



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE
جامعة باجي مختار عنابة
UNIVERSITE BADJI MOKHTAR-ANNABA



FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE
LABORATOIRE DE BIOLOGIE ANIMALE APPLIQUEE

THESE

Présentée En Vue de l'Obtention du Diplôme de Doctorat En
Physiotoxicologie Animale

Intitulé

Biodiversité des Abeilles domestiques *Apis mellifera* dans la région de Jijel et impact

Présentée par: M^{lle} Houda BOUZERAA

M. DAAS. T	Pr.	Président	Université B. M-Annaba
M. ACHOU. M	Pr.	Directeur de thèse	Université B. M-Annaba
M ^{me} . AYAD-LOUCIF. W	Pr.	Examinatrice	Université B. M-Annaba
M. HOUHAMDI. M	Pr.	Examinateur	Université 8 Mai 1945-Guelma
M ^{me} . HAMAIDIA. K	MCA	Examinatrice	Université de Souk-Ahras

Année Universitaire: 2020-2021

Remerciements

Au terme de ce travail, je tiens en premier lieu à exprimer mes remerciements à Allah le tout puissant pour la volonté, la santé, le courage et la patience qu'il m'a donné durant toutes ces années.

Je suis très honorée que M. Tarek DAAS, Professeur au Département de Biologie, Université d'Annaba, ait accepté de présider ce jury. Je vous exprime toute ma gratitude.

C'est un devoir d'exprimer toute ma gratitude et une infinie reconnaissance à M. Mohamed ACHOU, Professeur au Département de Biologie, Université d'Annaba, pour m'avoir dirigé et orienté dans la réalisation de cette thèse.

Toute ma considération à l'égard de M^{me} Wahida AYAD-LOUCIF, Professeur au Département de Biologie, Université d'Annaba, d'avoir accepté de faire partie de ce jury et d'examiner ce travail.

Mes profonds remerciements vont également à M. Moussa HOUHAMDIA, Professeur à l'Université 8 mai 1945 de Guelma, qui a bien voulu accepter de faire partie de ce jury.

Je remercie également M^{me} Kaouther HAMADIA, Maître de Conférences au Département de Biologie, Université de Souk -Ahras, d'avoir accepté de faire partie de ce jury et d'examiner ce travail.

Je remercie profondément M. Noureddine SOLTANI, Professeur au Département de Biologie et Directeur du Laboratoire de Biologie Animale Appliquée à l'Université d'Annaba, de m'avoir accueilli et permis de réaliser ce travail dans son Laboratoire.

Je témoigne également ma gratitude à M. Radhouane GDOURA, Professeur à la Faculté des Sciences et Directeur de l'Unité de Recherche Toxicologie Microbiologie Environnementale et Santé, Sfax -Tunisie, pour sa générosité et la confiance qu'il m'a accordée en m'accueillant au sein de son laboratoire.

J'adresse également mes sincères remerciements à M^{me} Dalila LADJAMA, Ingénieur de Laboratoire de Biologie Animale Appliquée, Université d'Annaba. Elle m'a toujours facilité la tâche lors de mes dosages au laboratoire, je la remercie chaleureusement.

Je remercie infiniment M^{me} Hanen SELAMI Maître assistante au Centre de Recherche et des Technologies des Eaux (CERTÉ) -Tunisie, pour leur serviabilité et leur aide précieuse durant toute la période de mon stage à la Faculté des Sciences de Sfax -Tunisie- et après.

Un grand merci à M. Abed elkhalek, Apiculteur, pour ses explications techniques et son aide précieuse et généreuse au rucher.

Je ne peux qu'exprimer mes sentiments d'amitié à M^{me} Hamida BENRADIA et M^{me} Jihen BAKLI, Docteurs en Biologie Animale Environnementale qui m'ont soutenu et aidé le long de ce travail. Je dirai tous simplement mille mercis.

Enfin, j'exprime mes plus vifs remerciements à toutes les personnes qui ont contribué à la réalisation de cette thèse.

DÉDICACES

*Je dédie cette thèse à **ma mère**, qui aurait été certainement la plus heureuse en ce moment exceptionnel de ma vie. Malheureusement le seigneur l'a rappelé plus tôt. Où que tu sois, dans les cieux, je te dis infiniment merci, pour tout ce que tu as fait pour moi.*

*A mon père **Mahmoud** qui est fortement participé à ma réussite. Que dieu le préserve et lui accorde santé et bonheur. Qu'il trouve dans cette thèse le fruit de mes années d'études, le témoignage de ma reconnaissance et mon amour éternel.*

Avec tout mon amour, et toute ma reconnaissance

*A mes frères: **Fethi** et **Mohamed**.*

*A mes sœurs adorées: **Aïda** et **Sana**.*

*A mes petites princesses: **Chaïma** et **Jana**.*

A toute ma famille.

A tous ceux que j'aime et qui m'aiment

Sommaire

1. Introduction	01
2. Matériel et méthodes	06
2.1. Présentation du matériel biologique.....	06
2.2. Morphologie et anatomie d'une Abeille.....	07
2.2.1. La tête.....	07
2.2.2. Le thorax.....	08
2.2.3. L'abdomen.....	08
2.3. Organisation sociale de la colonie d'Abeille.....	09
2.3.1. La reine.....	10
2.3.2. Les ouvrières.....	10
2.3.3. Les faux bourdons.....	11
2.4. Détermination des castes.....	11
2.5. Cycle de vie de l'Abeille domestique.....	12
2.5.1. Le stade œuf.....	13
2.5.2. Le stade larvaire.....	13
2.5.3. Le stade nymphal et imago.....	13
2.6. Présentation du site d'échantillonnage.....	14
2.7. Stratégie d'échantillonnage et collecte des données.....	16
2.8. Etude biométrique.....	17
2.8.1. Choix de la caste en biométrie.....	17
2.8.2. Caractères morphologiques choisis en biométrie.....	17
2.8.3. Méthode de mensuration.....	21
2.9. Analyse moléculaire.....	22
2.9.1. Extraction des ADN totaux.....	22
2.9.2. Evaluation de la diversité mitochondriale.....	23
• ADN mitochondrial (ADNmt).....	23
• Description de la région intergénique COI-COII (cytochrome oxydase I et II)...	24
• Amplification de l'ADN.....	25
• Détection du polymorphisme de la longueur du fragment de restriction.....	26
• Détermination des haplotypes.....	27
2.10. Dosage des biomarqueurs.....	27

2.10.1. Glutathion S-transférase (GST).....	27
2.10.2. Dosage de l'acétylcholinestérase (AChE).....	28
2.10.3. Dosage des protéines.....	29
2.11. Analyses statistiques.....	29
2.11.1. Morphométrie.....	29
2.11.1.1. Analyses statistiques univariées.....	29
• Description des données.....	29
• Comparaison des moyennes entre sites: Analyse de la variance (ANOVA).....	30
2.11.1.2. Analyses statistiques bivariées.....	30
• Corrélation entre caractéristique morphométriques.....	30
2.11.1.3. Analyses statistiques multivariées.....	30
• Comparaison des vecteurs de moyennes entre sites : Analyse de la variance multivariée (MANOVA).....	30
• Analyse en composantes principales (ACP).....	31
2.11.2. Biomarqueurs.....	31
3. Résultats	32
3.1. Biométrie de l'Abeille.....	32
3.1.1. Analyse univariée.....	32
• Caractérisation morphologique des populations d'Abeilles Algériennes.....	32
• Comparaison entre sites des caractéristiques moyennes: Analyse de la variance (ANOVA).....	36
3.1.2. Corrélation simple.....	37
3.1.3. Analyse multivariée.....	38
• Analyse de la variance multivariée (MANOVA).....	38
• Analyse en composantes principales.....	39
3.2. Génétique de l'Abeille.....	42
3.2.1. ADN mitochondrial.....	42
• Les profils de restriction de l'étude.....	42
3.3. Détermination de l'activité enzymatique chez <i>A. mellifera</i>	44
3.3.1. Activité spécifique de la glutathion S-transférase.....	44
3.3.2. Activité spécifique de l'acétylcholinestérase.....	48
4. Discussion	53
4.1. Biométrie.....	53

4.2. Caractérisation de la diversité génétique des populations d'Abeille d'Algérie...	55
4.2.1. Polymorphisme de l'ADN mitochondrial.....	55
4.2.2. Structure mitochondriale des populations d'Abeilles d'Algérie.....	56
4.3. Détermination de l'activité enzymatique chez <i>A. mellifera</i>	57
4.3.1. Activité spécifique de la glutathion S-transférase.....	57
4.3.2. Activité spécifique de l'acétylcholinestérase.....	59
5. Conclusion et perspectives.....	62
6. Résumés.....	64
7. Références bibliographiques.....	67

