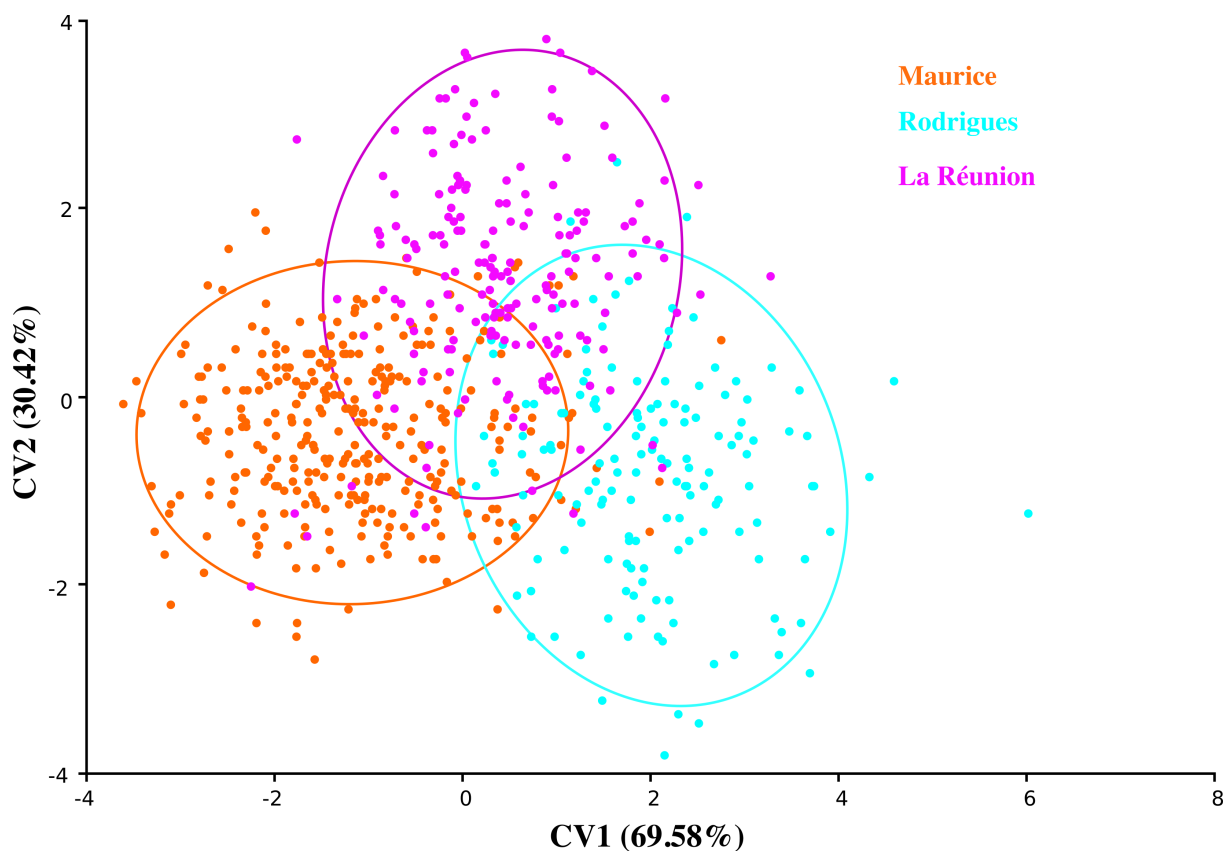


Figure III.1. Résultat de l'analyse discriminante (« Canonical variate analysis », CVA) menée sur les îles de l'archipel des Mascareignes (La Réunion, Maurice, Rodrigues), représentées par des ellipses qui ensèrent 90% des échantillons.

Table III.1. Distances morphologiques entre les populations insulaires des Mascareignes, exprimées en distances Procrustes (espace des conformations) et en distances de Mahalanobis (espace discriminant), respectivement au-dessus et en-dessous de la diagonale ($P < 0.0001$ toutes distances et toutes paires de populations confondues).

	Maurice	Rodrigues	La Réunion
Maurice	–	0.0137	0.0109
Rodrigues	3.21	–	0.0085
La Réunion	2.33	2.67	–

Table III.2. Tests (paramétriques et non-paramétriques) de comparaison de moyennes entre paires de populations examinées par DFA dans l'archipel des Mascareignes (Maurice, Rodrigues, La Réunion), basés sur les distances Procrustes et de Mahalanobis.

	paramétrique	non-paramétrique (10^3 permutations)	
	T^2 de Hotelling	distance Procrustes	distance de Mahalanobis
Maurice - Rodrigues	$T^2 = 989.85 ; P < 0.001$	$P < 0.001$	$P < 0.001$
Maurice - La Réunion	$T^2 = 652.64 ; P < 0.001$	$P < 0.001$	$P < 0.001$
Rodrigues - La Réunion	$T^2 = 591.54 ; P < 0.001$	$P < 0.001$	$P < 0.001$

Table III.3. Résultats des classifications par DFA entre chaque paire d'îles des Mascareignes. Les pourcentages non-biaisés ont été estimés par validation croisée de type Jackknife.

Origine	Réassignement		Total
	Maurice	Rodrigues	
Maurice	294 (91.02%)	29 (8.98%)	323
Rodrigues	11 (7.38%)	138 (92.62%)	149
	Maurice	La Réunion	Total
Maurice	282 (87.31%)	41 (12.69%)	323
La Réunion	27 (14.52%)	159 (85.48%)	186
	Rodrigues	La Réunion	Total
Rodrigues	128 (85.91%)	21 (14.09%)	149
La Réunion	22 (11.83%)	164 (88.17%)	186

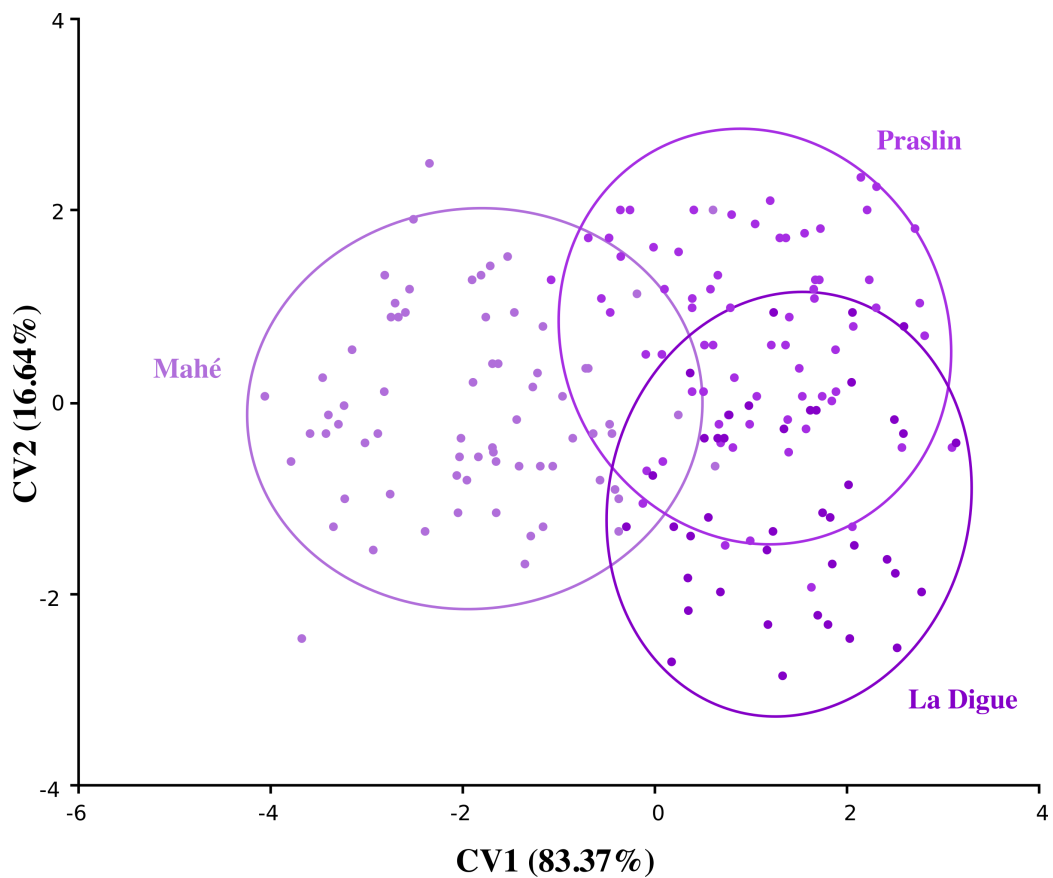


Figure III.2. Résultat de l'analyse discriminante (« Canonical variate analysis », CVA) menée sur les îles de l'archipel des Seychelles (Mahé, Praslin, La Digue), représentées par des ellipses qui ensèrent 90% des échantillons.

Table III.4. Distances morphologiques entre les populations insulaires des Seychelles, exprimées en distances Procrustes (espace des conformations) et en distances de Mahalanobis (espace discriminant), respectivement au-dessus et en-dessous de la diagonale (* : distances non-significatives).

	La Digue	Mahé	Praslin
La Digue	–	0.0114	0.0056*
Mahé	3.42	–	0.0102
Praslin	1.79*	3.02	–

Table III.5. Tests (paramétriques et non-paramétriques) de comparaison de moyennes entre paires de populations examinées par DFA dans l'archipel des Seychelles (Mahé, Praslin, La Digue), basés sur les distances Procrustes et de Mahalanobis.

	paramétrique	non-paramétrique (10 ³ permutations)	
	T^2 de Hotteling	distance Procrustes	distance de Mahalanobis
La Digue - Mahé	$T^2 = 348.22 ; P < 0.001$	$P < 0.001$	$P < 0.001$
La Digue - Praslin	$T^2 = 87.71 ; P = 0.0169$	$P = 0.017$	$P = 0.022$
Mahé - Praslin	$T^2 = 326.94 ; P < 0.001$	$P < 0.001$	$P < 0.001$

Table III.6. Résultats des classifications par DFA entre chaque paire d'îles des Seychelles. Les pourcentages non-biaisés ont été estimés par validation croisée de type Jackknife.

Origine	Réassignement		Total
	La Digue	Mahé	
Pop.			
La Digue	37 (90.24%)	4 (9.86%)	41
Mahé	11 (15.71%)	59 (84.29%)	70
Pop.			
La Digue	24 (58.54%)	17 (41.46%)	41
Praslin	25 (35.31%)	46 (64.79%)	71
Pop.			
Mahé	61 (81.14%)	9 (12.86%)	70
Praslin	9 (12.68%)	62 (87.32%)	71

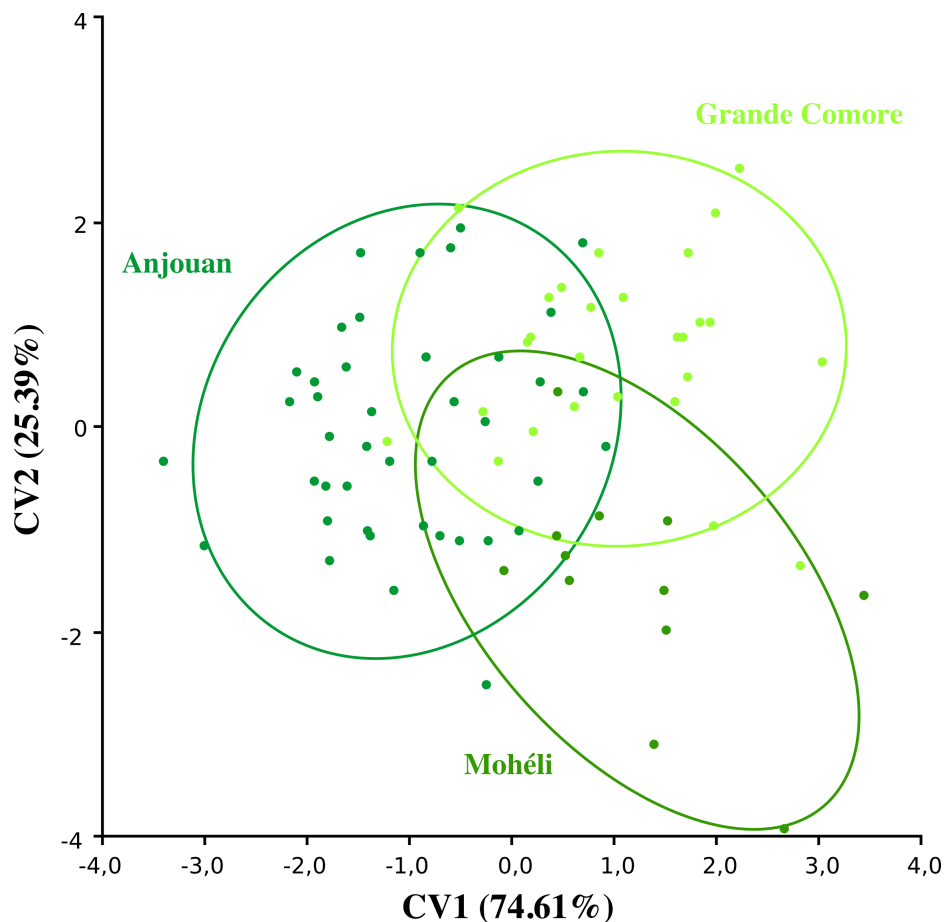


Figure III.3. Résultat de l'analyse discriminante (« Canonical variate analysis », CVA) menée sur les îles de l'archipel des Comores (Anjouan, Grande Comore, Mohéli), représentées par des ellipses qui ensèrent 90% des échantillons.

Table III.7. Tests (paramétriques et non-paramétriques) de comparaison de moyennes entre paires de populations examinées par DFA dans l'archipel des Comores (Anjouan, Mohéli, Grande Comore), basés sur les distances Procrustes et de Mahalanobis.

	paramétrique	non-paramétrique (1000 permutations)	
	T^2 de Hotteling	distance Procrustes	distance de Mahalanobis
Anjouan - Grande Comore	$T^2 = 78.35 ; P < 0.001$	$P < 0.001$	$P < 0.001$
Anjouan - Mohéli	$T^2 = 70.32 ; P < 0.001$	$P < 0.001$	$P < 0.001$
Grande Comore - Mohéli	$T^2 = 52.36 ; P = 0.0003$	$P = 0.008$	$P < 0.001$

Table III.8. Distances morphologiques entre les populations insulaires des Comores, exprimées en distances Procrustes (espace des conformations) et en distances de Mahalanobis (espace discriminant), respectivement au-dessus et en-dessous de la diagonale.

	Anjouan	Grande Comore	Mohéli
Anjouan	–	0.0164	0.0193
Grande Comore	2.23	–	0.0129
Mohéli	2.73	2.34	–

Table III.9. Résultats des classifications par DFA entre chaque paire d'îles des Comores. Les pourcentages non-biaisés ont été estimés par validation croisée de type Jackknife.

Origine	Réassignement		Total
	Anjouan	Grande Comore	
Pop.			
Anjouan	34 (80.95%)	8 (19.05%)	42
Grande Comore	6 (22.22%)	21 (77.78%)	27
Pop.			
Anjouan	36 (85.71%)	6 (14.29%)	42
Mohéli	2 (16.67%)	10 (83.33%)	12
Pop.			
Grande Comore	23 (85.19%)	4 (14.81%)	27
Mohéli	2 (16.67%)	10 (83.33%)	12

corrects pour les paires incluant Mahé sont de plus de 81%, et sont de 64.79% et 58.54% entre Praslin et La Digue, autrement dit proche d'une attribution aléatoire des individus (50%).

3.3. Archipel des Comores

Encore une fois les échantillons proviennent de trois îles, dont Anjouan ($n = 42$), Grande Comore ($n = 27$) et Mohéli ($n = 12$). Pour éviter des problèmes de sur-ajustement des modèles, seuls 6 point-repères sélectionnés pour leur pouvoir discriminant ont été conservés pour les analyses, de sorte que le plus petit groupe (Mohéli) contient autant d'individus que de variables. Encore une fois les analyses de variance permettent de conclure à des différences significatives aussi bien sur la taille centroïde ($F = 11.10$, $P < 0.0001$) que sur les conformations des ailes (ANOVA Procrustes : $F = 9.05$, $P < 0.0001$; MANOVA : $Pillai\ tr. = 0.92$, $P < 0.0001$) entre les îles.