Annexes

Liste des figures

N°	Titre	Page
Figure 1	Photographie d' <i>A. mellifera</i> (Linnaeus, 1758) (Photo personnelle)	7
Figure 2	Carte de l'aire de répartition naturelle des neuf espèces d'Abeilles du genre <i>Apis</i> dans le monde (Le conte & Franck, 2005).	7
Figure 3	Morphologie externe de l'Abeille femelle adulte (A) (<u>Morphologie de l'abeille : abeilletpe-Wix.com</u>). Anatomie interne de l'Abeille femelle adulte (B) (Les animaux ont-ils un cœur, un cerveau ? Sciences Heembeek).	9
Figure 4	Les trois castes d'une colonie d'Abeille (Photo personnelle).	10
Figure 5	Différenciation des œufs pondus par la reine (Photo personnelle).	12
Figure 6	Stades de développement de l'Abeille: de l'œuf à l'adulte (Vie de l'abeille : <u>Apis Bruoc Sella</u>).	12
Figure 7	Cycle évolutif des trois castes d'Abeille domestique <i>A. mellifera</i> (Le Conte, 2002).	14
Figure 8	Localisation géographique de site d'échantillonnage.	15
Figure 9	Emplacement du rucher (Photo personnelle).	17
Figure 10	Langue d'une Abeille ouvrière (Ruttner <i>et al.</i> , 1978 ; Ruttner, 1988). ([1] : Longueur de la langue).	19
Figure 11	Aile antérieure droite d'une Abeille ouvrière (Ruttner <i>et al.</i> , 1978 ; Ruttner, 1988). ([2] : Longueur de l'aile antérieure ; [3] : largeur de l'aile antérieure).	20
Figure 12	Aile postérieure d'une Abeille ouvrière (Ruttner <i>et al.</i> , 1978 ; Ruttner, 1988). ([4] : Longueur de l'aile postérieure ; [5] : largeur de l'aile postérieure).	20
Figure 13	Composantes de l'indice cubital de l'aile antérieure droite (Ruttner <i>et al.</i> , 1978; Ruttner, 1988). ([6] : Longueur de la nervure A ; [7] : longueur de la nervure B).	20
Figure 14	Patte postérieure d'une Abeille ouvrière (Ruttner <i>et al.</i> , 1978; Ruttner, 1988). ([9]: Longueur du fémur ; [10]: longueur du tibia ; [11]: longueur du métatarse ; [12] : largeur du métatarse).	20
Figure 15	Coloration (Ruttner <i>et al.</i> , 1978; Ruttner , 1988). ([13] : largeur de la bande jaune au niveau du 2 ^{ème} tergite abdominal).	21

Figure 16	Première sternite d'une Abeille ouvrière (Ruttner <i>et al.</i> , 1978; Ruttner, 1988). ([14] : Longueur du 1 ^{ère} sternite).	21
Figure 17	Troisième sternite d'une Abeille ouvrière (Ruttner <i>et al.</i> , 1978; Ruttner, 1988). ([14] : Longueur du 3 ^{ème} sternite).	21
Figure 18	Position de L'ADN mitochondrial au sein de la mitochondrie (François & Roland, 1997).	23
Figure 19	Les régions COI-COII des lignées A, M et C d' <i>A. mellifera</i> (Garnery <i>et al.</i> , 1993).	24
Figure 20	Localisation des amorces E2 et H2 sur la région mitochondriale COI-COII (Garnery <i>et al.</i> , 1992).	25
Figure 21	Diagramme en cône des composantes principales et leurs valeurs propres.	40
Figure 22	Représentation graphique des corrélations des 15 variables initiales sur le plan composé des axes 1 et 2 de l'ACP.	42
Figure 23	Représentation schématique des profils moyens du gel d'agarose.	43
Figure 24	Visualisation de différentes tailles du fragment COI-COII sur gel d'agarose [Marqueur d'échelle d'ADN M7123-100] Tah1-Tah10: site 1 (El-Taher); Anc1-Anc10: site 2 (El-Ancer); Zia1-Zia10: site 3 (Ziama mansouriah) (A): Avant digestion avec l'enzyme de restriction <i>Dra</i> I, (B): Après digestion avec l'enzyme de restriction <i>Dra</i> I.	44
Figure 25	Activité spécifique de la glutathion S-transférase ($\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines) au niveau de l'abdomen d' <i>A. mellifera</i> dans les trois sites de la wilaya de Jijel : durant la saison printanière (2015) ($m \pm \text{SD}$, $n = 4 - 6$).	45
Figure 26	Activité spécifique de la glutathion S-transférase ($\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines) au niveau de d' <i>A. mellifera</i> dans les trois sites de la wilaya de Jijel : durant la saison d'été (2015) ($m \pm \text{SD}$, $n = 4 - 6$).	46
Figure 27	Activité spécifique de la glutathion S-transférase ($\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines) dans l'abdomen d' <i>A. mellifera</i> dans les trois sites de la wilaya de Jijel : durant la saison d'automne (2015) ($m \pm \text{SD}$, $n = 4 - 6$).	47
Figure 28	Activité spécifique de la glutathion S-transférase ($\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines) au niveau de l'abdomen d' <i>A. mellifera</i> dans les trois sites de la wilaya de Jijel : durant la saison hivernale (2015) ($m \pm \text{SD}$, $n = 4 - 6$).	48

Figure 29	Activité spécifique de l'acétylcholinestérase (AChE) ($\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéine) au niveau de la tête d' <i>A. mellifera</i> dans les trois sites de la wilaya de Jijel : durant la saison printanière (2015) ($m \pm \text{SD}$, $n = 4 - 6$).	49
Figure 30	Activité spécifique de l'acétylcholinestérase (AChE) ($\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéine) au niveau de la tête d' <i>A. mellifera</i> dans les trois sites de la wilaya de Jijel : en été (2015) ($m \pm \text{SD}$, $n = 4 - 6$).	50
Figure 31	Activité spécifique de l'acétylcholinestérase (AChE) ($\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéine) au niveau de la tête d' <i>A. mellifera</i> dans les trois sites de la wilaya de Jijel : en automne (2015) ($m \pm \text{SD}$, $n = 4 - 6$).	51
Figure 32	Activité spécifique de l'acétylcholinestérase (AChE) ($\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéine) au niveau de la tête d' <i>A. mellifera</i> dans les trois sites de la wilaya de Jijel : durant la saison hivernale (2015) ($m \pm \text{SD}$, $n = 4 - 6$).	52
Figure 33	Schéma de conjugaison d'un substrat avec le glutathion réalisée par une GST.	58
Figure 34	Schéma de l'action d'un organophosphoré ou d'un carbamate sur le site actif de l'acétylcholinestérase (AChE).	60

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
Tableau 1	Position géographique des sites d'échantillonnage.	16
Tableau 2	Liste des caractères morphologiques étudiés et numéro des figures correspondantes.	19
Tableau 3	La quantité des produits utilisés dans chacune des polymérasés de la réaction en chaîne	25
Tableau 4	Dosage des protéines, réalisation de la gamme d'étalonnage.	29
Tableau 5	Paramètres statistiques des 15 caractères morphologiques pour l'ensemble des 3 sites.	35
Tableau 6	Comparaison intersites de moyennes relatives aux 15 variables biométriques des 3 sites d'échantillonnage (ANOVA)	36
Tableau 7	Liste des corrélations significatives, hautement et très hautement significatives des 3 sites.	38
Tableau 8	Comparaison entre sites, des vecteurs de moyennes des 15 variables morphométriques à l'aide de la MANOVA.	39
Tableau 9	Valeurs propres, pourcentages et pourcentages cumulés des variations totales expliquées par les quatre composantes principales.	39
Tableau 10	Matrice de corrélations des variables initiales avec les quatre premières composantes principales.	41
Tableau 11	Organisation structurale de la région mitochondriale COI-COII à partir d'échantillons d'Abeilles	43

1. Introduction

Le plus vieux fossile d'Abeille connu est *Melittosphex burmensis* (Crane, 1999), son âge est estimé à environ 100 millions d'années (MA), à la période mi-Crétacé. Cette donnée fossile est cohérente avec l'estimation sur la période d'apparition des ancêtres des Abeilles, les Apoidea Spheciformes dont le plus vieux fossile connu date d'environ 130 millions d'années. Cette donnée est aussi cohérente par rapport à l'apparition des plantes à fleurs (Angiospermes) estimée au plus tard à environ 115 MA (Crane, 1999). Les Abeilles sont probablement apparues sur le continent africain (Michener, 2007). La diversification des Abeilles semble avoir été relativement rapide après leur apparition (Michener, 2007).

Les Apoidea participent de manière prépondérante à la pollinisation de nombreux végétaux (Gallai *et al.*, 2009 ; Rader *et al.*, 2009; Moritz *et al.*, 2010). La majorité d'entre eux ne pourraient pas accomplir leur cycle de développement sans l'intervention des Abeilles (Proctor *et al.*, 1996 ; Michener, 2000). Ainsi, pour toutes les cultures entomophiles telles que le tournesol, les arbres fruitiers ou les légumineuses, la pollinisation constitue un facteur de production majeur (Adjare, 1990 ; Aguilar *et al.*, 2006 ; Gallai *et al.*, 2009 ; Adjlane *et al.*, 2012). Grâce à leur morphologie parfaitement adaptée, ils sont plus efficaces que la plupart des autres pollinisateurs : Coléoptères, Lépidoptères ou Syrphes. De plus, leur grande mobilité et les longues distances que certains peuvent parcourir sont des éléments déterminants dans le maintien d'un flux génétique entre les populations éloignées (Velterop, 2000 ; Anderson *et al.*, 2011; Krupke *et al.*, 2012).

Parmi les insectes pollinisateurs l'Abeille domestique, *Apis mellifera* Linnaeus. (1758) (Hymenoptera; Apidae) est exploitée par l'Homme en apiculture depuis environ 7000 ans (Crane, 1990). Elle constitue un maillon essentiel de la chaîne qui contribue à maintenir les écosystèmes (Straub, 2007). L'intérêt qu'il lui est porté est dû à sa capacité à produire du miel, de la gelée royale, de la cire mais aussi de pouvoir récolter du pollen et de la propolis (Crane, 1976, 1990). Ces produits de la ruche sont connus non seulement pour leur importance économique grâce à leur commercialisation mais aussi pour leurs effets bénéfiques sur la santé (apithérapie) (Bogdanov, 2006).

La relation indissociable entre fleurs et Abeilles a conduit à la co-évolution et à la diversité des espèces qu'on connaît actuellement (Danforth *et al.*, 2006). Ainsi, la pollinisation ne constitue pas seulement la contribution essentielle des Abeilles à l'agriculture mais aussi aux

écosystèmes naturels (Breeze *et al.*, 2011, Ollerton *et al.*, 2011). On dénombre une faune mondiale d'Abeilles de plus de 20 000 espèces (Payette, 1998 ; Michener, 2000 ; Moure *et al.*, 2007). Celle-ci contribue à la reproduction sexuée, autrement dit à la survie et à l'évolution, de plus de 80% des espèces des plantes à fleur (Vaissière, 2002 ; Afssa, 2008). Grâce à la fécondation croisée, les Abeilles contribuent à réduire les risques de dégénérescence par consanguinité et participent ainsi à la biodiversité végétale.

La pérennité des activités agricoles dans le monde est liée en partie aux insectes pollinisateurs. L'Abeille joue un rôle économique important puisque 35% de la production agricole mondiale dépend directement des pollinisateurs (Klein *et al.*, 2007 ; Ricketts *et al.*, 2008) et 84% des espèces cultivées sont liées à l'activité de ces insectes (Williams, 1996 ; Carreck & Williams, 1998 ; Breeze *et al.*, 2011). L'Abeille mellifère est de loin le pollinisateur dont l'importance économique est la plus grande pour les cultures au niveau mondial (Klein *et al.*, 2007 ; Gallai *et al.*, 2009). En agronomie, une meilleure pollinisation assurée par les Abeilles va augmenter le rendement quantitatif, mais aussi qualitatif de nombreuses plantes cultivées (Daşcan *et al.*, 2004 ; Chouchaine, 2010).

L'apiculture pratiquée depuis la plus haute antiquité connaît ces derniers temps un développement important dans notre pays "Algérie" avec les différents programmes nationaux mis en place (Badren, 2016). Elle est pratiquée surtout dans le nord du pays où la douceur relative du climat et la flore mellifère fournit une miellée pendant presque toute l'année (Oudjet, 2012).

Les principaux produits auxquels s'intéresse l'apiculteur sont par ordre d'importance, le miel, le pollen, la gelée royale et la propolis c'est dans ce sens que nos agriculteurs ont modernisé les pratiques apicoles tel que la pollinisation croisée de nombreuses plantes cultivées et fécondées par les Abeilles. En 2010, l'apiculture en Algérie comptait environ 1,2 million de colonies et 20 000 apiculteurs. L'évolution de la production de miel montre une nette augmentation de 2002 à 2010. Cependant, le rendement des colonies reste très faible et inférieur à 4 kg par ruche (Adjlane *et al.*, 2012). En 2017, la production de miel avait atteint 1600 quintaux, elle est inférieure aux besoins de la consommation locale (apiculteur).

Comme chez la plupart des espèces, la biodiversité naturelle de l'Abeille s'est mise en place en fonction de nombreux facteurs incluant : l'histoire et la démographie des populations, l'éventuel isolement de groupes de populations, les migrations naturelles, mais également

l'adaptation aux conditions locales sous l'action de la sélection Darwinienne. Ainsi, l'Abeille domestique *A. mellifera* occupe une aire géographique très vaste et montre une variabilité morphologique et génétique très structurée. L'aire de répartition naturelle de l'Abeille domestique s'étend à l'Afrique, à l'Europe et au Moyen-Orient. A ce jour, 29 sous-espèces (ou races géographiques) ont été reconnues et décrites sur la base de caractères morphologiques, comportementaux, écologiques et de distributions géographiques (Ruttner, 1988 ; Sheppard & Meixner, 2003 ; Engel, 2004 ; Shaibi *et al.*, 2009 ; Meixner *et al.*, 2013). Ces sous-espèces peuvent se reproduire entre elles car les divergences génétiques, morphologiques et comportementales ne sont pas suffisamment importantes pour constituer des barrières reproductives (ex: morphologie appareil sexuel, période de reproduction, attraction, ...). Elles ont été regroupées sous cinq lignées évolutives: la lignée A (Africaine), la lignée C (Nord-Méditerranéenne), la lignée M (Ouest-Européenne), la lignée O (Orientale) et la lignée Y (Yéménite) (Ruttner, 1988 ; Garnery *et al.*, 1992 ; Arias & Sheppard, 1996, Sheppard *et al.*, 1997 ; Franck *et al.*, 1998, 2000 ; Miguel *et al.*, 2011). Ces lignées ont d'abord été définies sur la base de caractères morphologiques par Ruttner (1988) puis ont été confirmées par des études génétiques utilisant l'ADN mitochondrial (ADNmt) (Hall & Smith, 1991; Garnery *et al.*, 1993; Arias & Sheppard, 1996; Franck *et al.*, 2000; Cánovas *et al.*, 2008; Kekecoglu *et al.*, 2009; Alburaki *et al.*, 2011; Papachristoforou *et al.*, 2013; Loucif-Ayad *et al.*, 2014; Achou *et al.*, 2015).

Plusieurs travaux biométriques ont été réalisés (Tomassone & Fresnaye, 1971 ; Leporati *et al.*, 1984 ; Bucu *et al.*, 1987 ; Cornuet *et al.*, 1978, 1988 ; Cornuet & Fresnaye, 1989 ; Grissa *et al.*, 1990 ; Moritz, 1991 ; Meixner *et al.*, 1994 ; Sheppard *et al.*, 1997 ; Kandemir *et al.*, 2000 ; Shaibi *et al.*, 2009; Chouchaine, 2010).

En Algérie, des travaux sur la diversité morphométriques de la population d'Abeilles domestiques *A. mellifera* ont été réalisés (Loucif, 1993 ; Achou & Soltani, 1997; Barour, 2003; Amoura, 2004 ; Doumandji, 2006; Achou, 2007; Barour, 2012; Bendjedid & Achou, 2014).

Plus récemment, la biologie moléculaire a permis de progresser dans la connaissance des populations locales (Smith *et al.*, 1991; Garnery *et al.*, 1992, 1998a, 1998b ; De la Rúa, 1999). Chaque population locale (écotype) réunit donc un ensemble d'adaptations tout à fait spécifiques à son environnement. Le développement des techniques pour l'analyse de polymorphisme de l'ADN nous a permis d'atteindre la diversité génétique de l'Abeille

moyennant l'utilisation des marqueurs moléculaires : les marqueurs nucléaires (Smith, 1988) et mitochondriaux (Garnery, 1992).

L'utilisation du polymorphisme de restriction *DraI* de la région intergénique COI-COII (cytochrome oxydase I et II) de l'ADNmt a montré le fort pouvoir discriminant de ce marqueur cytoplasmique moléculaire dans l'analyse de la biodiversité de l'Abeille domestique. Des études ont été réalisées sur la biodiversité génétique d'*A. mellifera* dans certaines régions d'Algérie (Achou, 2007 ; Chahbar *et al.*, 2012; Hu *et al.*, 2014 ; Loucif-Ayad *et al.*, 2014; Achou *et al.*, 2015; Haddad *et al.*, 2015, 2017, 2018).

Les Apoidea constituent aussi d'excellents bio-indicateurs (Clément, 2009), notamment des milieux agricoles. En effet, dans les systèmes agricoles modernes, les insecticides répandus avant ou pendant la floraison pour protéger les cultures contre les ravageurs peuvent avoir un impact dévastateur sur les populations d'Abeilles. L'Abeille mellifère possède les caractéristiques propres d'une espèce sentinelle (Lagadic *et al.*, 1998; Elliott *et al.*, 2011). De nombreuses études ont montré que les Abeilles et les matrices associées (miel, pollen ...) pouvaient être utilisées comme sentinelles de la contamination de l'environnement par les xénobiotiques (Celli & Maccagnani, 2003; Ponikvar *et al.*, 2005; Bogdanov, 2006).