La projection des individus le long des variables canoniques de la CVA (CV1 : 67.08%, CV2 : 32.92%) permet de distinguer les trois îles malgré une superposition partielle des nuages de points (Figure III.3). La CVA et les trois DFA indiquent que les différences entre les moyennes des groupes sont toutes significatives (Table III.7 et III.8), avec des pourcentages de réassignement correct allant de 77.78% à 85.71% (Table III.9)

3.4. Madagascar et archipels du Sud-Ouest de l'Océan Indien

Pour faciliter la lecture et l'interprétation des résultats, les archipels des Comores et des Seychelles ont été examinés comme deux groupes à part entière, i.e. sans prendre en compte la structuration inter-îles. Ceci garantit par ailleurs un nombre suffisant d'individus par groupe pour les analyses.

Les différents archipels et Madagascar se distinguent du point de vue de la taille centroïde (ANOVA : $F = 283.63$, $P < 0.0001$) et de la conformation des ailes (Procrustes ANOVA : $F = 44.83$, $P < 0.0001$; MANOVA : $Pillai\ tr. = 2.30$, $P < 0.0001$).

La CVA a construit cinq variables canoniques puisque six groupes sont inclus dans l'analyse (Madagascar, les Comores, les Seychelles, Maurice, Rodrigues et La Réunion). Les deux premières scindent les populations en deux groupes principaux : Madagascar et les Comores d'un côté, et les Seychelles et les Mascareignes de l'autre (CV1 : 53.24%, CV2 : 68.56%) (Figure). La CVA et les multiples DFA conduites sur les six groupes montrent toutes des différences entre paires de moyennes hautement significatives ($P < 0.0001$ pour toutes les

paires analysées, quelque soit le type de test) (Tables III.10 et III.11), et des pourcentages d'assignement corrects et non-biaisés très élevés (de 85.56% à 100% suivant les îles et les paires considérées) (Table III.12).

3.5. Patrons globaux de divergences morphologiques et génétiques

Les arbres non racinés construits sur la base de distances morphologiques (Procrustes et Mahalanobis) et de l'indice de similarité de Nei sont présentés Figures III.5a, III.5b et III.5c respectivement. Leurs topologies sont très similaires, et génèrent trois grands axes qui séparent les lignées évolutives continentales A, C et M. Au sein de la lignée Européenne M, une dichotomie apparaît systématiquement entre *A. m. mellifera* et *A. m. ligustica*. Les populations externes Africaines et Européennes de lignée C forment des groupes cohérents mais échouent à regrouper les différentes sous-espèces. La Réunion, Maurice et les Seychelles sont systématiquement associées, et également proches de Rodrigues. Les Mascareignes et les Seychelles sont proches à la fois morphologiquement et génétiquement des populations et sous-espèces de lignée Européenne C (*A. m. carnica* et *A. m. ligustica*), l'île Rodrigues étant à la fois la plus voisine et la plus distincte. Les îles des Comores sont proches entre elles, particulièrement du point de vue de la morphologie, et se différencient des trois lignées évolutives représentées (A, C, et M), bien que plus similaire au groupe Africain. La position de Madagascar varie suivant les topologies : elle présente une grande similarité morphologique avec les Comores et une plus grande similarité génétique avec la lignée Africaine continentale. Le test de Mantel révèle par ailleurs que les matrices de distances morphologiques (Procrustes et Mahalanobis) et génétiques sont fortement corrélées ($r = 0.71$, $P < 0.001$, 1000 permutations).

3.6. Signal phylogénétique

La projection de la phylogénie dans les espaces morphologiques obtenus par ACP (distances Procrustes) (figure III.6a) ou CVA (distances de Mahalanobis) (figure III.6b) montre une forte structuration phylogénétique de la variabilité de la conformation alaire. Ceci est confirmé par les tests de permutations, qui indiquent un signal phylogénétique statistiquement fort dans les deux projections ($P < 0.0001$).

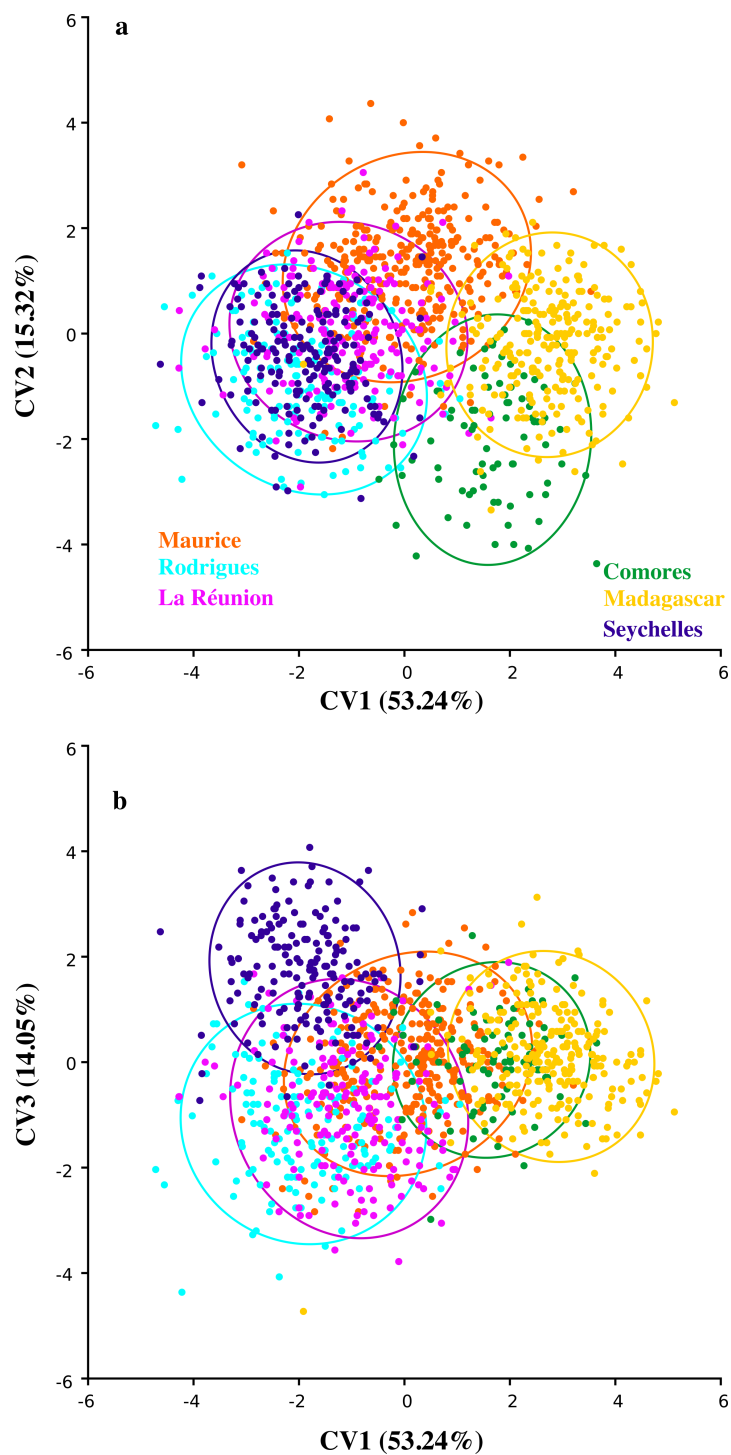


Figure III.4. Résultats de l'analyse discriminante (« Canonical variate analysis », CVA) menée sur les archipels des Seychelles, des Comores, ainsi que La Réunion, Maurice, Rodrigues et Madagascar. Chaque groupe est représenté par des ellipses qui ensèrent 90% des échantillons.

a : Scission entre Madagascar/les Comores et Maurice/Rodrigues/La Réunion/ les Seychelles sur la projection des axes 1 (CV1) et 2 (CV2).

b : Séparation de l'archipel des Seychelles le long de l'axes 3 de l'analyse discriminante (CV3).

Table III.10. Distances morphologiques entre l'archipel des Comores, les Seychelles, La Réunion, Maurice, Rodrigues et Madagascar, exprimées en distances Procrustes (espace des conformations) et en distances de Mahalanobis (espace discriminant), respectivement au-dessus et en-dessous de la diagonale ($P < 0.0001$ pour toutes les paires de distances).

	Comores	Madagascar	Maurice	Rodrigues	La Réunion	Seychelles
Comores	–	0.0138	0.0151	0.022	0.0178	0.0177
Madagascar	3.58	–	0.0134	0.0233	0.0203	0.0187
Maurice	4.01	3.35	–	0.0137	0.0109	0.009
Rodrigues	4.94	5.00	3.41	–	0.0085	0.0106
La Réunion	4.19	4.26	2.44	2.72	–	0.009
Seychelles	4.85	4.95	3.21	3.20	3.05	–

Table III.11. Tests (paramétriques et non-paramétriques) des différences de moyennes entre paires de populations examinées par DFA

	paramétrique	non-paramétrique (1000 permutations)	
	T^2 de Hotelling	distance Procrustes	distance de Mahalanobis
Comores - Madagascar	$T^2 = 908.92 ; P < 0.0001$	$P < 0.001$	$P < 0.001$
Comores - Maurice	$T^2 = 1198.49 ; P < 0.0001$	$P < 0.001$	$P < 0.001$
Comores - Rodrigues	$T^2 = 1702.19 ; P < 0.0001$	$P < 0.001$	$P < 0.001$
Comores - La Réunion	$T^2 = 1237.38 ; P < 0.0001$	$P < 0.001$	$P < 0.001$
Comores - Seychelles	$T^2 = 1710.96 ; P < 0.0001$	$P < 0.001$	$P < 0.001$
Madagascar - Maurice	$T^2 = 1857.43 ; P < 0.0001$	$P < 0.001$	$P < 0.001$
Madagascar - Rodrigues	$T^2 = 2866.40 ; P < 0.0001$	$P < 0.001$	$P < 0.001$
Madagascar - La Réunion	$T^2 = 2161.87 ; P < 0.0001$	$P < 0.001$	$P < 0.001$
Madagascar - Seychelles	$T^2 = 3530.25 ; P < 0.0001$	$P < 0.001$	$P < 0.001$
Maurice - Seychelles	$T^2 = 1321.16 ; P < 0.0001$	$P < 0.001$	$P < 0.001$
Rodrigues - Seychelles	$T^2 = 906.09 ; P < 0.0001$	$P < 0.001$	$P < 0.001$
La Réunion - Seychelles	$T^2 = 846.62 ; P < 0.0001$	$P < 0.001$	$P < 0.001$

Table III.12. Résultats des classifications par DFA entre chaque paires de groupes (Comores, Seychelles, Madagascar, La Réunion, Maurice, Rodrigues, Madagascar). Les pourcentages non-biaisés ont été estimés par validation croisée de type Jackknife.

	Comores	Madagascar	Total
Comores	74 (91.36%)	7 (8.64%)	81
Madagascar	6 (2.47%)	237 (97.53%)	243
	Comores	Maurice	
Comores	79 (97.53%)	2 (2.47%)	81
Maurice	7 (2.17%)	316 (97.83%)	323
	Comores	Rodrigues	
Comores	81 (100%)	0 (0.00%)	81
Rodrigues	1 (0.67%)	148 (99.33%)	149
	Comores	La Réunion	
Comores	78 (96.30%)	3 (3.70%)	81
La Réunion	6 (3.32%)	180 (96.77%)	186
	Comores	SEY	
Comores	80 (98.77%)	1 (1.23%)	81
Seychelles	3 (1.65%)	179 (98.35%)	182
	Madagascar	Maurice	
Madagascar	235 (96.71%)	8 (3.29%)	243
Maurice	16 (4.95%)	307 (95.05%)	323
	Madagascar	Rodrigues	
Madagascar	242 (100%)	1 (0.41%)	243
Rodrigues	0 (0.00%)	149 (100%)	149
	Madagascar	La Réunion	
Madagascar	238 (97.94%)	5 (2.06%)	243
La Réunion	5 (2.69%)	181 (97.31%)	186
	Madagascar	Seychelles	
Madagascar	241 (100%)	2 (0.82%)	243
Seychelles	0 (0.00%)	182 (100%)	182
	Maurice	Seychelles	
Maurice	297 (91.95%)	26 (8.05%)	323
Seychelles	7 (3.85%)	175 (96.15%)	182
	Rodrigues	Seychelles	
Rodrigues	134 (89.93%)	15 (10.07%)	149
Seychelles	11 (6.04%)	171 (93.96%)	182
	La Réunion	Seychelles	
La Réunion	161 (86.56%)	25 (13.44%)	186
Seychelles	11 (6.04%)	171 (93.96%)	182

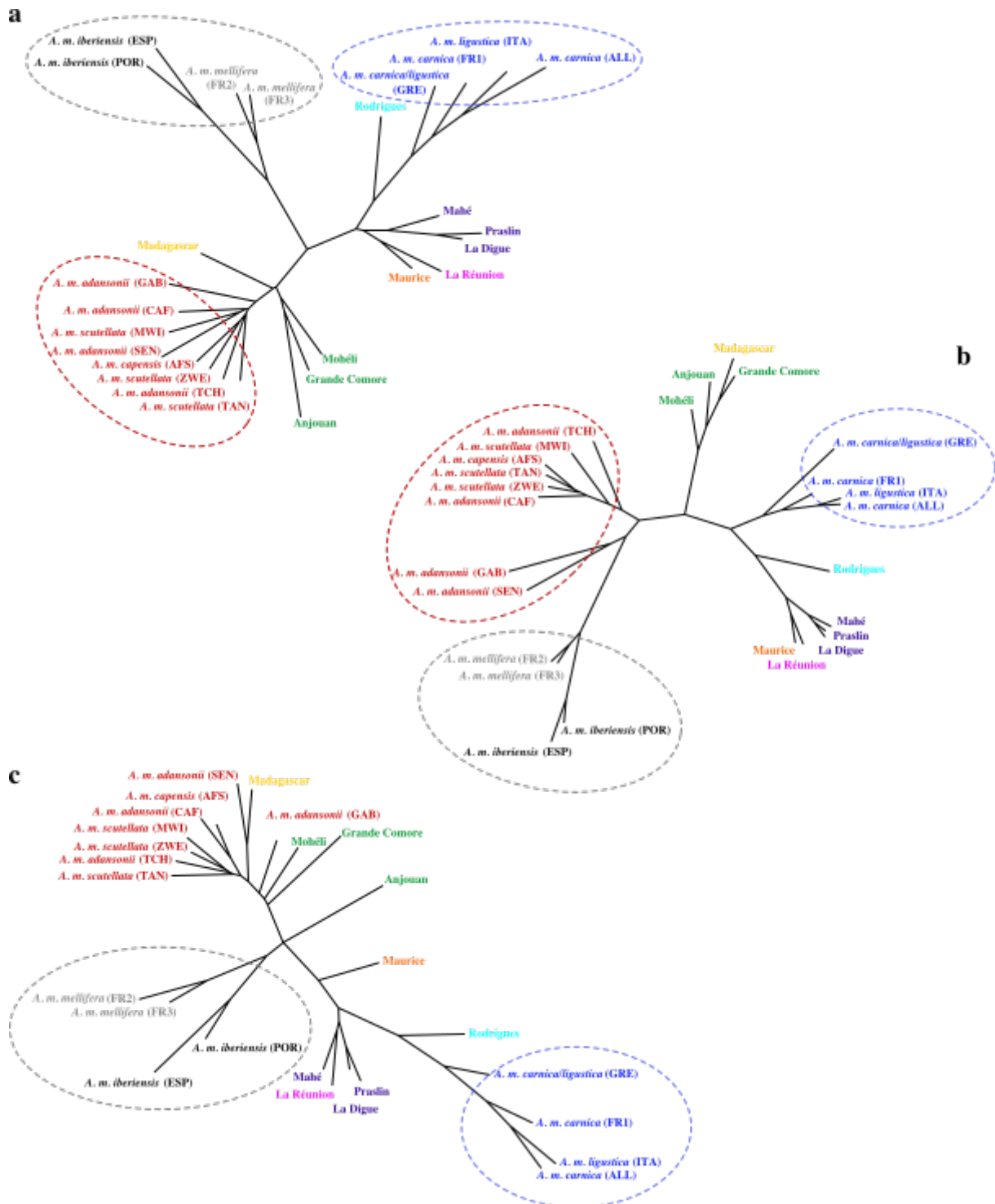


Figure III.5. Phylogénies réalisées selon la méthode des plus proches voisins, sur la base de distances morphologiques (**a** : distances Procrustes ; **b** : distances de Mahalanobis) et génétiques (**c** : distances de Nei, 14 marqueurs microsatellites). Les échantillons inclus proviennent des Comores (Anjouan, Grande Comore, Mohéli), des Seychelles (Mahé, Praslin, La Digue), des Mascareignes (La Réunion, Maurice, Rodrigues), de Madagascar, ainsi que de groupes externes, dont les populations et sous-espèces appartenant aux lignées évolutives Africaine (lignée A, en rouge), Est-Européenne (lignée C, en bleu) et Ouest-Européenne (lignée M, en gris).