En effet, pour détecter la présence de pesticides et leur impact sur l'environnement, une des méthodes utilisées est l'approche biologique basée sur l'étude d'espèces bioindicatrices et de leurs marqueurs biologiques. Les Abeilles constituent un modèle pertinent pour le développement des biomarqueurs afin d'évaluer la contamination de l'environnement (Leita *et al.*, 2004).

Les biomarqueurs mesurent l'interaction entre un système biologique et un agent environnemental. Ils peuvent être chimiques, physiques ou biologiques (Rouibi, 2016). Ils représentent la réponse biologique initiale des organismes face à des perturbations ou des contaminations du milieu dans lequel ils vivent; en conséquence, ils sont en général plus sensibles que les paramètres mesurés à un niveau supérieur d'organisation biologique tel que l'organe, l'individu ou la population (Stegeman *et al.*, 1992 ; Bouchema, 2011 ; Rouibi *et al.*, 2016).

Différents biomarqueurs ont été mesurés (Badiou-Bénéteau *et al.*, 2012), parmi lesquels :

Les glutathion S-Transférases (GSTs) jouent un rôle important dans le mécanisme de détoxification d'un organisme soumis à un xénobiotique (Papadopoulos *et al.*, 2004 ; Sue *et*

al., 2006 ; Charpentier, 2013 ; Nabti *et al.*, 2014). Les GSTs représentent une famille de protéines multifonctionnelles, mutagènes, appartenant au système de détoxification de phase II, enzymes cytosoliques qui catalysent la conjugaison du glutathion réduit (GSH) en une variété de composés électrophiles endogènes ou exogènes (Maxwell, 1992; Stone *et al.*, 2002; Barata *et al.*, 2005). Chez les Abeilles, la GST est principalement localisée au niveau de l'intestin moyen.

L'acétylcholinestérase (AChE), un biomarqueur de neurotoxicité largement utilisé pour identifier une exposition aux insecticides organophosphorés, carbamates ou pyréthrinoïdes (Fulton & Key, 2001 ; Matozzo *et al.*, 2005 ; Loucif-Ayad *et al.*, 2008, Nabti *et al.*, 2014 ; Rouibi *et al.*, 2016). L'AChE est une enzyme clé du système nerveux central chez les insectes. Elle est responsable de l'hydrolyse du neurotransmetteur acétylcholine en choline et acétate au niveau des synapses (Eldefrawi, 1985 ; Matozzo *et al.*, 2005), ce qui permet un contrôle précis et une modulation de la transmission neuronal (Badiou *et al.*, 2008).

L'intérêt majeur de l'étude des Apoidea est le rôle clef qu'ils tiennent dans les écosystèmes. Vu le manque des données sur les apoïdés dans notre pays, il devient nécessaire d'étudier ce groupe qui présente un intérêt agronomique, écologique et économique considérable. Sa connaissance permettra une meilleure protection et conservation.

Le présent travail entrepris sur l'Abeille domestique, *A. mellifera* vise:

- La caractérisation morphologique des Abeilles du Nord-est Algérien afin de déterminer leur diversité.
- La mise en œuvre d'approche moléculaire permettant de mieux préciser la diversité naturelle, afin d'établir un bilan du cheptel apicole algérien.
- L'évaluation saisonnière de l'impact toxicologique des pesticides par la mesure de l'activité de la GST, et l'AChE durant l'année 2015 au niveau de trois sites de la Wilaya de Jijel.

2. Matériel et méthodes

2.1 Présentation du matériel biologique

Les Abeilles domestiques sont des insectes qui appartiennent à l'ordre des Hyménoptères, super-famille des Apoïdea et au genre *Apis*. Ce dernier renferme neuf espèces (Le Conte & Franck, 2005) qui ont une aire de répartition restreinte à l'Asie et en particulier au Sud-Asiatique. L'espèce *Apis mellifera* (Linnaeus, 1758) (Fig. 1) est la plus répandue dans le monde, présente une aire de répartition naturelle plus large, s'étendant jusqu'à l'Afrique subsaharienne, le Nord de l'Europe et l'Asie Centrale (Fig. 2) (Arias & Sheppard, 2005, Whitfield *et al.*, 2006) et elle a pu s'adapter à différents climats et flores (Le Conte & Najavas, 2008).

L'Abeille algérienne appartenant à la lignée Africaine A est représentée par deux sous-espèces *A. m. intermissa* (Buttel-Reepen, 1906) ou Abeille tellienne et *A. m. sahariensis* (Baldensperger, 1924 ; Haccour, 1960). La race *intermissa* est la plus répandue et son aire de répartition s'étend sur toutel'Afrique du Nord : Maroc, Algérie, Tunisie (Cornuet *et al.*, 1988; Grissa *et al.*, 1990; Barour *et al.*, 2011; Loucif-Ayad *et al.*, 2014; Achou *et al.*, 2015) et la Lybie (Le Conte, 2011) plus précisément, elle est rencontrée au nord du Sahara Algérien (Adam, 1953; Bendjedid & Achou, 2014).

Selon Michener (2007), l'Abeille domestique appartient à la classification suivante:

Règne	Animalia
Embranchement:	Arthropoda
Sous embranchement :	Antennata
Classe :	Insecta
Sous-classe :	Ptérygota
Ordre :	Hyménoptera
Sous-Ordre :	Aculeata
Super-Famille	Apoidea
Famille	Apidae
Genre	<i>Apis</i>
Espèce	<i>Apis mellifera</i> (Linnaeus, 1758)



Figure 1. Photographie d'*A. mellifera* (Linnaeus, 1758) (Photo personnelle)

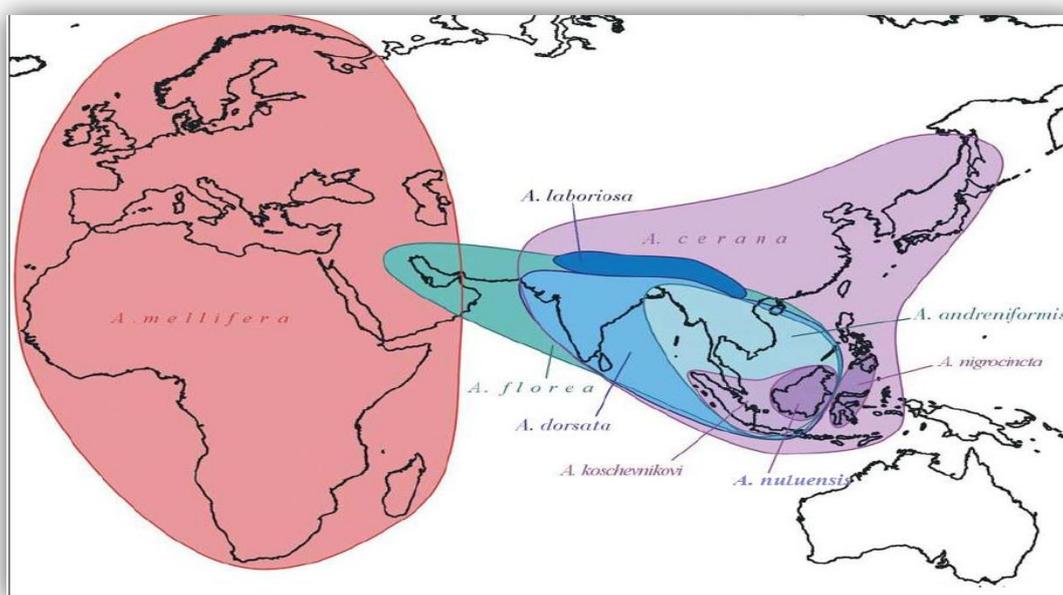


Figure 2. Carte de l'aire de répartition naturelle des neuf espèces d'Abeilles du genre *Apis* dans le monde (Le conte & Franck, 2005).

2.2 Morphologie et anatomie d'une Abeille

L'Abeille domestique *A. mellifera* est un invertébré de la famille des Apidés, son corps comprend trois parties bien distinctes: une tête, un thorax et un abdomen. Elle n'a pas de squelette interne mais dispose d'une enveloppe externe (exosquelette) faite de chitine, de la cuticuline et de la mélanine ; pigment dont la couleur peut varier de jaune au noir, et enfin tout à l'extérieur une fine couche cireuse. Le corps est couvert de soies (poils) (Fig. 3A).

2.2.1 La tête

C'est une capsule ovoïde (Le conte, 2011) qui présente deux yeux de très grande taille, placés de chaque côté de la tête et trois ocelles (trois petits yeux) situés au centre de la tête. Les

antennes qui permettent la communication et les pièces buccales (Gustin, 2008 ; Clément, 2010) (Fig. 3A).

2.2.2 Le thorax

C'est la partie la plus dure du corps (Riondet, 2013). Il assure la locomotion de l'Abeille car il porte trois paires de pattes et deux grandes ailes et deux petites (Clément, 2010), les ailes antérieures et postérieures s'accrochent grâce à des crochets (Pohl, 2008). Le thorax contient des muscles puissants et trois paires d'orifices respiratoires appelés stigmates (Le conte, 2011) (Fig. 3A).

2.2.3 L'abdomen

C'est la partie la plus grosse, Il est composé de 7 anneaux mobiles qui peuvent s'allonger suivant le besoin (Frères & Guillaume, 2011). Il renferme les systèmes respiratoire, circulatoire, digestif et un certain nombre de glandes. Il se termine par l'appareil vulnérant, l'appareil reproducteur et le rectum (Winston, 1993).

Les différents individus de la colonie n'effectuant pas les mêmes tâches, ils n'ont donc pas la même morphologie (Fig. 3A).

Le système circulatoire chez l'Abeille comme chez tous les insectes, l'hémolymphe remplit toute la cavité interne protégée par la cuticule. Cette cavité est appelée hémocèle. Il n'existe pas de réseau de veines et d'artères, les organes baignent dans l'hémolymphe qui fournit à l'organisme les éléments nécessaires. Il est constitué uniquement d'un cœur dorsal et d'une aorte reliant la tête à l'abdomen (Winston, 1993). Quant au système respiratoire il est constitué de trachées s'ouvrant sur la surface du corps au niveau de stigmates. Les échanges gazeux oxygène/dioxyde de carbone se font directement entre le milieu extérieur et les organes par simple diffusion (Ioiriche, 1979) (Fig. 3B).

Le système digestif se compose de trois parties : l'intestin antérieur, l'intestin moyen et l'intestin postérieur (Adam, 2010). L'intestin antérieur comprend le pharynx, l'œsophage, le jabot, l'estomac proprement dit (Biri, 2010). D'origine épidermique, l'intestin antérieur est constitué d'un épithélium aplati, recouvert d'une cuticule chitineuse (Faucon, 1992). L'intestin moyen ou ventricule assure la digestion, et l'absorption ; l'intestin postérieur composé du duodénum et du rectum. Le rectum est également extensible pour pouvoir stocker les excréments. Le système excréteur n'est pas composé de reins, mais de tubes de Malpighi annexés au niveau du pylore (Winston, 1993) (Fig. 3B).

Le système nerveux est constitué de deux ensembles complémentaires : Le système nerveux central avec le cerveau et la chaîne nerveuse ventrale (les ganglions) et le système nerveux stomatogastrique (Le conte, 2011).

Le système endocrinien, il comprend les hormones qui interviennent dans la régulation de la physiologie de l'Abeille à de multiples niveaux (hormone juvénile, hormone de mue, ...). L'hormone juvénile intervient notamment dans l'évolution du système immunitaire chez l'Abeille (Amdam *et al.*, 2005), aussi, il sécrétée pendant le stade larvaire et impliquée dans le maintien des caractères larvaires. L'hormone de mue ou l'ecdysone pour le contrôle de la mue et de la métamorphose (Pedigo, 2002). Quant au système glandulaire est complexe et varie en fonction de l'âge et du rôle de l'individu dans la ruche. Les principales glandes indépendantes sont : glande salivaire, glandes mandibulaires, glandes hypophrygiennes et glande de Nasanov (Spürgin, 2010) (Fig. 3B).

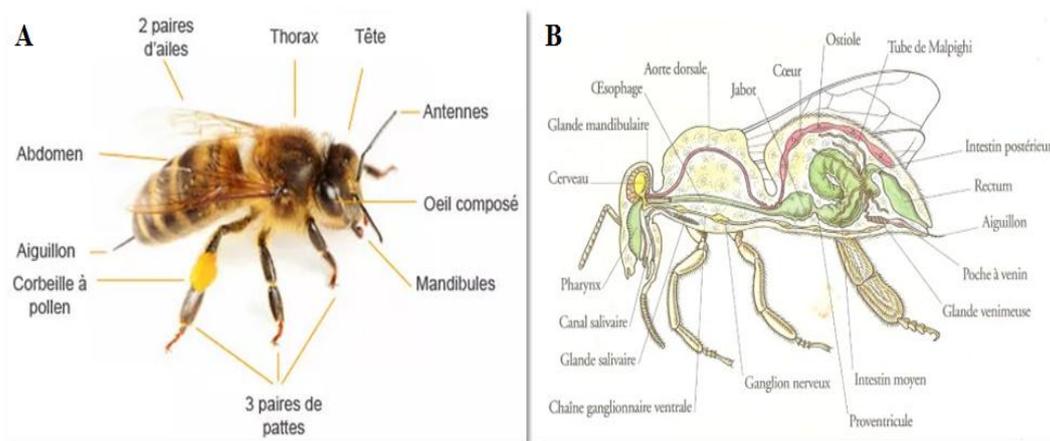


Figure 3. Morphologie externe de l'Abeille femelle adulte (A) (Morphologie de l'abeille : abeilletpe-wix.com).

Anatomie interne de l'Abeille femelle adulte (B) (Les animaux ont-ils un cœur, un cerveau ? Sciences Heembeek).

2.3 Organisation sociale de la colonie d'Abeille

Les Abeilles domestiques sont des insectes eu-sociaux, c'est-à-dire qu'un individu seul ne peut pas survivre sans la colonie entière.

Les sociétés d'Abeilles sont des entités biologiques dynamiques. Au cours du temps, la taille et la structure de la société changent. Ces changements sont associés aux développements de la colonie, à la saison, à la disponibilité de la nourriture et aux conditions climatiques (Breed

et al., 1990 ; Le Conte, 2011). En effet, trois castes structurent la société des Abeilles : la reine, les ouvrières et les faux bourdons (mâles) (Clément, 2009) (Fig. 4).

Une colonie d'Abeille compte environ 50.000 à 60.000 individus, parfois plus (Paterson, 2008), dont une seule reine, 100 à 6 000 mâles (présents uniquement d'avril à septembre) (Martin *et al.*, 2001), le reste étant constitué par les ouvrières.

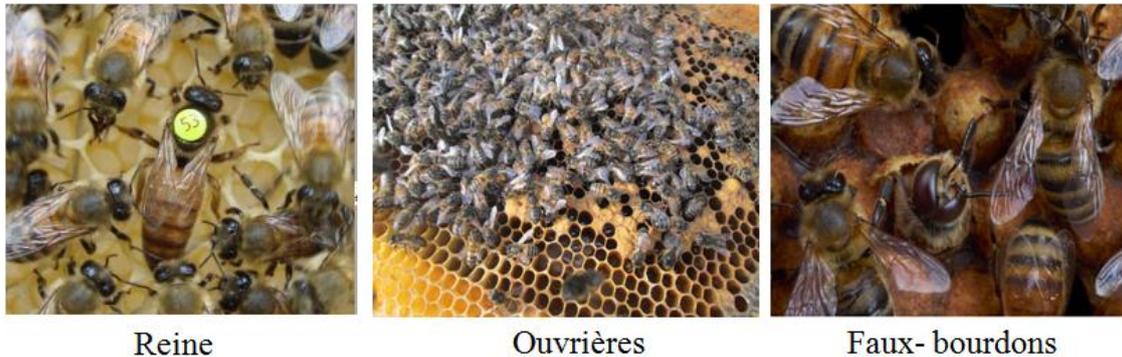


Figure 4. Les trois castes d'une colonie d'Abeille (Photo personnelle).

2.3.1 La reine :

Seul individu fertile dans la ruche est unique (Marchenay & Bérard, 2007), elle résulte d'un œuf fertilisé (Caron, 1999). Elle se reconnaît à son thorax plus volumineux que celui des ouvrières et surtout son abdomen plus développé. Elle mesure en moyenne 16 mm de long et son thorax atteint 4,5 mm de diamètre (Biri, 2010). Elle est nourrie à l'état larvaire exclusivement avec de la gelée royale (Clément, 2000; Le Conte *et al.*, 2001). Sa durée de développement est de 16 jours (Laidlaw & Page, 1997) et peut vivre jusqu'à 4 à 5 ans (Fluri, 1994).

Seule la reine assure la ponte des œufs pour assurer la pérennité de la colonie (1500 à 2000 œufs par jour) (Le Conte, 2002). Elle régule aussi les activités de la colonie par la sécrétion de phéromones.

2.3.2 Les ouvrières :

Femelles stériles non reproductives (Seeley, 1983), résultent d'œufs fertilisés (Caron, 1999) et les plus représentées dans la colonie. Ce sont les plus petites Abeilles de la ruche, une ouvrière mesure en moyenne 10 à 12 mm de long pour 4 mm de diamètre de thorax (Biri, 2010; Ravazzi, 2007). Elles sont caractérisées par une langue développée qui leur permet la

récolte du nectar, des pattes dotées de brosses et d'une corbeille pour la récolte du pollen. Leurs durée de développement est de 21 jours (Laidlaw & Page, 1997).