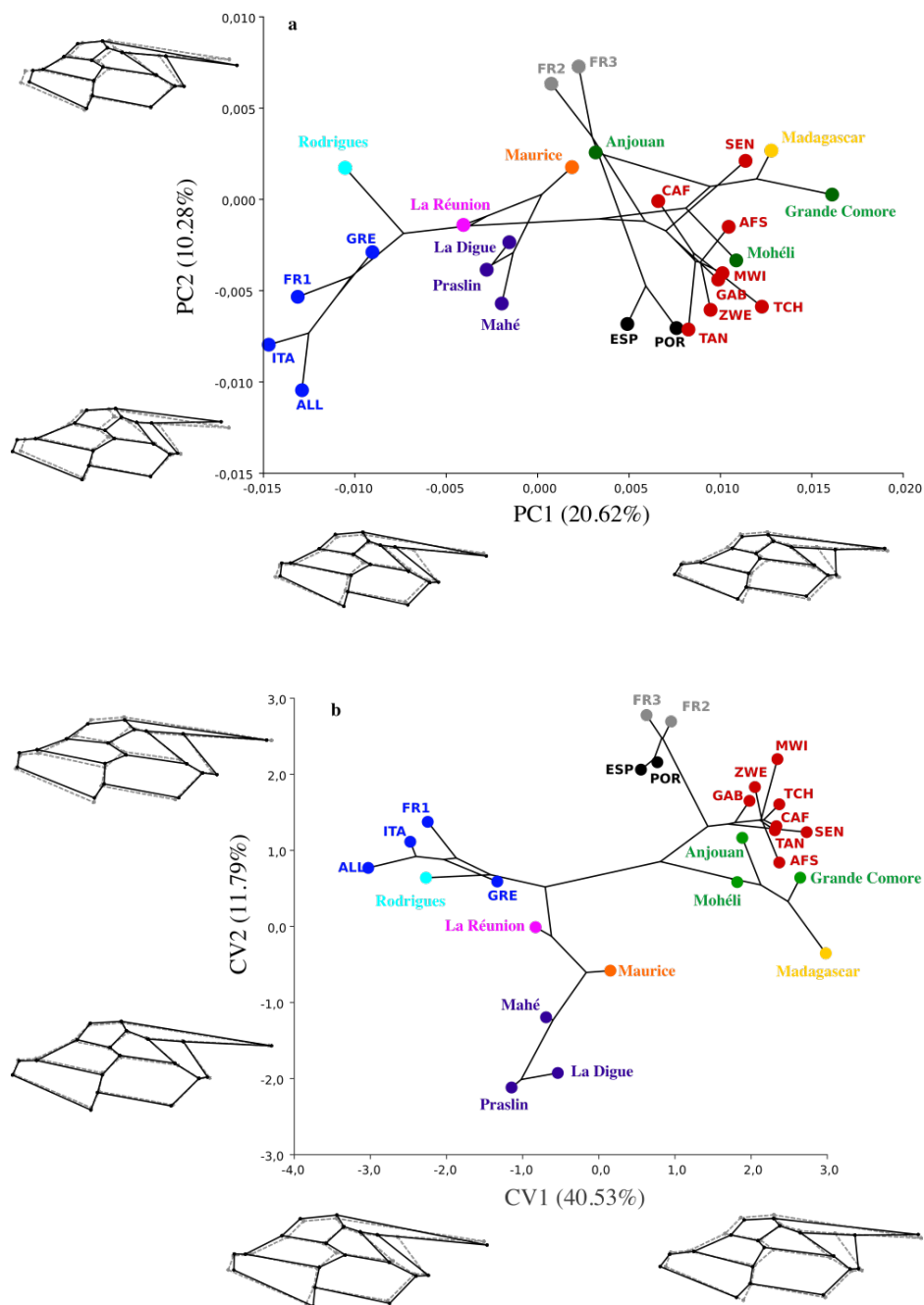


Figure III.6. Relation entre les populations d'abeilles (*A. mellifera*) échantillonnées dans le Sud-Ouest de l'Océan Indien, en Afrique et en Europe, et la variation de la conformation des ailes dans les espaces morphométriques (19 point-repères). a : projection dans les deux premières dimensions de l'ACP ; b : projection dans les deux premiers axes de l'analyse discriminante (CVA). La phylogénie formée par les populations et basée sur les distances génétiques de Nei (14 marqueurs microsatellites) est projetée dans les espaces morphométriques. FR : France ; ESP : Espagne ; POR : Portugal ; ALL : Allemagne ; ITA : Italie ; MWI : Malawi ; SEN : Sénégal ; AFS : Afrique du Sud ; TCH : Tchad ; GAB : Gabon ; ZWE : Zimbabwe ; TAN : Tanzanie ; CAF : Centrafrique ; GRE : Grèce.

4. Discussion

L'analyse de l'architecture des ailes *via* l'agencement des nervures a permis de montrer (1) que les populations insulaires d'abeilles du Sud-Ouest de l'Océan Indien – Madagascar, les Comores, les Seychelles et les Mascareignes – sont morphologiquement distinctes des populations continentales Africaines et Européennes (lignées M et C), (2) qu'il existe des divergences significatives entre les archipels et Madagascar, (3) mais aussi au sein de ces archipels.

Discrimination de toutes les populations génétiquement différenciées

Le patron de nervation alaire a permis de discriminer la quasi-totalité des populations insulaires représentées dans cette étude, c'est donc un marqueur particulièrement efficace pour examiner la variabilité intraspécifique et identifier diverses trajectoires évolutives. Seules les îles de Praslin et La Digue, situées dans l'archipel des Seychelles et distantes d'une dizaine de kilomètres, n'ont pas pu être différenciées. Techer *et al.* (2016) ont montré que Praslin et La Digue étaient génétiquement homogènes entre elles. Leur similarité morphologique est donc vraisemblablement liée une origine évolutive commune, leur proximité géographique facilitant la mise en place de flux géniques (naturels ou liés à l'Homme) et l'absence de pressions de sélection divergentes dans les deux environnements. Dans l'archipel des Açores, Ferreira (2017) a montré que deux populations insulaires d'abeilles distantes de 6 km présentaient également une grande similarité morphologique. Il semblerait donc que l'océan ne forme une barrière efficace à la dispersion de l'abeille qu'au delà des 10 kms.

Comme le suggèrent Perrard *et al.* (2014), la dimensionnalité élevée qui caractérise la conformation des ailes augmente fortement son potentiel de divergence, de sorte que, sous l'hypothèse d'une évolution neutre (dérive), lorsque deux populations se séparent, il devient improbable que leurs trajectoires évolutives respectives se rejoignent dans l'espace morphométrique multidimensionnel. Il en résulte un pouvoir discriminant comparable à celui conféré par les marqueurs microsatellites (a priori neutres) dans cette étude.

Discrimination des lignées A, C et M

Les variations de conformation alaire ne permettent pas seulement de discriminer les populations insulaires génétiquement distinctes (Techer *et al.* 2016, 2017a ; Allan, 2019), mais elles sont également congruentes avec leur histoire évolutive. Globalement, les topographies séparent nettement les lignées A, C et M formées par les groupes externes en

trois branches traditionnellement supportées par les études morphométriques et génétiques (Ruttner *et al.*, 1978 ; Ruttner, 1988 ; Garnery *et al.*, 1992 ; Arias and Sheppard, 1996 ; Franck *et al.*, 2000 ; Whitfield *et al.* 2006). Elles sont par ailleurs très analogues à celles obtenues par Miguel *et al.* (2011) sur la base de 6 marqueurs microsatellites (distances de Nei) et de la conformation des ailes (distances de Mahalanobis). On retrouve également au sein de l’embranchement M une dichotomie marquée entre les sous-espèces *A. m. iberiensis* (Portugal et Espagne) et *A. m. mellifera* (France). En revanche, le fait que les analyses (aussi bien morphologiques et génétiques) échouent à séparer clairement les différentes sous-espèces au sein des embranchements A et C provient probablement du fait que les effectifs utilisés sont insuffisants, et/ou qu’il existe des incertitudes quand à la « pureté » de certains échantillons Européens, qui pourraient provenir de populations introgressées.

Un marqueur phénotypique qui reflète l’histoire évolutive des populations du SOOI

La proximité morphologique entre les Comores et Madagascar reflète leur apparentement puisque ces deux populations appartiennent à la même sous-espèce *A. m. unicolor* ; elles sont également proches de l’embranchement A, ce qui va dans le sens de Techer *et al.* (2017b) qui concluent, *via* l’analyse de marqueurs mitochondriaux, que ces populations font partie d’un sous-groupe Africain propre au Sud-Ouest de l’Océan Indien. Ce sous-groupe n’est donc pas seulement appuyé par des particularités génétiques, mais aussi par des traits phénotypiques singuliers.

L’implémentation des groupes externes met en évidence une affinité morphologique marquée de l’île Rodrigues avec les sous-espèces de lignée Européenne C (*A. m. carnica* et *A. m. ligustica*), ce qui est congruent avec la génétique, l’historique des importations, et le fait qu’aucune lignée Africaine n’aie été détectée dans sa population (Techer *et al.* 2015). La Réunion et Maurice en revanche occupent une place intermédiaire dans l’espace morphométrique – toutefois plus proche de la lignée C – et se distinguent à la fois des populations Africaines et Européennes. Ces îles ont été mises en contacts avec *A. m. carnica*, *A. m. ligustica* (lignée C) et *A. m. mellifera* (lignée M), dont on retrouve l’empreinte génétique dans les échantillons actuels (Techer *et al.*, 2017b, Wragg *et al.* 2018). A Maurice, l’hybridation entre *A. m. unicolor* et les sous-espèces Européennes est toujours en cours, et les lignées A et C sont retrouvées en proportions équivalentes dans l’échantillon ; à La Réunion, si la lignée d’*A. m. unicolor* est largement dominante, son génome nucléaire présenterait en proportions équilibrées des origines Malgaches (*A. m. unicolor*) et Européennes (*A. m. carnica* et dans une moindre mesure *A. m. ligustica*) (Wragg *et al.* 2018). A l’échelle de la

population, La Réunion et Maurice ont donc une composition à la fois génétique et morphologique qui sont proches, qui provient probablement d'une origine Malgache commune et de la mise en contact d'*A. m. unicolor* avec *A. m. carnica* et *A. m. ligustica* principalement. Il semblerait que ce scénario soit aussi applicable, dans une certaine mesure, à l'archipel des Seychelles, qui occupe lui aussi une position intermédiaire et particulièrement proche de Maurice et La Réunion.

Finalement, la significativité du signal phylogénétique montre que les variations du patron de nervation alaires sont congruentes avec l'histoire évolutive des populations. Ces résultats suggèrent que ce trait et les trajectoires évolutives qu'il poursuit sont largement façonnées par l'histoire évolutive des populations (Perrard *et al.*, 2014), et reflètent les effets de dérive, de goulot d'étranglement, mais aussi d'introggression qui les affectent.

5. Conclusion

Si les processus stochastiques et neutres semblent expliquer en grande partie les divergences phénotypiques observées entre les îles du SOOI, il n'est pas à exclure que d'autres mécanismes puissent façonner ces trajectoires. Les conditions climatiques et écologiques, comme la latitude, l'altitude, la température ou les précipitations, sont des facteurs susceptibles d'influencer la forme des ailes et leur développement chez l'abeille et les insectes en général (Hoffmann *et al.*, 2005 ; Pitchers *et al.*, 2012 ; Gruber *et al.*, 2013 ; Bai *et al.*, 2016). L'intégration de l'hétérogénéité environnementale qu'il est susceptible d'exister entre les îles du SOOI permettrait d'évaluer son impact sur les trajectoires phénotypiques. La population de Rodrigues a la particularité d'être essentiellement d'origine Européenne (lignée C) (Techer *et al.*, 2015). Elle possède donc probablement un génome adapté aux conditions continentales tempérées, qui a été placé par l'Homme dans un milieu insulaire et tropical. Il est donc possible que les particularités morphologiques de cette population ne résultent pas uniquement de l'hybridation, des goulots d'étranglement liés aux importations, et des pratiques apicoles, mais aussi de l'effet combiné de la plasticité phénotypique et de la sélection naturelle, dû à l'exposition à des conditions écologiques très différentes de son milieu d'origine. De tels mécanismes sont susceptibles d'être en jeu dans chacune des populations échantillonnées, et de contribuer aux divergences observées. L'analyse d'autres traits phénotypiques, ainsi qu'une approche de type F_{st} - Q_{st} (Leinonen *et al.*, 2006), qui compare les degrés de divergences génétiques et phénotypiques, pourrait permettre de mieux comprendre le rôle de la sélection naturelle dans ces divergences.

IV. Discussion générale

Les objectifs de recherches de cette thèse étaient i) de caractériser la variabilité phénotypique de dix populations du SOOI sur la base du patron de nervation alaire par des analyses multivariées (méthodes Procrustes), ii) de confronter la variabilité morphologique à la variabilité génétique neutre estimée sur la base de 14 marqueurs microsatellites, et iii) d'explorer à l'île Maurice si le processus d'hybridation en cours était décelable sur la base des deux caractères morphologiques (taille et conformation des ailes). Enfin, afin de positionner la variabilité observée dans un contexte plus global, et conduire une approche morpho-phylogénétique, des ouvrières issues de populations continentales de lignées évolutives africaines et européennes ont été implémentées dans les analyses.

Congruence des approches morphologiques et génétiques neutre

Si toutes les populations de la zone SOOI génétiquement différenciées ont pu être discriminées morphologiquement, elles sont également rassemblées en fonction de leur apparentement (Figure IV.1). Ainsi, en cohérence avec les éléments historiques des importations et données génétiques, bien que singulières d'un point de vue morphologique, les abeilles de Rodrigues apparaissent morphologiquement proches des sous-espèces européennes. Les populations de Madagascar et des Comores sont proches des sous-espèces africaines. Les populations de La Réunion, Maurice et des îles des Seychelles présentent des situations intermédiaires, probablement en raison des introgressions passées avec des lignées évolutives européennes C et M (dans les Mascareignes) ou avec la sous-lignée Z, décelée aux Seychelles, et qui résulterait du contact secondaire en Syrie des lignées Y et O (Alburaki *et al.*, 2013 ; Cridland *et al.*, 2017). Ceci souligne l'effet structurant des relations phylogénétiques dans la variabilité des conformations alaires, et indique que la trajectoire de ces populations est fortement influencée par leur histoire évolutive passée et récente, i.e. les effets fondateurs, la dérive, et les importations de sous-espèces Européennes privilégiées par l'apiculture (Techer *et al.*, 2015, 2016, 2017a, 2017b).

Variabilité de la sous-espèce A. m. unicolor à Madagascar et aux Comores

La sous-espèce *A. m. unicolor* a fait l'objet de relativement peu d'études en comparaison aux sous-espèces européennes. Les patrons généraux de divergences génétiques et morphologiques dégagés par les études précédentes (Wallberg *et al.*, 2014 ; Nawrocka *et al.*, 2017) reposent sur un faible nombre d'individus (<10) et indiquent que la sous-espèce

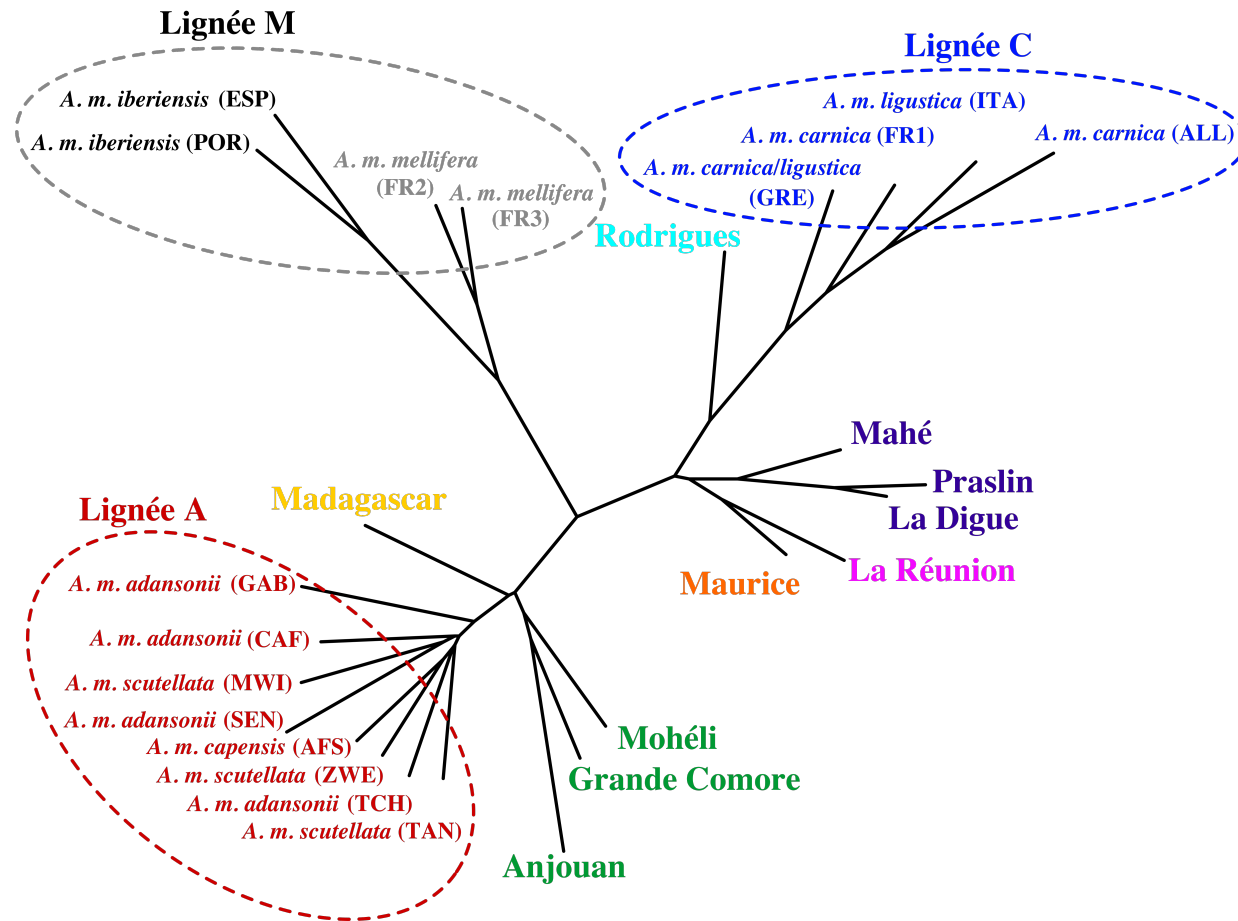


Figure IV.1. Arbre non-raciné représentant les divergences morphologiques entre les populations d'*Apis mellifera* (abeille domestique) échantillonnées dans les archipels du Sud-Ouest de l'Océan Indien (Seychelles, Comores et Mascareignes) et les groupes externes implémentés, qui proviennent de populations et sous-espèces continentales appartenant aux lignées évolutives Africaine (A), Est-Européenne (C) et Ouest-Européenne (M). Ces divergences sont obtenues à partir du pattern de nervation alaire (aile antérieure droite) d'abeilles ouvrières (Chapitre II).

A. m. unicolor diverge fortement des autres sous-espèces africaines en raison de son histoire évolutive originale et récente (Franck *et al.*, 2001) La diversité au sein de la sous-espèce est peu documentée. D'après Ruttner (1988), il existerait deux écotypes sur l'île de Madagascar – l'un présent sur les Hauts Plateaux et l'autre sur la côte – qui se distinguent sur la base de traits comportementaux, mais que les analyses génétiques ont échouées à identifier jusqu'à présent (Rasolofoarivao *et al.*, 2015). Des études préliminaires sur la taille du proboscis (Figure IV.2) montrent des différences significatives entre les populations de la côte Ouest, plus petites, et la côte Est et les Hauts Plateaux plus grandes (Bernet 2017). Ces différences de taille pourraient s'expliquer par une influence de l'environnement (ressources disponibles, conditions climatiques) (Figure IV.3) comme il l'a été suggéré dans une étude des préférences florales (Ralalaharisoa-Ramamonjisoa *et al.*, 1996) ou les pratiques apicoles. Si ces différences phénotypiques ne sont pas corrélées à la structuration génétique neutre, nous ne pouvons toutefois pas écarter une base génétique à ces divergences. Une étude récente (Antoine, 2019) a par ailleurs confirmé le caractère héritable de la taille du palpe labial (proxy du proboscis) dans les populations de l'île Maurice et de La Réunion. Une exploration fine de la forme des ailes de l'ensemble de ces populations pourrait donc apporter un nouvel éclairage sur la variabilité actuelle de l'abeille à Madagascar, et potentiellement identifier des écotypes à considérer pour la conservation de cette sous-espèce. La dispersion réduite des colonies (absence de transhumance), limitée par les pratiques apicoles traditionnelles, devrait contribuer à renforcer le caractère très local de leur potentielle adaptation.

Aux Comores, les analyses des marqueurs microsatellites et portant sur les ailes montrent qu'elles sont génétiquement et morphologiquement proches entre elles, et se différencient des trois lignées évolutives représentées (A, C, et M), bien que plus similaires au groupe Africain et en particulier à la population de Madagascar. Afin d'éclaircir les processus évolutifs en œuvre dans les divergences observées avec Madagascar, il serait particulièrement intéressant d'implémenter dans de futures analyses des individus de la sous-espèce *A. m. littorea*, présente sur la côte africaine continentale du canal du Mozambique. Par ailleurs, au sein de l'archipel, les analyses multivariées permettent de distinguer les trois îles malgré une superposition partielle des nuages de points ; les différences entre les moyennes des groupes sont toutes significatives avec des pourcentages de réassignement correct allant de 78% à 86%. Un ajustement a été réalisé car la puissance des analyses multivariées est contrainte par la taille de l'échantillon (chapitre II). En effet, il est recommandé que la taille de l'échantillon de chaque groupe soit bien supérieure au nombre de variables (Arnold, 1983).

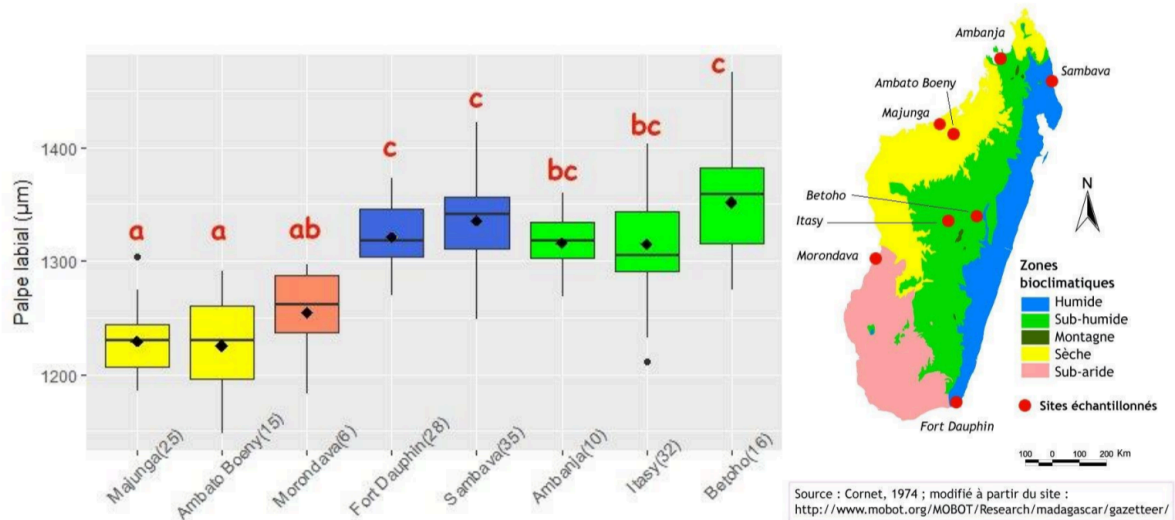


Figure IV.2. Distribution de la longueur du palpe labial (proxy du proboscis) dans chacun des sites échantillonnés à Madagascar (Bernet, 2017). Les effectifs échantillonnés sont indiqués entre parenthèse à la suite du nom du site (ce nom pouvant correspondre au nom de la région ou au nom de la ville selon le site). Les lettres en rouge signalent que les populations sont significativement différentes (lettres différentes) ou non (lettres identiques) selon le test de Wilcoxon (correction de Bonferroni).



Figure IV.3 : Illustration du clivage environnemental entre les régions Est et Ouest de Madagascar (issu de Bernet 2017). À gauche, la forêt primaire du Parc National de Masoala (Nord-Est) ; à droite, un paysage de savane herbeuse, dans la région de Morondava (Ouest). Sources des images : <http://www.geo.fr/voyages/guides-de-voyage/afrique/madagascar/>

Aussi, dans le cadre de l'approche morpho-géométrique, les ailes étant décrites par 19 points repères caractérisés par deux coordonnées, la taille de l'échantillon devrait être supérieure à 38. Afin d'obtenir des résultats plus précis et augmenter la puissance des analyses à l'échelle du SOOI, la taille de l'échantillonnage pourrait être augmentée, ce qui en pratique est difficile en raison du fait que les colonies ne sont pas enruchées mais à l'état d'essaims sauvages (difficiles à localiser et périlleux à récolter).

Diversité d'*Apis mellifera* à Maurice, La Réunion et aux Seychelles

Les îles des Seychelles, Maurice et La Réunion, bien que différenciées, sont étonnamment proches génétiquement et morphologiquement sur la base des marqueurs utilisés. Elles présentent des caractéristiques intermédiaires entre les groupes Africain (*A. m. unicolor*) et Européen (lignée C). Toutefois, la persistance de lignées évolutives Européennes est très variable entre ces îles : d'après Techer *et al.* (2017b), à Maurice, environ 44.7% des individus échantillonnés sont de lignée Européenne C et 1.1% de lignée M ; à La Réunion, 4.3% de lignée C et 0.3% de lignée M ont été détectées ; enfin aux Seychelles, aucune lignée Européenne n'a été retrouvée, mais la sous-lignée Z a été observée dans six colonies et pourrait provenir d'introductions non-répertoriées (Techer *et al.*, 2016). Ces îles illustrent l'impact de l'Homme sur la diversité des populations, et la difficulté qu'engendre la mise en place de flux géniques (même occasionnels) entre populations isolées pour identifier la contribution des processus à l'œuvre dans les divergences observées. Malgré des environnements très disparates, en termes de surfaces, de reliefs, de diversité d'habitats et de climat par exemple, ainsi que des traces d'introductions dont les proportions et les origines sont variables et incertaines, il est possible que les similarités génétiques et morphologiques observées découlent de pratiques apicoles ou bien d'environnements favorisant les mêmes traits. Par exemple, les colonies les plus productives, un trait généralement associé aux lignées Européennes, pourraient être naturellement favorisées ou sélectionnées par les apiculteurs.

Hybridation en cours à l'île Maurice

A l'île Maurice la concordance entre la variation des marqueurs morphologiques (taille et conformation des ailes) et génétiques neutres souligne que l'hybridation entre deux groupes génétiques distincts, l'un apparenté à *A. m. unicolor* et l'autre aux sous-espèces européennes importées, est un processus récent et toujours en cours sur cette île. La mise en contact des sous-espèces contribue à accroître la variabilité phénotypique de la population. Les introductions humaines et l'apiculture ont donc fortement influencé la trajectoire évolutive de cette population. Par ailleurs, cette diversité accrue pourrait s'avérer « bénéfique » face à

l'introduction accidentelle de parasites et pathogènes sur l'île (Tarpy and Seeley, 2003 ; Desai and Currie, 2015 ; Esnault *et al.*, 2018) par exemple, ou face aux bouleversements environnementaux produits par l'Homme *via* la destruction des habitats indigènes (moins de 2% d restants), l'importation d'espèces invasives, une urbanisation et une agriculture croissantes, etc. (Florens *et al.*, 2012 ; Florens, 2013). Dans un autre contexte, le cas de l'abeille africanisée (hybridation entre des sous-espèces européennes avec la sous-espèce *A. m. Scutellata* importée d'Afrique du Sud ultérieurement sur le continent Américain) illustre l'influence « positive » (d'un point de vue adaptatif) de l'hybridation entre différentes sous-espèces sur la trajectoire évolutive des populations d'abeilles. L'exploitation adaptative de la diversité accrue chez cette population par l'Homme lui a permis de conquérir toute l'Amérique, du Sud jusqu'au Etats-Unis, en quelques décennies seulement (Schneider *et al.*, 2004).

Le contexte de l'île Maurice est singulier dans la mesure où il ne s'agit pas de 'l'Africanisation' d'une population initialement d'origine évolutive européenne comme décrit dans de nombreuses études (avec invasion du mitotype Africain et coexistence de génomes nucléaires) (Clarke *et al.*, 2002, Schneider *et al.*, 2004, Mortiz *et al.*, 2005, Krauss *et al.*, 2007), mais plutôt d'une 'Européanisation' d'une population d'origine évolutive africaine (Techer *et al.*, 2017a). Schneider *et al.* (2003) ont mis en évidence de façon expérimentale que le sens de l'introggression pouvait être déterminant d'un point de vue morphologique. En effet, les hybrides présentaient des différences de taille et forme en fonction de leur origine maternelle africaine ou européenne. Si ces différences affectent l'aérodynamisme, alors les performances en vol pourraient être affectées, et, *in fine*, la valeur sélective d'une des lignées pourraient être (dé)favorisée. Dans le cadre de ce travail, les données récoltées dans différents sites et milieux naturels et le caractère généralement asymétrique de l'introggression observée ne fournit pas un design permettant pas de vérifier cette tendance.

L'étude de la stabilité développementale des individus, un trait parfois relié à la fitness des individus (ici estimée par le degrés d'asymétrie fluctuante, ie. la différence entre ailes gauche et droite), montre que, contrairement aux prédictions classiques théoriques (Clarke *et al.*, 1992 ; Clarke and Oldroyd, 1996) les individus hybrides (soumis à un éventuel déséquilibre génomique) et les individus présentant un fond génétique européen (soumis à un éventuel stress associé aux changements d'environnements) ne présentent pas des degrés plus fort d'asymétrie fluctuante.