Elles assurent toutes les tâches nécessaires au fonctionnement de la colonie : entretien, nettoyage, thermorégulation et défense de la ruche, elles nourrissent et élèvent les larves, produisent de la cire, le miel et la gelée royale et élaborent des rayons, elles récoltent aussi de la propolis.

Sa durée de vie est très variable selon la période de l'année, et forte différente selon que c'est l'hiver ou l'été (Frères & Guillaume, 2011), environ 15 à 70 jours pour les Abeilles d'été et de 170 à 243 jours pour celles d'hiver.

2.3.3 Les faux bourdons :

Des Abeilles mâles issues d'œufs non fécondés, pondus par la reine ou par les ouvrières (Caron, 1999 ; Gempe *et al.*, 2009). Ils sont de plus grande taille que les femelles, se caractérisent par un corps massif (diamètre de thorax est de 5,5 mm) et peuvent atteindre 12 à 14 mm de long (Biri, 2010). Ils possèdent aussi des yeux composés de surface plus importante mais pas de dard, et sont donc sans défense. Ils ne participent pas à la récolte du nectar ou du pollen, ayant une langue trop courte pour butiner les fleurs. Leurs durée de développement est de 24 jours (Laidlaw & Page, 1997). Ont une durée de vie assez courte, plus ou moins 3 mois. Leurs rôles se limitent strictement à la fécondation des jeunes reines (reines vierges), lors du vol nuptial puis ils meurent (Straub, 2007). En outre, ils peuvent aussi aider à réchauffer le couvain ou à répartir le nectar (Frères & Guillaume, 2011).

Quant la nourriture manque dans une ruche les ouvrières les sacrifient car ils sont de gros mangeurs ; ils n'apportent aucune nourriture et ne participent pas à la vie de la ruche.

2.4 Détermination des castes

La détermination du sexe mâle ou femelle est liée à la fécondation de l'œuf pondue.

Le cycle développemental d'*A. mellifera* est particulier "cycle haplo-diploïde", la reine diploïde est capable de donner deux types différents, les individus diploïdes (des ouvrières ou des reines), possédant 32 chromosomes après fertilisation de l'œuf, ou mâles haploïdes contenant 16 chromosomes, résultant d'un œuf non fertilisé (Fig. 5).

L'alimentation et l'hormone juvénile sont des facteurs clés qui orientent le déterminisme des castes à partir d'une même larve (Bruneau, 2006). La qualité et la quantité de nourritures données aux larves semblent être les facteurs déterminants (Le conte, 2011). Les larves de reines sont nourries exclusivement de gelée royale pendant toute leur vie larvaire. Les larves

d'ouvrières et les larves de mâles reçoivent une nourriture qui contient plus de miel et de pollen, moins de gelée royale, au fur et à mesure qu'elles grandissent (Le conte, 2011).

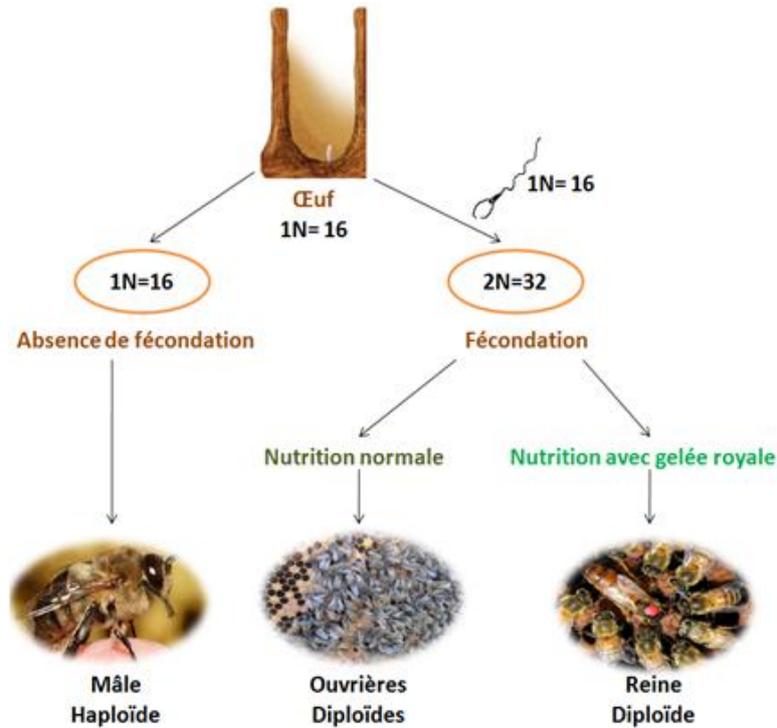


Figure 5. Différenciation des œufs pondus par la reine (Photo personnelle).

2.5 Cycle de vie de l'Abeille domestique

Les Abeilles sont des insectes holométaboles, c'est-à-dire à métamorphose complète. En effet, elles sont complètement différentes à l'état larvaire et à l'état adulte. Au cours de son développement, l'Abeille passe par une série de phases : l'œuf, la larve et la nymphe (Biri, 2010) (Fig. 6).

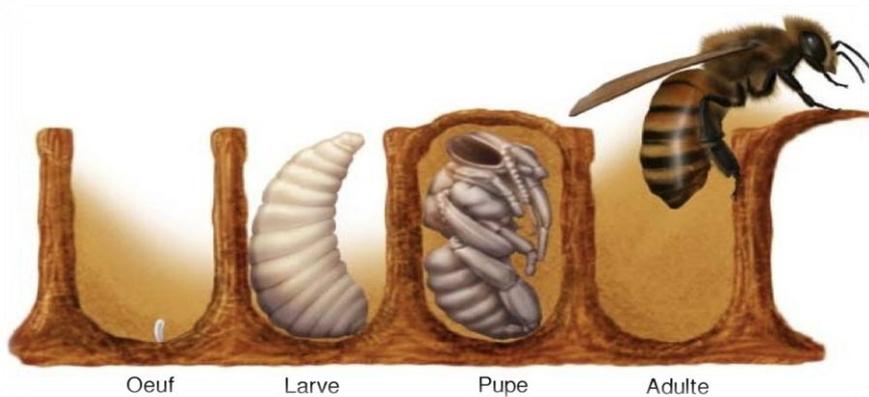


Figure 6. Stades de développement de l'Abeille: de l'œuf à l'adulte (Vie de l'abeille : Apis Bruoc Sella).

Après l'accouplement, qui se produit au cours du vol nuptial, la reine fécondée retourne dans la ruche, s'installe au centre d'un rayon et commence à déposer un œuf dans chaque alvéole en suivant un mouvement circulaire du centre vers la périphérie.

2.5.1 Le stade œuf :

Facile à reconnaître du fait de sa couleur blanche, sa forme ovale et légèrement incurvée, sans pattes ni yeux. Il est déposé verticalement dans l'alvéole lorsqu'il est pondu. Au bout de 3 jours suivant la ponte, l'œuf s'incline peu à peu au fond, dissout sa membrane et se transforme en larve. Pendant ces trois premiers jours, les larves sont nourries avec de la bouillie ou gelée royale par les ouvrières nourrices (Jean-Prost & Le conte, 2005).

Un œuf mesure entre 1,3 et 1,8 mm de long, environ 0,5 mm de large et pèse entre 0,12 et 0,22 mg.

Les temps de développement, la taille et le poids sont en fonction de la race, de la lignée et même des conditions climatiques.

2.5.2 Le stade larvaire :

A la forme d'un petit ver, ne comporte qu'un tube digestif et ainsi, son rôle se limite à se nourrir. La larve passe presque tout son temps à manger la nourriture déposée dans l'alvéole par les Abeilles nourrices. Elle est même capable de se retourner si la nourriture n'est pas directement à côté de sa bouche.

Au fur et à mesure que la larve grandit, elle mue à 5 reprises. Elle gagne énormément de poids. Par exemple, une ouvrière gagnera 900 fois son poids initial tandis que la reine gagnera 1700 fois son poids, Le faux-bourdon gagne jusqu'à 2300 fois son poids.

Au 9^{ème} jour, l'alvéole est operculée par un petit bouchon de cire. Les derniers jours du stade larvaire sont consacrés à la construction d'un cocon.

La durée du stade larvaire varie selon la caste: reine, ouvrière ou faux-bourdon.

2.5.3 Le stade nymphal et imago :

A ces deux derniers stades ; la tête, les yeux, les antennes, les pièces buccales, le thorax, les pattes et l'abdomen possèdent les caractéristiques de l'adulte. Les mandibules se forment, permettant à l'imago de percer l'opercule de cire. Une fois adulte, il sort de l'alvéole et bat des ailes. La cuticule formée à l'extérieur sèche progressivement durant 12 à 24 heures, et l'Abeille commence son travail. Il pèse alors entre 80 et 292 mg en fonction de sa caste, la reine étant la plus lourde.