En dépit du grand nombre d'hybridations entre sous-espèces d'*A. mellifera*, l'impact de l'hybridation sur la stabilité développementale a finalement très peu été étudiée (Smith *et al.*,

1997 ; Schneider *et al.*, 2003). Schneider *et al.* (2003) ont montrés qu'en conditions contrôlées, les hybrides européens / africains ne présentent pas des valeurs d'asymétrie fluctuante plus élevées pour la taille et forme des ailes que les individus parentaux. Toutefois, la conformation des ailes des ouvrières africaines présentait une asymétrie fluctuante plus faible que les ouvrières européennes ou hybrides, suggérant que la fitness des ouvrières européennes et hybrides pourraient être négativement affectées en comparaison aux africaines. L'impact de l'asymétrie des ailes sur l'aérodynamisme chez *A. mellifera* reste cependant inconnu. Chez les insectes il a été montré que la précision du vol diminue lorsque l'asymétrie des ailes augmente (Møller and Swaddle 1997 ; Clarke, 1998 ; Samejima and Tsubaki, 2010), et qu'elle pourrait avoir un rôle négatif dans la sélection sexuelle en générale (Møller and Pomiankowski, 1993 ; Møller, 1996). Jaffé et Moritz (2010) ont mis en évidence que les mâles d'*A. mellifera* présents sur les aires de congrégation de mâles présentaient des degrés d'asymétrie fluctuante significativement plus faibles que les mâles collectés au sein des ruches, suggérant ainsi que la stabilité développementale (asymétrie plus faible) pourrait influencer la capacité des mâles à s'accoupler en vol et conférer un avantage évolutif. A Maurice, l'étude de l'asymétrie des ailes des castes reproductives issues de différentes lignées évolutives et hybrides mériterait d'être explorée pour tester une influence de l'hybridation sur un proxy de la fitness des individus. Ceci pourrait contribuer à expliquer le caractère directionnel de l'introggression fréquemment observé en cas d'hybridation entre lignée africaines et européenne.

Si l'asymétrie fluctuante a pu être détectée et quantifiée efficacement aussi bien sur la taille que la conformation des ailes, il a été impossible de relier cet indicateur à un stress environnemental ou génétique particulier. Toutefois, ces stress peuvent s'additionner et se confondre, de sorte qu'il est presque impossible de départager les différents facteurs en causes dans des conditions naturelles. En revanche, la comparaison des valeurs obtenues à Maurice avec les autres îles du SOOI, qui sont très hétérogènes en termes d'habitats, de diversité, d'anthropisation et de pratiques apicoles, pourrait permettre de mieux comprendre la variabilité de ce trait chez l'abeille, et les implications en termes de résistance et de fitness des populations dans un contexte perturbé. Les populations des îles des Comores, où les colonies sont à l'état d'essaims sauvages non domestiqués, permettraient par exemple d'avoir une idée du degré d'asymétrie d'*A. m. unicolor* en l'absence de pression de sélection d'origine anthropique. L'étude de l'asymétrie dans la population de Rodrigues (constituée d'individus issus d'introggressions et de backcross avec des lignées européennes jusqu'à un fond génétique

dominant d'Européenne (Wragg et al 2018)), permettrait d'éventuellement écarter l'hypothèse d'un stress développemental du à des conditions environnementales (climat tropical) différentes de celles de la lignée d'origine (climat plus tempéré). Par ailleurs, un nombre croissant d'études relie les instabilités du développement chez l'abeille à l'usage de pesticides, d'insecticides (Banaszak-Cibicka et al., 2018 ; Friedli et al., 2019), et au niveau d'anthropisation du milieu (Nunes et al., 2015 ; Leonard et al., 2018).

Impact des activités anthropiques sur la diversité d'Apis mellifera dans le SOOI ?

La diversité des abeilles africaines est communément considérée comme peu impactée par l'Homme, étant donné qu'elles sont jusqu'à présent assez peu concernées par l'industrie de l'apiculture (Dietemann et al., 2009) ; contrairement aux Européennes, dont la diversité a largement été remaniée par l'Homme (De la Rúa et al., 2009 ; Leclercq et al., 2018). Les analyses génétiques récentes combinées aux résultats des analyses phénotypiques montrent que le SOOI fait exception au sein de la lignée Africaine, et justifient qu'elle fasse l'objet d'une attention particulière étant donné le rôle écologique et économique majeur de l'abeille dans ce hotspot de biodiversité.

Comme évoqué précédemment, la diversité à Madagascar par exemple mérite plus de recherches, étant donné qu'elle est mal connue, et potentiellement déjà érodée du fait de la disparition rapide de ses habitats naturels (10% restants ; Myers et al., 2000), et de la présence du parasite *Varroa destructor* depuis 2010 qui engendre une forte mortalité des colonies (Rasolofoarivao et al., 2013). Toutes les îles de la zone font face aux mêmes menaces, comme en témoigne l'arrivée accidentelle du *Varroa* à Maurice en 2014 (Esnault et al. 2018), et en 2017 à La Réunion, malgré les réglementations. Les territoires géographiquement isolés et fragmentés du SOOI sont donc en réalité très connectés. En effet, le SOOI forme une vaste région géopolitique où résident cinq nations (République de Madagascar, République de Maurice, République des Seychelles, Union des Comores, France) qui entretiennent des liens économiques, commerciaux et humains étroits. Dans ce contexte, mieux caractériser la diversité de l'abeille et son rôle dans les différents écosystèmes apparaît nécessaire pour la préserver d'une part, et d'autre part pour comprendre l'impact des perturbations en cours sur les populations et mieux anticiper celles à venir.

Apport de cette étude concernant l'utilisation de la nervation alaire comme un marqueur efficace pour la micro-taxonomie d'A. mellifera

Une partie de ce travail de recherche visait à comparer le pouvoir discriminant de la conformation des ailes avec celui des marqueurs microsatellites. Les résultats montrent non

seulement que ces populations sont autant structurées morphologiquement que génétiquement, mais aussi que la variabilité de la conformation des ailes reflète l'histoire évolutive de ces populations. L'étude de la conformation des ailes de plus de 14000 abeilles par l'approche morpho-géométrique menée dans les îles et archipels du SOOI permet donc de réaffirmer l'efficacité de ce marqueur morphologique pour étudier la micro-taxonomie de cette espèce. S'il permet la discrimination des différentes lignées et nombreuses sous-espèces qui la caractérise (Kandemir *et al.*, 2011), il confirme également son efficacité pour identifier les populations hybrides engendrées par l'introduction de sous-espèces hors de leur aire naturelle de répartition (Oleska and Tofilski, 2015). Ces analyses sont peu coûteuses et accessibles ; par conséquent, elles peuvent constituer une alternative aux méthodes moléculaires, ou facilement être combinées aux analyses génétiques. En outre, l'utilisation de marqueurs morphométriques s'avère parfois plus appropriée que les marqueurs génétiques pour distinguer certaines sous-espèces ou écotypes (Oldroyd *et al.*, 1995 ; Strange *et al.*, 2008). Plusieurs logiciels d'identification (semi)automatiques des sous-espèces ont été développés principalement pour des sous-espèces européennes, comme ID-BEES (Batra, 1988), FABIS (Rinderer *et al.*, 1986), ABIS (Francoy *et al.*, 2008), et peu sont en accès libre, parmi lesquels ApiClass (Baylac *et al.*, 2008), DrawWing, plutôt destiné à une approche générique (Tofilski, 2004), et récemment IdentiFly (Nawrocka *et al.*, 2017). Les images ici acquises pour les îles des Comores et Madagascar, illustrant la diversité au sein de la sous-espèce *A. m. unicolor*, seront disponibles en *open access* et pourront être implémentées aux bases de données d'identification. A ce jour seul IdentiFly (Nawrocka *et al.*, 2017) détient sept individus d'*Apis mellifera unicolor* (Figure IV.4), ce qui représente un échantillon relativement faible pour rendre compte de la diversité d'*A. m. unicolor*. Même si la « pureté » des spécimens considérés ne peut être établie (contrairement aux spécimens de référence utilisés pour la détermination des sous-espèces), ces données (ainsi que celles des Seychelles) sont néanmoins pertinentes pour assigner des spécimens à des populations géographique actuelles.

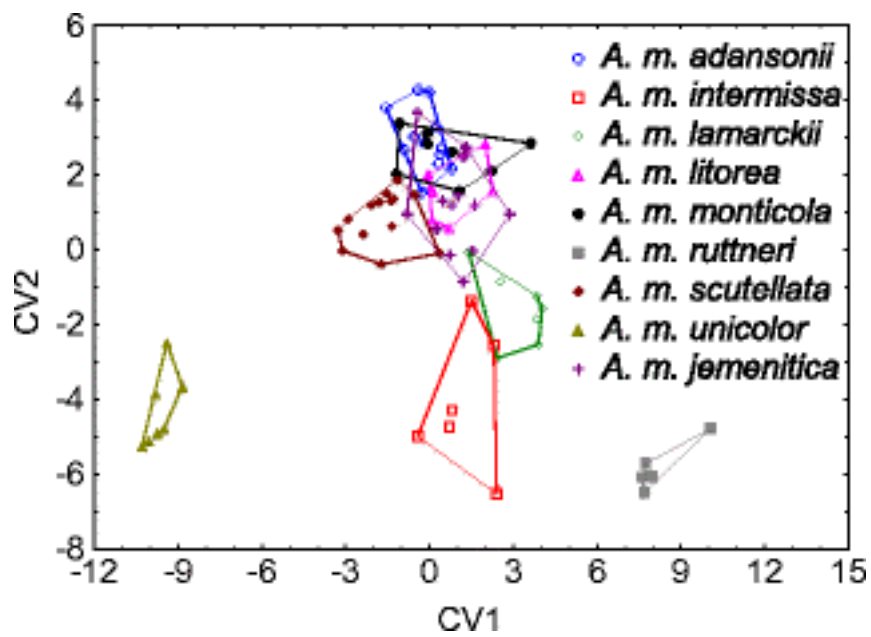


Figure IV.4. Discrimination des sous-espèces Africaines par le logiciel IdentiFly (Nawrocka et al, 2017). La sous-espèce *A. m. unicolor* est représentée dans le coin inférieur gauche par sept individus.

V. Conclusion et perspectives

Cette étude a permis la caractérisation de la variabilité de la taille et forme des ailes antérieures chez *A. mellifera* dans les îles du SOOI, et a ouvert des pistes pour mieux comprendre les processus micro-évolutifs à l'origine des divergences entre les populations dans cette zone.

L'originalité de cette étude morphométrique est son échantillonnage à une large échelle géographique et l'effort réalisé pour chacune des populations insulaires couplé à une analyse génétique pour chacun des individus. La majorité des études de morphométrie s'appuient sur des échantillons de 10 à 20 individus par colonie, mais sur un nombre réduit de colonies (e.g. Ruttner *et al.*, 1978, Cornuet and Fresnaye, 1989, Radloff *et al.*, 2003, Andere *et al.*, 2008, Tofilski, 2008). Ici, le fait de ne considérer qu'une seule ouvrière par colonie peut masquer une potentielle variabilité intra-colonie, mais les effectifs échantillonnés sont généralement assez conséquents ($n \gg 30$) pour être considérés représentatifs de la population à l'échelle de l'île, et pour limiter la probabilité que les ouvrières prélevées aléatoirement dans chaque colonie soient systématiquement des individus ayant des tailles et formes d'ailes extrêmes par rapport à la moyenne de la colonie. De plus, à l'échelle du SOOI, il semble cohérent de considérer que les ouvrières issues d'une même île appartiennent à une unité géographique isolée, et par conséquent qu'elles font partie d'un groupe indépendant. Pour conclure, si les pressions anthropiques jouent un rôle crucial dans la microévolution d'*A. mellifera*, l'abeille domestique, dans le SOOI, on ne peut pas écarter une contribution non négligeable de l'environnement, *via* la sélection naturelle ou la plasticité phénotypique.

Afin de mieux comprendre l'impact de l'isolement géographique et des importations sur les trajectoires évolutives des populations, il est prévu d'intégrer à ces travaux d'autres traits phénotypiques, potentiellement plus soumis à sélection, et dont la variabilité est potentiellement plus directement reliée à des rôles écologiques ou fonctionnels particulier. D'une part il s'agit du proboscis, autrement dit la « langue » des abeille, qui lui sert à butiner, et qui pourrait être impacté par les assemblages floristiques endémiques et variés sur les îles ; d'autre part il s'agit du niveau de polyandrie, c'est à dire le nombre de mâles qui participent efficacement à la descendance d'une colonie. Ce second trait est variable en fonction des sous-espèces (Franck *et al.*, 2000b ; Tarpy *et al.*, 2010) et des conditions climatiques (El-Niweiri and Moritz, 2011), et pourrait avoir un rôle important dans le maintien de la diversité génétique et la fitness de ces populations isolées et fragmentées (Fuchs and Moritz, 1999 ; Ding *et al.*, 2017)

Références bibliographiques

- ABOU-SHAARA, H., AL-GHAMDI, A., & MOHAMED, A. (2013). Body morphological characteristics of honey bees. *Agricultura*, *10*, 45-49.
- ALBURAKI, M., BERTRAND, B., LEGOUT, H., MOULIN, S., ALBURAKI, A., SHEPPARD, W., & GARNERY, L. (2013). A fifth major genetic group among honeybees revealed in Syria. *BMC Genetics*, *14*(1), 117. doi: 10.1186/1471-2156-14-117
- ALLAN, O. (2019). Genetic characterization of honeybee (*Apis mellifera*) in Comoros Islands using mitochondrial and nuclear markers. *Kenyatta University, Thesis*.
- ALLEN-WARDELL, G., BERNHARDT, P., BITNER, R., BURQUEZ, A., BUCHMANN, S., & CANE, J. et al. (1998). The Potential Consequences of Pollinator Declines on the Conservation of Biodiversity and Stability of Food Crop Yields. *Conservation Biology*, *12*(1), 8-17. doi: 10.1046/j.1523-1739.1998.97154.x
- ALPATOV, W. (1929). Biometrical Studies on Variation and Races of the Honey Bee (*Apis mellifera* L.). *The Quarterly Review Of Biology*, *4*(1), 1-58. doi: 10.1086/394322
- ANDERE, C., GARCIA, C., MARINELLI, C., CEPEDA, R., RODRIGUEZ, E., & PALACIO, A. (2008). Morphometric variables of honeybees *Apis mellifera* used in ecotypes characterization in Argentina. *Ecological Modelling*, *214*(1), 53-58. doi: 10.1016/j.ecolmodel.2008.01.010
- ANTOINE, G. (2018). Héritabilité de traits morphologiques chez l'abeille *Apis mellifera unicolor* Latreille, 1802. (Mémoire de Master). Université de La Réunion, Saint Denis
- ARIAS, M., & SHEPPARD, W. (1996). Molecular Phylogenetics of Honey Bee Subspecies (*Apis mellifera* L.) Inferred from Mitochondrial DNA Sequence. *Molecular Phylogenetics And Evolution*, *5*(3), 557-566. doi: 10.1006/mpev.1996.0050
- BAI, Y., DONG, J., GUAN, D., XIE, J., & XU, S. (2016). Geographic variation in wing size and shape of the grasshopper *Trilophidia annulata* (Orthoptera: Oedipodidae): morphological trait variations follow an ecogeographical rule. *Scientific Reports*, *6*(1). doi: 10.1038/srep32680
- BANASZAK-CIBICKA, W., FLISZKIEWICZ, M., LANGOWSKA, A., & ZMIHORSKI, M. (2017). Body size and wing asymmetry in bees along an urbanization gradient. *Apidologie*, *49*(3), 297-306. doi: 10.1007/s13592-017-0554-y
- BAROUR, C., TAHAR, A., & BAYLAC, M. (2011). Forewing Shape Variation in Algerian Honey Bee Populations of *Apis mellifera intermissa* (Buttel-Reepen, 1906) (Hymenoptera: Apidae): A Landmark-Based Geometric Morphometrics Analysis. *African Entomology*, *19*(1), 11-22. doi: 10.4001/003.019.0101
- BATRA, S. (1988). Automatic image analysis for rapid identification of Africanized honey bees (pp. 260-263). Ellis Horwood Limited.

- BAYLAC, M., GARNERY, L., THARAVY, D., PEDRAZA-ACOSTA, J., RORTAIS, A., & ARNOLD, G. (2008). ApiClass, an automatic wing morphometric expert system for honeybee identification. Retrieved from <http://apiclass.mnhn.fr>
- BAYLAC, M., VILLEMANT, C., & SIMBOLOTTI, G. (2003). Combining geometric morphometrics with pattern recognition for the investigation of species complexes. *Biological Journal Of The Linnean Society*, 80(1), 89-98. doi: 10.1046/j.1095-8312.2003.00221.x
- BERNET, C. (2017). Divergences morphologiques entre populations d'abeilles des îles du Sud-Ouest de l'Océan Indien ? Caractérisation de la variabilité et distribution de la taille du proboscis. (Mémoire de Master). Université de La Réunion, Saint Denis.
- BOOKSTEIN, F. (1991). *Morphometric tools for landmark data geometry and biology*. Australia: Cambridge University Press.
- CLARK, P., DYKE, A., SHAKUN, J., CARLSON, A., CLARK, J., & WOHLFARTH, B. et al. (2009). The Last Glacial Maximum. *Science*, 325(5941), 710-714. doi: 10.1126/science.1172873
- CLARKE, G. (1998). The genetic basis of developmental stability. IV. Individual and population asymmetry parameters. *Heredity*, 80(5), 553-561. doi: 10.1046/j.1365-2540.1998.00326.x
- CLARKE, G., & OLDROYD, B. (1996). The genetic basis of developmental stability in *Apis mellifera* II. Relationships between character size, asymmetry and single-locus heterozygosity. *Genetica*, 97(2), 211-224. doi: 10.1007/bf00054628
- CLARKE, G., OLDROYD, B., & HUNT, P. (1992). The Genetic basis of developmental stability in *Apis mellifera*: heterozygosity versus genic balance. *Evolution*, 46(3), 753-762. doi: 10.1111/j.1558-5646.1992.tb02081.x
- CLARKE, K., RINDERER, T., FRANCK, P., QUEZADA-EUAN, J., & OLDROYD, B. (2002). The Africanization of honeybees (*Apis mellifera* L.) of the Yucatan: a study of a massive hybridization event across time. *Evolution*, 56(7), 1462. doi: 10.1554/0014-3820(2002)056[1462:taoham]2.0.co;2
- CLEMENCET, J., AUBERT, C., BLOTTIERE, D., & SANCHEZ, M. (2013). Kleptoparasitism in the endemic gecko *Phelsuma inexpectata*: pollen theft from foraging honeybees on Réunion. *Journal Of Tropical Ecology*, 29(3), 251-254. doi: 10.1017/s0266467413000229
- CORNUET, J., & FRESNAYE, J. (1989). Etude biométrique de colonies d'abeilles d'Espagne et du Portugal. *Apidologie*, 20(1), 93-101. doi: 10.1051/apido:19890109
- COSTANZA, R., D'ARGE, R., De GROOT, R., FARBER, S., GRASSO, M., & HANNON, B. et al. (1997). The value of the world's ecosystem services and natural capital. *Nature*, 387(6630), 253-260. doi: 10.1038/387253a0
- CRANE, E. (1999). *The world history of beekeeping and honey hunting*. London: Routledge.

- CRIDLAND, J., TSUTSUI, N., & RAMIREZ, S. (2017). The Complex Demographic History and Evolutionary Origin of the Western Honey Bee, *Apis Mellifera*. *Genome Biology And Evolution*, 9(2), 457-472. doi: 10.1093/gbe/evx009
- CUCCHI, T., & EVIN, A. (2015). Morphométrie géométrique et archéozoologie : Concepts, méthodes et applications. In M. Balasse, J. P. Brugal, Y. Dauphin, E-M. Geigl, C. Oberlin, & I. Reiche (Eds.), *Messages d'os, Archéométrie du squelette animal et humain* (pp. 197-216).
- DE LA RÚA, P., GALIAN, J., PEDERSEN, B., & SERRANO, J. (2006). Molecular characterization and population structure of *Apis mellifera* from Madeira and the Azores. *Apidologie*, 37(6), 699-708. doi: 10.1051/apido:2006044
- DE LA RÚA, P., GALIAN, J., SERRANO, J., & MORITZ, R. (2001). Molecular characterization and population structure of the honeybees from the balearic islands (Spain). *Apidologie*, 32(5), 417-427. doi: 10.1051/apido:2001141
- DE LA RÚA, P., JAFFE, R., DALL'OLIO, R., MUÑOZ, I., & SERRANO, J. (2009). Biodiversity, conservation and current threats to European honeybees. *Apidologie*, 40(3), 263-284. doi: 10.1051/apido/2009027
- DESAI, S., & CURRIE, R. (2015). Genetic diversity within honey bee colonies affects pathogen load and relative virus levels in honey bees, *Apis mellifera* L. *Behavioral Ecology And Sociobiology*, 69(9), 1527-1541. doi: 10.1007/s00265-015-1965-2
- DIETEMANN, V., PIRK, C., & CREWE, R. (2009). Is there a need for conservation of honeybees in Africa?. *Apidologie*, 40(3), 285-295. doi: 10.1051/apido/2009013
- DING, G., XU, H., OLDROYD, B., & GLOAG, R. (2017). Extreme polyandry aids the establishment of invasive populations of a social insect. *Heredity*, 119(5), 381-387. doi: 10.1038/hdy.2017.49
- DRAUSCHKE, M., STEINHAGE, V., VEGA, A., MÜLLER, S., FRANCOY, T., & WITTMANN, D. (2007). Reliable Biometrical Analysis in Biodiversity Information Systems. *Proceedings Of The 7Th International Workshop On Pattern Recognition In Information Systems*, 27-36. doi: 10.5220/0002430300250036
- DRYDEN, I., & MARDIA, K. (1998). *Statistical shape analysis*. Chichester, West Sussex: Wiley Blackwell.
- DUPRAW, E. (1965). Non-Linnean Taxonomy and the Systematics of Honeybees. *Systematic Zoology*, 14(1), 1. doi: 10.2307/2411899
- DUPRAW, E. (1964). Non-Linnean Taxonomy. *Nature*, 202(4935), 849-852. doi: 10.1038/202849a0
- EL-NIWEIRI, M., & MORITZ, R. (2011). Mating in the rain? Climatic variance for polyandry in the honeybee (*Apis mellifera jemenitica*). *Population Ecology*, 53(3), 421-427. doi: 10.1007/s10144-011-0271-8
- ENGEL, M. (1999). The Taxonomy of Recent and Fossil Honey Bees (Hymenoptera: Apidae; *Apis*). *Journal Of Hymenoptera Research*, 8, 165-196.

- ESNAULT, O., MEENOWA, D., SOOKAR, P., CHAUZAT, M., & DELATTE, H. (2018). Spread and strain determination of *Varroa destructor* following its introduction to Mauritius and interactions with the bee louse *Braula pretoriensis* in honey bee colonies. *Journal Of Apicultural Research*, 58(1), 75-83. doi: 10.1080/00218839.2018.1517987
- ESNAULT, O., MEENOWA, D., SOOKAR, P., CHAUZAT, M., & DELATTE, H. (2018). Spread and strain determination of *Varroa destructor* following its introduction to Mauritius and interactions with the bee louse *Braula pretoriensis* in honey bee colonies. *Journal Of Apicultural Research*, 58(1), 75-83. doi: 10.1080/00218839.2018.1517987
- FERREIRA, H. (2017). Diversity patterns of honey bee (*Apis mellifera* L.) populations from the Archipelago of the Azores: insights from mtDNA and wing geometric morphometrics. *Universidade Do Porto, Tese*, 76.
- FLETCHER, D. (1978). The African Bee, *Apis mellifera adansonii*, in Africa. *Annual Review Of Entomology*, 23(1), 151-171. doi: 10.1146/annurev.en.23.010178.001055
- FLORENS, F. (2013). Conservation in Mauritius and Rodrigues: Challenges and Achievements from Two Ecologically Devastated Oceanic Islands. *Conservation Biology*, 40-50. doi: 10.1002/9781118679838.ch6
- FLORENS, F., BAIDER, C., MARTIN, G., & STRASBERG, D. (2012). Surviving 370 years of human impact: what remains of tree diversity and structure of the lowland wet forests of oceanic island Mauritius?. *Biodiversity And Conservation*, 21(8), 2139-2167. doi: 10.1007/s10531-012-0304-4
- FRANCK, P., GARNERY, L., LOISEAU, A., OLDROYD, B., HEPBURN, H., SOLIGNAC, M., & CORNUET, J. (2001). Genetic diversity of the honeybee in Africa: microsatellite and mitochondrial data. *Heredity*, 86(4), 420-430. doi: 10.1046/j.1365-2540.2001.00842.x
- FRANCK, P., GARNERY, L., SOLIGNAC, M., & CORNUET, J. (2000). Molecular confirmation of a fourth lineage in honeybees from the Near East. *Apidologie*, 31(2), 167-180. doi: 10.1051/apido:2000114
- FRANCK, P., KOENIGER, N., LAHNER, G., CREWE, R., & SOLIGNAC, M. (2000). Evolution of extreme polyandry: an estimate of mating frequency in two African honeybee subspecies, *Apis mellifera monticola* and *A. m. scutellata*. *Insectes Sociaux*, 47(4), 364-370. doi: 10.1007/pl00001732
- FRANCOY, T., WITTMANN, D., DRAUSCHKE, M., MÜLLER, S., STEINHAGE, V., & Bezerra-Laure, M. et al. (2008). Identification of Africanized honey bees through wing morphometrics: two fast and efficient procedures. *Apidologie*, 39(5), 488-494. doi: 10.1051/apido:2008028
- FRANCOY, T., WITTMANN, D., STEINHAGE, V., DRAUSCHKE, M., MULLER, S., & CUNHA, D. et al. (2009). Morphometric and genetic changes in a population of *Apis*

- mellifera* after 34 years of Africanization. *Genetics And Molecular Research*, 8(2), 709-717. doi: 10.4238/vol8-2kerr019
- FRIEDLI, A., WILLIAMS, G., BRUCKNER, S., NEUMANN, P., & STRAUB, L. (2019). The weakest link: Haploid honey bees are more susceptible to neonicotinoid insecticides. *Chemosphere*, 242, 125145. doi: 10.1016/j.chemosphere.2019.125145
- FUCHS, S., & MORITZ, R. (1999). Evolution of extreme polyandry in the honeybee *Apis mellifera* L. *Behavioral Ecology And Sociobiology*, 45(3-4), 269-275. doi: 10.1007/s002650050561
- GARNERY, L., CORNUET, J., & Solignac, M. (1992). Evolutionary history of the honey bee *Apis mellifera* inferred from mitochondrial DNA analysis. *Molecular Ecology*, 1(3), 145-154. doi: 10.1111/j.1365-294x.1992.tb00170.x
- GIDASZEWSKI, N., BAYLAC, M., & KLINGENBERG, C. (2009). Evolution of sexual dimorphism of wing shape in the *Drosophila melanogaster* subgroup. *BMC Evolutionary Biology*, 9(1), 110. doi: 10.1186/1471-2148-9-110
- GRUBER, K., SCHÖNING, C., OTTE, M., KINUTHIA, W., & HASSELMANN, M. (2013). Distinct subspecies or phenotypic plasticity? Genetic and morphological differentiation of mountain honey bees in East Africa. *Ecology And Evolution*, 3(10), 3204-3218. doi: 10.1002/ece3.711
- HAN, F., WALLBERG, A., & WEBSTER, M. (2012). From where did the Western honeybee (*Apis mellifera*) originate?. *Ecology And Evolution*, 2(8), 1949-1957. doi: 10.1002/ece3.312
- HOFFMANN, A., WOODS, R., COLLINS, E., WALLIN, K., WHITE, A., & MCKENZIE, J. (2005). Wing shape versus asymmetry as an indicator of changing environmental conditions in insects. *Australian Journal Of Entomology*, 44(3), 233-243. doi: 10.1111/j.1440-6055.2005.00469.x
- ILYASOV, R., KUTUEV, I., PETUKHOV, A., POSKRYAKOV, A., & NIKOLENKO, A. (2011). Phylogenetics relationships of dark European honeybees *Apis mellifera mellifera* L. from the Russian Ural and West European populations. *Journal Of Apicultural Science*, 55(1), 67-76.
- JAFFE, R., & MORITZ, R. (2009). Mating flights select for symmetry in honeybee drones (*Apis mellifera*). *Naturwissenschaften*, 97(3), 337-343. doi: 10.1007/s00114-009-0638-2
- KAISER-BUNBURY, C., MUFF, S., MEMMOTT, J., MÜLLER, C., & CAFLISCH, A. (2010). The robustness of pollination networks to the loss of species and interactions: a quantitative approach incorporating pollinator behaviour. *Ecology Letters*, 13(4), 442-452. doi: 10.1111/j.1461-0248.2009.01437.x
- KANDEMIR, İ., ÖZKAN, A., & FUCHS, S. (2011). Reevaluation of honeybee (*Apis mellifera*) microtaxonomy: a geometric morphometric approach. *Apidologie*, 42(5), 618-627. doi: 10.1007/s13592-011-0063-3

- KENDALL, D. (1977). The diffusion of shape. *Advances In Applied Probability*, 9(3), 428-430. doi: 10.2307/1426091
- KLINGENBERG, C. (2003). Quantitative genetics of geometric shape: heritability and the pitfalls of the univariate approach. *Evolution*, 57(1), 191-195. doi: 10.1111/j.0014-3820.2003.tb00230.x
- KLINGENBERG, C. (2013). Visualizations in geometric morphometrics: How to read and how to make graphs showing shape changes. *Hystrix*, 24, 15-24. doi: 10.4404/hystrix-24.1-7691
- KLINGENBERG, C. (2010). MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Molecular Ecology Resources*, 11(2), 353-357. doi: 10.1111/j.1755-0998.2010.02924.x
- KLINGENBERG, C., & GIDASZEWSKI, N. (2010). Testing and Quantifying Phylogenetic Signals and Homoplasy in Morphometric Data. *Systematic Biology*, 59(3), 245-261. doi: 10.1093/sysbio/syp106
- KLINGENBERG, C., BADYAEV, A., SOWRY, S., & BECKWITH, N. (2001). Inferring Developmental Modularity from Morphological Integration: Analysis of Individual Variation and Asymmetry in Bumblebee Wings. *The American Naturalist*, 157(1), 11-23. doi: 10.1086/317002
- KOVAROVIC, K., AIELLO, L., CARDINI, A., & LOCKWOOD, C. (2011). Discriminant function analyses in archaeology: are classification rates too good to be true?. *Journal Of Archaeological Science*, 38(11), 3006-3018. doi: 10.1016/j.jas.2011.06.028
- KRAUS, F., FRANCK, P., & VANDAME, R. (2007). Asymmetric introgression of African genes in honeybee populations (*Apis mellifera* L.) in Central Mexico. *Heredity*, 99(2), 233-240. doi: 10.1038/sj.hdy.6800988
- LACHENBRUCH, P. (1967). An Almost Unbiased Method of Obtaining Confidence Intervals for the Probability of Misclassification in Discriminant Analysis. *Biometrics*, 23(4), 639-645. doi: 10.2307/2528418
- LE CONTE, Y., & NAVAJAS, M. (2008). Climate change: impact on honey bee populations and diseases. *Revue Scientifique Et Technique-Office International Des Epizooties*, 27(2), 499-510.
- LECLERCQ, G., GENGLER, N., & FRANCIS, F. (2018). How human reshaped diversity in honey bees (*Apis mellifera* L.): a review. *Faunistic Entomology*, 71.
- LEINONEN, T., CANO, J., MÄKINEN, H., & MERILÄ, J. (2006). Contrasting patterns of body shape and neutral genetic divergence in marine and lake populations of three spine sticklebacks. *Journal Of Evolutionary Biology*, 19(6), 1803-1812. doi: 10.1111/j.1420-9101.2006.01182.x
- LEONARD, R., WAT, K., McARTHUR, C., & HOCHULI, D. (2018). Urbanisation and wing asymmetry in the western honey bee (*Apis mellifera*, Linnaeus 1758) at multiple scales. *Peerj*, 6, e5940. doi: 10.7717/peerj.5940