On observe toutefois quelques variations de ce cycle de développement en fonction de la caste. Ces variations se font sur la durée de chaque étape (Prost, 2005 ; Von Frisch, 2011) (Fig.7).

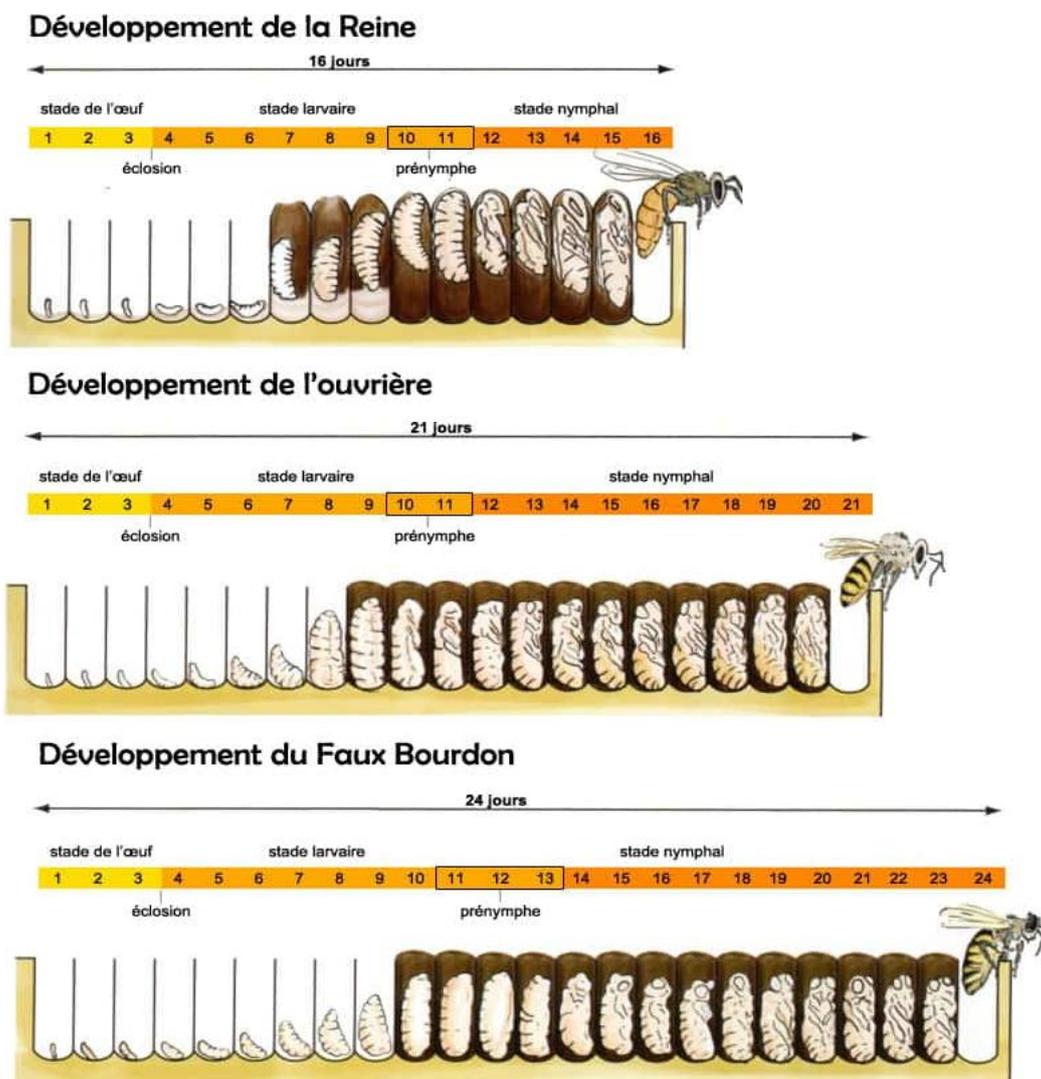


Figure 7. Cycle évolutif des trois castes de l'Abeille domestique *A.mellifera* (Le Conte, 2002).

2.6 Présentation du site d'échantillonnage

Des Abeilles ouvrières adultes ont été échantillonnées au niveau de trois communes de la Wilaya de Jijel (El-Taher, El-Ancer et Ziama mansouriah). C'est une Wilaya côtière au Nord-est de l'Algérie s'étendant sur une superficie de 2398,69 km² entre les latitudes Nord 36° 10 et 36° 50 et les longitudes Est 5° 25 et 6° 30. Elle est limitée au Nord par la mer méditerranée à l'Ouest par la wilaya de Béjaïa, à l'Est par la wilaya de Skikda, au Sud-ouest par la wilaya de Sétif, au Sud par la wilaya de Mila. (Fig. 8, Tab. 1).

Le climat joue un rôle important dans le développement du couvert végétal en général et de la flore mellifère en particulier. Il est considéré comme un facteur majeur dans la régulation du cycle biologique des Abeilles (Imdorf *et al.*, 1996). Cette région est considérée parmi les régions les plus pluvieuses d'Algérie 1 200 mm/ans, elle est caractérisée par un climat tempéré humide (méditerranéen) ; pluvieux et froid en hiver, chaud et humide en été. La température variée entre 20°C et 38°C en été, 14°C et 17°C en automne, 5C° à 15C° en hiver et 13°C à 29°C au printemps (station météorologique Aéroport Achouat).

En effet, les fluctuations des températures influent sur l'activité des Abeilles qui deviennent inactives en période de froid et de sécheresse.

La présence d'une flore autour d'un rucher est très importante pour le bon développement de la colonie. En effet, cette flore est la source de nectar et de pollen dont les Abeilles se nourrissent exclusivement. Notre rucher est entouré d'une flore mellifère très variée composée principalement de plantes spontanées : *Oxalis pes-caprae* L. (Oxalidaceae), *Sinapis arvensis* L. (Brassicaceae), *Lavendula stoechas* (Lamiaceae), *Asphodelus microcorpus* L. (Liliaceae), *Mentha pulegium* L. et *Pallenis spinosa*. On trouve également un certain nombre d'arbres fruitiers notamment les agrumes, mais aussi des oliviers et des eucalyptus.

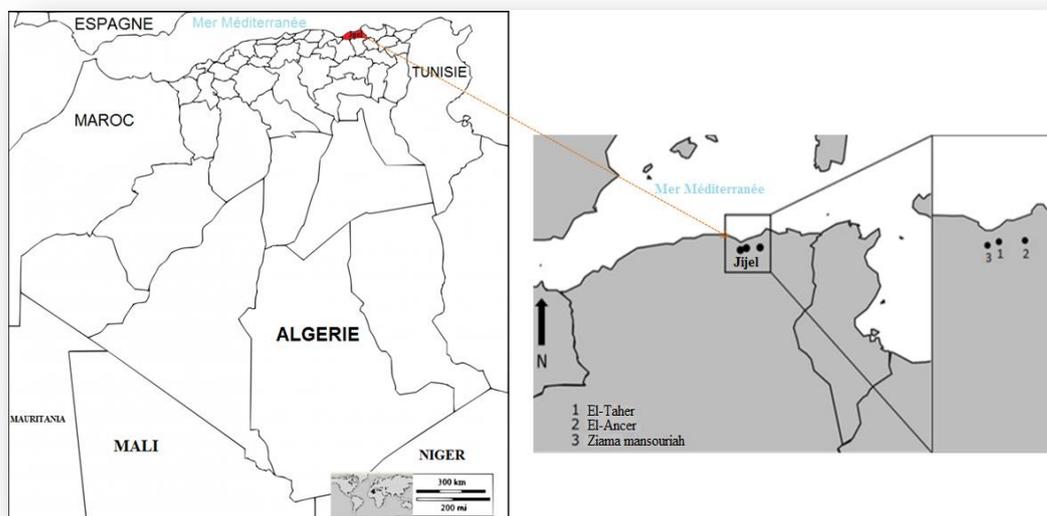


Figure 8. : Localisation géographique de site d'échantillonnage

Tableau 1. Position géographique des sites d'échantillonnage.

Localisation		Position géographique	
Sites		Latitude	Longitude
1	El-Taïher	36° 46' 19" N	5° 53' 54" E
2	El-Ancer	36° 48' 00" N	6° 09' 25" E
3	Ziama mansouriah	36° 40' 25" N	5° 28' 52" E

2.7 Stratégie d'échantillonnage et collecte des données

En apiculture, l'emplacement d'un rucher est très important : d'une part pour une bonne activité des colonies et d'autre part pour la santé des Abeilles. Le rucher est déposé sur un terrain plat d'accès facile. Les ruches sont posées sur des supports métalliques surélevés de 20 cm du sol pour éviter l'humidité. Ces ruches sont orientées vers le soleil levant, ce qui favorise l'activité matinale des Abeilles (Fig. 9).

Pour la biométrie:

Les Abeilles résidaient toutes dans des ruches de type «LANGSTROTH». Il a été vérifié qu'elles ne faisaient pas l'objet de transhumances et de maladies comme préconisé dans les travaux de Cornuet *et al.*, (1988) et Leporati *et al.* (1984).