- LODESANI, M., & COSTA, C. (2003). Bee breeding and genetics in Europe. *Bee World*, 84(2), 69-85. doi: 10.1080/0005772x.2003.11099579
- MADDISON, W. (1991). Squared-Change Parsimony Reconstructions of Ancestral States for Continuous-Valued Characters on a Phylogenetic Tree. *Systematic Zoology*, 40(3), 304. doi: 10.2307/2992324
- MARCUS, L., ERIKA, H., & HUSSAM, Z. (2000). Application of landmark morphometrics to skulls representing the orders of living Mammals. *Hystrix*, 11, 27-47. doi: 10.4404/hystrix-11.1-4135
- MEIXNER, M., LETA, M., KOENIGER, N., & FUCHS, S. (2011). The honey bees of Ethiopia represent a new subspecies of *Apis mellifera*—*Apis mellifera simensis* n. ssp. *Apidologie*, 42(3), 425-437. doi: 10.1007/s13592-011-0007-y
- MEIXNER, M., PINTO, M., BOUGA, M., KRYGER, P., IVANOVA, E., & FUCHS, S. (2013). Standard methods for characterising subspecies and ecotypes of *Apis mellifera*. *Journal Of Apicultural Research*, 52(4), 1-28. doi: 10.3896/ibra.1.52.4.05
- MICHENER, C. (2000). *The bees of the world* (2nd ed.). Baltimore: Johns Hopkins University Press.
- MIGUEL, I., BAYLAC, M., IRIONDO, M., MANZANO, C., GARNERY, L., & ESTONBA, A. (2011). Both geometric morphometric and microsatellite data consistently support the differentiation of the *Apis mellifera* M evolutionary branch. *Apidologie*, 42(2), 150-161. doi: 10.1051/apido/2010048
- MIKHEYEV, A., TIN, M., ARORA, J., & SEELEY, T. (2015). Museum samples reveal rapid evolution by wild honey bees exposed to a novel parasite. *Nature Communications*, 6(1). doi: 10.1038/ncomms8991
- MITTERMEIER, R., TURNER, W., LARSEN, F., BROOKS, T., & GASCON, C. (2011). Global Biodiversity Conservation: The Critical Role of Hotspots. *Biodiversity Hotspots*, 3-22. doi: 10.1007/978-3-642-20992-5_1
- MØLLER, A. (1996). Sexual selection, viability selection, and developmental stability in the domestic *Flymusca domestica*. *Evolution*, 50(2), 746-752. doi: 10.1111/j.1558-5646.1996.tb03884.x
- MØLLER, A., & POMIANKOWSKI, A. (1993). Fluctuating asymmetry and sexual selection. *Genetica*, 89(1-3), 267-279. doi: 10.1007/bf02424520
- MØLLER, A., & SWADDLE, J. (2002). *Asymmetry, developmental stability and evolution*. Oxford: Oxford University Press.
- MONTEIRO, L., DINIZ-FILHO, J., REIS, S., & ARAÚJO, E. (2002). Geometric estimates of heritability in biological shape. *Evolution*, 56(3), 563-572. doi: 10.1111/j.0014-3820.2002.tb01367.x
- MORITZ, R., HÄRTEL, S., & NEUMANN, P. (2005). Global invasions of the western honeybee (*Apis mellifera*) and the consequences for biodiversity. *Écoscience*, 12(3), 289-301. doi: 10.2980/i1195-6860-12-3-289.1

- MUÑOZ, I., PINTO, M., & De la RUA, P. (2013). Temporal changes in mitochondrial diversity highlights contrasting population events in Macaronesian honey bees. *Apidologie*, *44*(3), 295-305. doi: 10.1007/s13592-012-0179-0
- MUÑOZ, I., PINTO, M., & De la RUA, P. (2014). Effects of queen importation on the genetic diversity of Macaronesian Island honey bee populations (*Apis mellifera* Linneaus 1758). *Journal Of Apicultural Research*, *53*(2), 296-302. doi: 10.3896/ibra.1.53.2.11
- MYERS, N., MITTERMEIER, R., MITTERMEIER, C., da FONSECA, G., & Kent, J. (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, *403*(6772), 853-858. doi: 10.1038/35002501
- NAWROCKA, A., KANDEMIR, İ., FUCHS, S., & TOFILSKI, A. (2017). Computer software for identification of honey bee subspecies and evolutionary lineages. *Apidologie*. doi: 10.1007/s13592-017-0538-y
- NEI, M. (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, *89*(3), 583–590.
- NUNES, L., ARAUJO, E., & MARCHINI, L. (2015). Fluctuating asymmetry in *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) as bioindicator of anthropogenic environments. *Revista De Biología Tropical*, *63*(3), 673-682.
- OLDROYD, B., CORNUET, J., ROWE, D., RINDERER, T., & CROZIER, R. (1995). Racial admixture of *Apis mellifera* in Tasmania, Australia: similarities and differences with natural hybrid zones in Europe. *Heredity*, *74*(3), 315-325. doi: 10.1038/hdy.1995.46
- OLEKSA, A., & TOFILSKI, A. (2015). Wing geometric morphometrics and microsatellite analysis provide similar discrimination of honey bee subspecies. *Apidologie*, *46*(1), 49-60. doi: 10.1007/s13592-014-0300-7
- PERRARD, A. (2012). Systématique et morphométrie géométrique : L'évolution de la nervation alaire au sein du genre *Vespa* (Hyménoptères : Vespidés). (Thèse de doctorat). Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris.
- PERRARD, A., BAYLAC, M., CARPENTER, J., & VILLEMANT, C. (2014). Evolution of wing shape in hornets: why is the wing venation efficient for species identification?. *Journal Of Evolutionary Biology*, *27*(12), 2665-2675. doi: 10.1111/jeb.12523
- PIRK, C., STRAUSS, U., YUSUF, A., DEMARES, F., & HUMAN, H. (2015). Honeybee health in Africa—a review. *Apidologie*, *47*(3), 276-300. doi: 10.1007/s13592-015-0406-6
- PITCHERS, W., POOL, J., & DWORKIN, I. (2012). Altitudinal clinal variation in wing size and shape in African *Drosophila melanogaster*: one cline or many?. *Evolution*, *67*(2), 438-452. doi: 10.1111/j.1558-5646.2012.01774.x
- PRETORIUS, E. (2005). Using geometric morphometrics to investigate wing dimorphism in males and females of Hymenoptera - a case study based on the genus *Tachysphex*

- Kohl (Hymenoptera: Sphecidae: Larrinae). *Australian Journal Of Entomology*, 44(2), 113-121. doi: 10.1111/j.1440-6055.2005.00464.x
- RADLOFF, S., HEPBURN, R., & BANGAY, L. (2003). Quantitative analysis of intracolony and intercolony morphometric variance in honeybees, *Apis mellifera* and *Apis cerana*. *Apidologie*, 34(4), 339-351. doi: 10.1051/apido:2003034
- RALALAHARISOA-RAMAMONJISOA, Z., RALIMANANAI, H., & LOBREAU-CALLEN, D. (1996). Comportement de butinage d'*Apis mellifera* var *unicolor* (Hymenoptera, Apidae) dans divers biotopes. Biogéographie de Madagascar. *ORSTOM*, 517-522.
- RASOLOARIJAO, T., RAMAVOVOLOLONA, P., RAMAMONJISOA, R., CLEMENCET, J., LEBRETON, G., & DELATTE, H. (2018). Pollen morphology of melliferous plants for *Apis mellifera unicolor* in the tropical rainforest of Ranomafana National Park, Madagascar. *Palynology*, 43(2), 292-320. doi: 10.1080/01916122.2018.1443980
- RASOLOFOARIVAO, H. (2014). *Apis mellifera unicolor* (Latreille 1804, Hymenoptera Apidae) et *Varroa destructor* (Anderson and Trueman, 2000, Acari : Varroidae) à Madagascar : diversité génétique, impact et comportement hygiénique. (Thèse de doctorat). Université de La Réunion, Saint Denis
- RASOLOFOARIVAO, H., CLEMENCET, J., RAVAOMANARIVO, L., RAZAFINDRAZAKA, D., REYNAUD, B., & DELATTE, H. (2013). Spread and strain determination of *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) in Madagascar since its first report in 2010. *Experimental And Applied Acarology*, 60(4), 521-530. doi: 10.1007/s10493-013-9658-x
- RASOLOFOARIVAO, H., CLEMENCET, J., TECHER, M., RAVAOMANARIVO, L., REYNAUD, B., & DELATTE, H. (2015). Genetic diversity of the endemic honeybee: *Apis mellifera unicolor* (Hymenoptera: Apidae) in Madagascar. *Apidologie*, 46(6), 735-747. doi: 10.1007/s13592-015-0362-1
- RINDERER, T., SYLVESTER, H., BROWN, M., VILLA, J., PESANTE, D., & COLLINS, A. et al. (1986). Field and simplified techniques for identifying Africanized and European honey bees. *Apidologie*, 17(1), 33-48. doi: 10.1051/apido:19860104
- ROHLF, F. (1999). Shape Statistics: Procrustes Superimpositions and Tangent Spaces. *Journal Of Classification*, 16(2), 197-223. doi: 10.1007/s003579900054
- ROHLF, F., & SLICE, D. (1990). Extensions of the Procrustes Method for the Optimal Superimposition of Landmarks. *Systematic Zoology*, 39(1), 40. doi: 10.2307/2992207
- RUTTNER, F. (1988). *Biogeography and taxonomy of honeybees*. Berlin: Springer-Verlag.
- RUTTNER, F., TASSENCOURT, L., & LOUVEAUX, J. (1978). Biometrical-Statistical Analysis Of The Geographic Variability Of *Apis Mellifera* L. I. Material and Methods. *Apidologie*, 9(4), 363-381. doi: 10.1051/apido:19780408

- SAMEJIMA, Y., & TSUBAKI, Y. (2009). Body temperature and body size affect flight performance in a damselfly. *Behavioral Ecology And Sociobiology*, 64(4), 685-692. doi: 10.1007/s00265-009-0886-3
- SCHNEIDER, C., RASBAND, W., & ELICEIRI, K. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 671-675. doi: 10.1038/nmeth.2089
- SCHNEIDER, S., DE GRANDI-HOFFMAN, G., & SMITH, D. (2004). The African Honeybee: Factors Contributing to a Successful Biological Invasion. *Annual Review Of Entomology*, 49(1), 351-376. doi: 10.1146/annurev.ento.49.061802.123359
- SCHNEIDER, S., LEAMY, L., LEWIS, L., & DeGRANDI-HOFFMAN, G. (2003). The influence of hybridization between African and European honeybees, *Apis mellifera*, on asymmetries in wing size and shape. *Evolution*, 57(10), 2350. doi: 10.1554/02-609
- SHAIBI, T., & MORITZ, R. (2010). 10,000 years in isolation? Honeybees (*Apis mellifera*) in Saharan oases. *Conservation Genetics*, 11(5), 2085-2089. doi: 10.1007/s10592-010-0088-6
- SHEPPARD, W., & MEIXNER, M. (2003). *Apis mellifera pomonella*, a new honey bee subspecies from Central Asia. *Apidologie*, 34(4), 367-375. doi: 10.1051/apido:2003037
- SLICE, D. (2001). Landmark Coordinates Aligned by Procrustes Analysis Do Not Lie in Kendall's Shape Space. *Systematic Biology*, 50(1), 141-149. doi: 10.1080/10635150119110
- SMITH, D., CRESPI, B., & BOOKSTEIN, F. (1997). Fluctuating asymmetry in the honey bee, *Apis mellifera*: effects of ploidy and hybridization. *Journal Of Evolutionary Biology*, 10(4), 551-574. doi: 10.1046/j.1420-9101.1997.10040551.x
- SOUTHWICK, E., & SOUTHWICK, L. (1992). Estimating the Economic Value of Honey Bees (Hymenoptera: Apidae) as Agricultural Pollinators in the United States. *Journal Of Economic Entomology*, 85(3), 621-633. doi: 10.1093/jee/85.3.621
- STRANGE, J., GARNERY, L., & SHEPPARD, W. (2007). Persistence of the Landes ecotype of *Apis mellifera mellifera* in southwest France: confirmation of a locally adaptive annual brood cycle trait. *Apidologie*, 38(3), 259-267. doi: 10.1051/apido:2007012
- STRANGE, J., GARNERY, L., & SHEPPARD, W. (2008). Morphological and molecular characterization of the Landes honey bee (*Apis mellifera* L.) ecotype for genetic conservation. *Journal Of Insect Conservation*, 12(5), 527-537. doi: 10.1007/s10841-007-9093-6
- SU, J., GUAN, K., WANG, J., & YANG, Y. (2015). Significance of hind wing morphology in distinguishing genera and species of cantharid beetles with a geometric morphometric analysis. *Zookeys*, 502, 11-25. doi: 10.3897/zookeys.502.9191
- TAKEZAKI, N., & NEI, M. (1996). Genetic distances and reconstruction of phylogenetic trees from microsatellite DNA. *Genetics*, 144(1), 389-399.

- TARPY, D., & SEELEY, T. (2006). Lower disease infections in honeybee (*Apis mellifera*) colonies headed by polyandrous vs monandrous queens. *Naturwissenschaften*, 93(4), 195-199. doi: 10.1007/s00114-006-0091-4
- TARPY, D., CAREN, J., DELANEY, D., SAMMATARO, D., FINLEY, J., LOPER, G., & DeGRANDI-HOFFMAN, G. (2010). Mating frequencies of Africanized honey bees in the south western USA. *Journal Of Apicultural Research*, 49(4), 302-310. doi: 10.3896/ibra.1.49.4.02
- TECHER, M. (2015). Diversité génétique et phylogéographie de l'abeille *Apis mellifera* dans les îles du Sud-Ouest de l'Océan Indien. (Thèse de doctorat). Université de La Réunion, Sainte Clotilde
- TECHER, M., CLEMENCET, J., SIMIAND, C., PORTLOUIS, G., REYNAUD, B., & DELATTE, H. (2016). Genetic diversity of the honeybee (*Apis mellifera* L.) populations in the Seychelles archipelago. *Insect Conservation And Diversity*, 9(1), 13-26. doi: 10.1111/icad.12138
- TECHER, M., CLEMENCET, J., SIMIAND, C., PREEADUTH, S., AZALI, H., REYNAUD, B., DELATTE, H. (2017a). Large-scale mitochondrial DNA analysis of native honey bee *Apis mellifera* populations reveals a new African subgroup private to the South West Indian Ocean islands. *BMC Genetics*, 18(1). doi: 10.1186/s12863-017-0520-8
- TECHER, M., CLEMENCET, J., SIMIAND, C., TURPIN, P., GARNERY, L., REYNAUD, B., & DELATTE, H. (2017b). Genetic diversity and differentiation among insular honey bee populations in the southwest Indian Ocean likely reflect old geographical isolation and modern introductions. *PLOS ONE*, 12(12), e0189234. doi: 10.1371/journal.pone.0189234
- TECHER, M., CLEMENCET, J., TURPIN, P., VOLBERT, N., REYNAUD, B., & DELATTE, H. (2015). Genetic characterization of the honeybee (*Apis mellifera*) population of Rodrigues Island, based on microsatellite and mitochondrial DNA. *Apidologie*, 46(4), 445-454. doi: 10.1007/s13592-014-0335-9
- TOFILSKI, A. (2004). DrawWing, a program for numerical description of insect wings. *Journal Of Insect Science*, 4(1). doi: 10.1093/jis/4.1.17
- TOFILSKI, A. (2008). Using geometric morphometrics and standard morphometry to discriminate three honeybee subspecies. *Apidologie*, 39(5), 558-563. doi: 10.1051/apido:2008037
- TOULLEC, A. (2019). Abeille noire, *Apis mellifera mellifera*, Historique et Sauvegarde. Ph D. *Ecole Nationale Vétérinaire D'alfort*.
- VILLEMANT, C., SIMBOLOTTI, G., & KENIS, M. (2007). Discrimination of Eubazus (Hymenoptera, Braconidae) sibling species using geometric morphometrics analysis of wing venation. *Systematic Entomology*, 32(4), 625-634. doi: 10.1111/j.1365-3113.2007.00389.x

- WALLBERG, A., HAN, F., WELLHAGEN, G., DAHLE, B., KAWATA, M., & HADDAD, N. et al. (2014). A worldwide survey of genome sequence variation provides insight into the evolutionary history of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature Genetics*, *46*(10), 1081-1088. doi: 10.1038/ng.3077
- WEBSTER, M., & SHEETS, H. (2010). A Practical Introduction to Landmark-Based Geometric Morphometrics. *The Paleontological Society Papers*, *16*, 163-188. doi: 10.1017/s1089332600001868
- WHITFIELD, C., BEHURA, S., BERLOCHER, S., CLARK, A., JOHNSTON, J., & SHEPPARD, W. et al. (2006). Thrice Out of Africa: Ancient and Recent Expansions of the Honey Bee, *Apis mellifera*. *Science*, *314*(5799), 642-645. doi: 10.1126/science.1132772
- WRAGG, D., TECHER, M., CANALE-TABET, K., BASSO, B., BIDANEL, J., & LABARTHE, E. et al. (2017). Autosomal and Mitochondrial Adaptation Following Admixture: A Case Study on the Honeybees of Reunion Island. *Genome Biology And Evolution*, *10*(1), 220-238. doi: 10.1093/gbe/evx247
- ZELDITCH, M., SWIDERSKI, D., & SHEETS, H. (2004). *Geometric morphometrics for biologists [recurso electrónico]* (2nd ed.). Paisés Bajos: Elsevier Academic Press.

ANNEXE 1

Table SIII.1. Synthèse des échantillons utilisés dans le Chapitre 2. La taille des échantillons est indiquée, ainsi que leur origine géographique, évolutive (lignées Africaine A ou Européennes C et M) et les sous-espèces auxquelles elles sont apparentées.

	Lignée évolutive	Sous-espèce	code	n	année	source
SOOI						
Madagascar	A _{SOOI}	<i>A. m. unicolor</i>		243	2011-2013	c
Mascareignes						
La Réunion	A _{SOOI} + C + M	<i>A. m. unicolor</i> *		186	2011-2012	e
Maurice	A _{SOOI} + C + M	<i>A. m. unicolor</i> *		323	2012	e
Rodrigues	C	<i>A. m. carnica/ligustica</i> *		149	2013	a
Seychelles						
Mahé	A _{SOOI}	<i>A. m. unicolor</i> *		70	2013	d
Praslin	A _{SOOI}	<i>A. m. unicolor</i> *		71	2013	d
La Digue	A _{SOOI}	<i>A. m. unicolor</i> *		41	2013	d
Comores						
Grande Comore	A _{SOOI}	<i>A. m. unicolor</i>		27	2014	e
Anjouan	A _{SOOI}	<i>A. m. unicolor</i>		42	2014	e
Mohéli	A _{SOOI}	<i>A. m. unicolor</i>		12	2014	e
AFRIQUE						
Sénégal	A	<i>A. m. scutellata</i>	SEN	6	2015	e
Tchad	A	<i>A. m. scutellata</i>	TCH	10	2015	e
Centrafrique	A	<i>A. m. scutellata</i>	CAF	18	2013	e
Gabon	A	<i>A. m. scutellata</i>	GAB	27	2014	e
Tanzanie	A	<i>A. m. adansonii</i>	TAN	9	2015	e
Malawi	A	<i>A. m. adansonii</i>	MWI	12	1995	b
Zimbabwe	A	<i>A. m. adansonii</i>	ZIM	10	1995	b
Afrique du Sud	A	<i>A. m. scutellata/capensis</i> ?	AFS	11	2013	e
EUROPE						
Allemagne	C	<i>A. m. carnica</i>	ALL	9	1998	b
Italie	C	<i>A. m. ligustica</i>	ITA	14	1997	b
Grèce	C	<i>A. m. macedonica</i> ?	GRE	19	2015	e
France (1)	C	<i>A. m. carnica</i>	FR1	20	2013	e
France (2)	M	<i>A. m. mellifera</i>	FR2	20	2013	e
France (3)	M	<i>A. m. mellifera</i>	FR3	14	2013	e
Portugal	M	<i>A. m. iberiensis</i>	POR	8	2013	e
Espagne	M	<i>A. m. iberiensis</i>	ESP	3	2013	e
TOTAL				1374		

(*) : Populations hybridées du fait d'importations humaines. La sous-espèce indiquée est celle supposée dominer dans la population.

a : Techer *et al.* (2015) / b : Franck (1999) / c : Rasolofoarivao *et al.* (2015) / d : from Techer *et al.* (2016) ; e : Techer (2015).

ANNEXE 2 – CURRICULUM VITAE

GALATAUD Julien

12/10/1989

244 TER Route des Vacoas

97425 Les Avirons

Tèl : 06.92.05.16.51

Mail : galataud.julien@hotmail.com

FORMATIONS ACADEMIQUES

2016 – 2019

Doctorat de Biologie des Populations et Ecologie

UMR PVBMT – Peuplements Végétaux et Bioagresseurs en Milieu Tropical
Université de La Réunion, CIRAD

Directeur de thèse : **Bernard REYNAUD** (Professeur, Université de La Réunion)

Co-encadrantes : **Johanna CLEMENCET** (Maître de Conférences, Université de La Réunion) et **Hélène DELATTE** (Chercheur HDR, CIRAD, La Réunion)

Soutenance : 19 Décembre 2019

Rapporteurs : **Nicolas BLOT** (Maître de Conférence HDR, Université de Clermont Auvergne) et **Alain RATNADASS** (Chercheur HDR, CIRAD, Unité HortSys)

Directeur du jury : **Stéphane POUSSIER** (Professeur, Université de La Réunion)

2015 – 2016

Master 2 Biodiversité et Ecosystèmes Tropicaux (BEST)

1^{er} du classement, mention Bien

Université de La Réunion

2014 – 2015

Master 1 Biodiversité et Ecosystèmes Tropicaux (BEST)

2^{ème} du Classement , mention Bien

Université de La Réunion

2012 – 2013

Maîtrise Ecosciences, Microbiologie spécialité Ecologie

Université Claude-Bernard Lyon 1

2009 – 2012

Licence de Biologie des Organismes et des Populations

Université Claude-Bernard Lyon 1

2008 – 2009

Classe Préparatoire aux Grandes Ecoles (CPGE) filière BCPST 1^{ère} année

Lycée Champollion, Grenoble

2008

Terminale Scientifique, option SVT – Baccalauréat

Mention Assez Bien

Lycée Lalande, Bourg-en-Bresse

STAGES

2015

Stage de Master 2 BEST : « Caractérisation de la variabilité phénotypique d'*Apis mellifera* dans la zone Sud-Ouest de l'Océan Indien : la variation du

patron de nervation alaire reflète-t-elle la structuration génétiques des populations insulaires d'*Apis mellifera* ? »

UMR PVBMT, Dr. H elenne Delatte et Dr. Johanna Clémencet

2015 **Stage de Master 1 BEST : « Morphométrie de la nervation alaire : un outil efficace pour identifier les différentes lignées génétiques et sous-espèces d'*Apis mellifera* présentes dans les îles du Sud-Ouest de l'Océan Indien »**

UMR PVBMT, Dr. Johanna Clémencet et Dr. Ma eva Techer

2014 **Stage volontaire de 3 mois : Suivi de la nidification chez deux espèces de mésanges (*Cyanistes caeruleus* et *Parus major*) dans les Pyrénées ari egoises**
Etude visant à déterminer les patterns complexes de sélection sur différents types de traits (morphologiques, traits d'histoire de vie, traits sexuels secondaires), et leurs variations en fonction de pressions locales, à court et long terme.

Station d'Ecologie Expérimentale du CNRS à Moulis, USR CNRS 2936, Dr. Alexis Chaine

2013 **Stage de Licence BOP : Suivi démographique d'une population de Tritons crêtés (*Triturus cristatus*)**

Laboratoire d'Ecologie des Hydrosystèmes Naturels et Anthropis es, Lyon, UMR 5023, Dr. Pierre Joly

COMMUNICATIONS

CONGRES

Galataud J.*, Delatte H., Esnault O., Simiand C., Reynaud B., Clémencet J. 2019. Geographic variation in polyandry of the honeybee, *Apis mellifera*, in the South-West Indian Ocean (Madagascar, Comoros and Mascarenes). Présentation orale effectuée par*

Island Biology, Saint-Denis, La Réunion, France

Galataud J.*, Delatte H., Bernet C., Techer M., Reynaud B., Clémencet J. 2018. Overview of the South-West Indian Ocean honeybee: combining morphometry and genetics to investigate the original diversity of *Apis mellifera* in Madagascar and surrounding archipelagos. Présentation orale effectuée par *

EurBee 8 Congress of Apidology, Ghent, Belgium

Galataud J.*, Delatte H., Techer M., Reynaud B., Clémencet J. 2018. The influence of recent introgressive hybridization between African and European imported honeybees on wing size and shape variability in a tropical island environment: the case of *Apis mellifera* L. in Mauritius (Southwestern Indian Ocean). Présentation orale effectuée par *

10^{ème} Symposium national de Morphométrie et Evolution des Formes (SMEF), Bordeaux, France

Galataud J., Delatte H., Techer M., Rouse P., Damour A., Sujeeun L., Reynaud B., Clémencet J*. 2016. Morphometric differences between insular *A. mellifera* populations of the South-West Indian Ocean in relation with genetics: which part of selection, drift or plasticity? Poster pr esent e par *

EurBee 7 Congress of Apidology, Cluj-Napoca, Romania

Galataud J.*, Delatte H., Techer M. A., Rouse P., Reynaud B., Clémencet J. 2016. Divergences morphologiques entre populations d'*Apis mellifera* dans le Sud Ouest de l'Océan Indien ? Présentation orale effectuée par *

9^{ème} Symposium national de Morphométrie et Evolution des Formes (SMEF), Paris, France

RESTITUTIONS LOCALES

Galataud J. 2018. Divergences morphologiques entre populations d'abeilles des îles du Sud-Ouest de l'océan Indien ?

Réunion des Apiculteurs, Saint-Pierre, La Réunion, France

Galataud J. 2017. Microévolution des populations d'*Apis mellifera* dans les îles de l'Océan Indien.

Séminaire Scientifique BioEcoTrop, Saint-Denis, La Réunion, France

PUBLICATIONS

Galataud J., Delatte H., Techer M., Simiand C., Sookar P., Reynaud B., Clémencet J. 2019. When European meets African honeybees (*Apis mellifera* L.) in the tropics: morphological changes related to genetics in Mauritius Island (South-West Indian Ocean). PLOS ONE. *Article soumis pour publication.*

ENCADREMENTS

2019 **Gaëlle ANTOINE, Stage de Master 2 BEST-T, Université de La Réunion**
Héritabilité de traits morphologiques chez l'abeille (*Apis mellifera unicolor*)
Co-encadré avec Hélène JOURDAN et Johanna CLEMENCET

2018 **Chloé BERNET, Stage de Master 2 BEST-T, Université de La Réunion**
Divergences morphologiques entre populations d'abeilles des îles du Sud-Ouest de l'Océan Indien ? Caractérisation de la variabilité et distribution de la taille du proboscis
Co-encadré avec Hélène DELATTE et Johanna CLEMENCET

COMPETENCES

Formation aux techniques de **Biologie moléculaire** : extraction et amplification d'ADN, génotypage
Logiciels de **Morphométrie** : MorphoJ, ImageJ, ApiClass, R : geomorph, Morpho
Logiciels de **Génétique** : Peak Scanner, GeneMapper, R : ade4, adegenet

ENSEIGNEMENTS

Licence 2 Biologie:

Ecologie Végétale (sorties terrain) – 18h

Licence 3 Biologie des Organismes et des Populations :

Systématique des Arthropodes – 12h / 16h

Evolution des hominidés – 20h / 24h / 24h

Ecologie terrestre (sorties terrain) – 16h / 16h

LETTRE D'ENGAGEMENT DE NON-PLAGIAT

Je, soussigné(e) _____ en ma qualité de doctorant(e) de l'Université de La Réunion, déclare être conscient(e) que le plagiat est un acte délictueux passible de sanctions disciplinaires. Aussi, dans le respect de la propriété intellectuelle et du droit d'auteur, je m'engage à systématiquement citer mes sources, quelle qu'en soit la forme (textes, images, audiovisuel, internet), dans le cadre de la rédaction de ma thèse et de toute autre production scientifique, sachant que l'établissement est susceptible de soumettre le texte de ma thèse à un logiciel anti-plagiat.

Fait à Saint-Denis le :

Signature :



Extrait du Règlement intérieur de l'Université de La Réunion
(validé par le Conseil d'Administration en date du 11 décembre 2014)

Article 9. Protection de la propriété intellectuelle – Faux et usage de faux, contrefaçon, plagiat

L'utilisation des ressources informatiques de l'Université implique le respect de ses droits de propriété intellectuelle ainsi que ceux de ses partenaires et plus généralement, de tous tiers titulaires de ces droits.

En conséquence, chaque utilisateur doit :

- utiliser les logiciels dans les conditions de licences souscrites ;
- ne pas reproduire, copier, diffuser, modifier ou utiliser des logiciels, bases de données, pages Web, textes, images, photographies ou autres créations protégées par le droit d'auteur ou un droit privatif, sans avoir obtenu préalablement l'autorisation des titulaires de ces droits.

La contrefaçon et le faux

Conformément aux dispositions du code de la propriété intellectuelle, toute représentation ou reproduction intégrale ou partielle d'une œuvre de l'esprit faite sans le consentement de son auteur est illicite et constitue un délit pénal.

L'article 444-1 du code pénal dispose : « Constitue un faux toute altération frauduleuse de la vérité, de nature à causer un préjudice et accomplie par quelque moyen que ce soit, dans un écrit ou tout autre support d'expression de la pensée qui a pour objet ou qui peut avoir pour effet d'établir la preuve d'un droit ou d'un fait ayant des conséquences juridiques ».

L'article L335_3 du code de la propriété intellectuelle précise que : « Est également un délit de contrefaçon toute reproduction, représentation ou diffusion, par quelque moyen que ce soit, d'une œuvre de l'esprit en violation des droits de l'auteur, tels qu'ils sont définis et réglementés par la loi. Est également un délit de contrefaçon la violation de l'un des droits de l'auteur d'un logiciel (...) ».

Le plagiat est constitué par la copie, totale ou partielle d'un travail réalisé par autrui, lorsque la source empruntée n'est pas citée, quel que soit le moyen utilisé. Le plagiat constitue une violation du droit d'auteur (au sens des articles L 335-2 et L 335-3 du code de la propriété intellectuelle). Il peut être assimilé à un délit de contrefaçon. C'est aussi une faute disciplinaire, susceptible d'entraîner une sanction.

Les sources et les références utilisées dans le cadre des travaux (préparations, devoirs, mémoires, thèses, rapports de stage...) doivent être clairement citées. Des citations intégrales peuvent figurer dans les documents rendus, si elles sont assorties de leur référence (nom d'auteur, publication, date, éditeur...) et identifiées comme telles par des guillemets ou des italiques.

Les délits de contrefaçon, de plagiat et d'usage de faux peuvent donner lieu à une sanction disciplinaire indépendante de la mise en œuvre de poursuites pénales.