Les prélèvements des échantillons d'Abeilles ouvrières adultes, ont été effectués en Décembre 2015 à l'aide d'une pince souple, et placées dans des flacons contenant de l'éthanol absolu (95%) (Cornuet *et al.*, 1988) et transportées au laboratoire où elles ont été conservées à -4°C dans l'attente d'être mesurées. Sur chaque site, on a échantillonné 23 Abeilles, ce qui représente un total de 69 individus.

Pour la biologie moléculaire:

Sur chaque site, 10 Abeilles ouvrières ont été prélevées à l'aide d'une pince souple, et placées dans des tubes Eppendorf (1,5ml) contenant de l'éthanol absolu (95%) et conservées à -4°C jusqu'au moment de l'analyse.

Pour le dosage des biomarqueurs:

Les Abeilles sont collectées au niveau de trois sites de la wilaya de Jijel, puis sont disséquées, l'abdomen et la tête placés dans des solutions appropriées pour le dosage de la glutathion S-transférase et de l'acétylcholinestérase, respectivement.



Figure 9. Emplacement du rucher (Photo personnelle).

2.8 Etude biométrique

2.8.1 Choix de la caste en biométrie

Dans les méthodes de biométrie les caractères morphométriques des mâles ne sont pas utilisés, car les mâles ne sont pas représentatifs de la population d'une colonie puisqu'ils sont haploïdes.

L'effectif important des ouvrières dans une colonie et leur diploïdie pouvant être aussi bien sœurs véritables que demi-sœurs (Cornuet *et al.*, 1975) constitue l'intérêt pour cette caste dans les méthodes biométriques décrite par Fresnaye (1981). Elles représentent la partie la plus importante de la colonie, ainsi son prélèvement pour l'échantillonnage ne nuira pas au développement de la colonie.

2.8.2 Caractères morphologiques choisis en biométrie

Il existe une cinquantaine de caractères morphologiques utilisables en biométrie de l'Abeille (Kshirsagar & Renade, 1981). La plupart des méthodes d'analyses n'utilisent qu'une partie de ces caractères (Fresnaye, 1981). Cependant, divers auteurs tels que Ruttner (1988) a conclu que seulement 10 caractères seraient suffisants pour distinguer morphologiquement les Abeilles de race africaines. Ainsi, plusieurs auteurs ont travaillé sur ces caractères (Kandemir *et al.*, 2000 ; Achou, 2007; Chouchaine, 2010; Bendjedid & Achou, 2014).

En ce qui concerne notre travail, 15 caractères morphologiques ont été sélectionnés en fonction de leur pouvoir discriminant et de leur signification biologique, ces caractères en question contribuent beaucoup dans la production du miel et de la cire (Tab. 2 ; Fig. 10-17).

- a- Longueur de la langue :** un bon caractère racial qu'il faut mesurer correctement.
- b- Longueur et largeur de l'aile postérieure et antérieure :** les caractères morphologiques alaires sont très importants dans la classification des races et sous races d'Abeilles. La taille alaire influence, d'une part, le vol des Abeilles et d'autre part, la quantité du pollen qui peut être récolté.
- c- L'indice cubital :** permet de définir une race ou son taux d'hybridation. Cet indice est déterminé par le rapport des longueurs des deux nervures alaires formant un obtus à la base de la troisième (3^{ème}) cellule cubital de l'aile antérieure droite de l'Abeille représentés par l'indice cubital A et l'indice cubital B, en fait c'est le rapport de (A et B).
- d- Longueur du fémur, du tibia, longueur et largeur du métatarse :** ces caractères sont très importants puisqu'ils sont liés à la patte postérieure qui est un élément essentiel pour la récolte du pollen et donc dans la production du miel.
- e- La coloration du second tergite :** représente la largeur de la bande jaune sur le 2^{ème} tergite abdominal qui peut être selon les races soit totalement noir, soit totalement jaune, soit plusieurs nuances entre les deux.
- f- La longueur du première et troisième sternite :** les sternites qui sont des indicateurs de la taille de l'abdomen ont été recommandées par de nombreux auteurs.

Tableau 2 :Liste des caractères morphologiques étudiés et numéro des figures correspondantes.

Caractères morphologiques	Références des variables	N° de figures
Longueur de la langue	[1]	Fig. 10
Longueur de l'aile antérieure	[2]	Fig. 11
Largeur de l'aile antérieure	[3]	Fig. 11
Longueur de l'aile postérieure	[4]	Fig. 12
Largeur de l'aile postérieure	[5]	Fig. 12
Longueur nervure A	[6]	Fig. 13
Longueur nervure B	[7]	Fig. 13
Indice cubital	[8]	Fig. 13
Longueur du fémur	[9]	Fig. 14
Longueur du tibia	[10]	Fig. 14
Longueur de métatarse	[11]	Fig. 14
Largeur de métatarse	[12]	Fig. 14
Coloration	[13]	Fig. 15
Longueur du 1 ^{ère} sternite	[14]	Fig. 16
Longueur du 3 ^{ème} sternite	[15]	Fig. 17

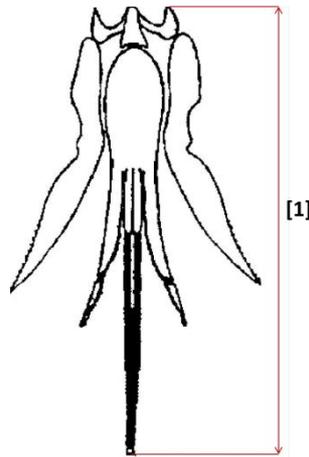


Figure 10. Langue d'une Abeille ouvrière (Ruttner *et al.*, 1978 ; Ruttner, 1988).

([1] : Longueur de la langue).

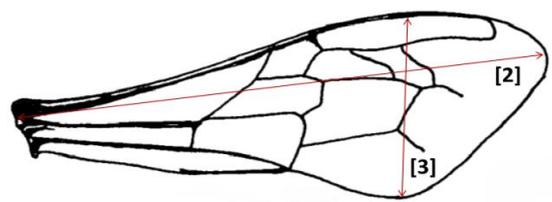


Figure 11. Aile antérieure droite d'une Abeille ouvrière (Ruttner *et al.*, 1978 ; Ruttner, 1988).
 ([2] : Longueur de l'aile antérieure ; [3] : largeur de l'aile antérieure).

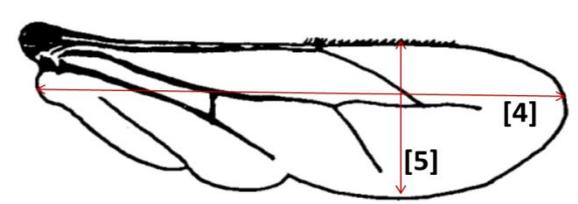


Figure 12. Aile postérieure d'une Abeille ouvrière (Ruttner *et al.*, 1978 ; Ruttner, 1988).
 ([4] : Longueur de l'aile postérieure ; [5] : largeur de l'aile postérieure).

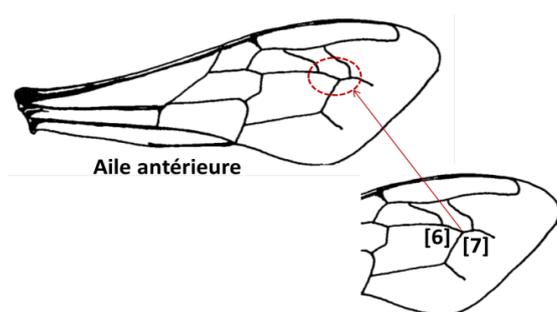


Figure 13. Composantes de l'indice cubital de l'aile antérieure droite (Ruttner *et al.*, 1978; Ruttner, 1988).
 ([6] : Longueur de la nervure A ; [7] : longueur de la nervure B).

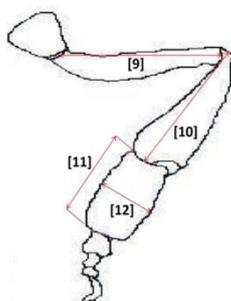


Figure 14. Patte postérieure d'une Abeille ouvrière (Ruttner *et al.*, 1978; Ruttner, 1988).
 ([9]: Longueur du fémur ; [10]: longueur du tibia ; [11]: longueur du métatarse ; [12] : largeur du métatarse).

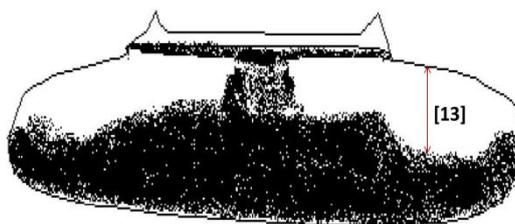


Figure 15. Coloration (Ruttner *et al.*, 1978; Ruttner , 1988).

([13] : largeur de la bande jaune au niveau du 2^{ème} tergite abdominal).

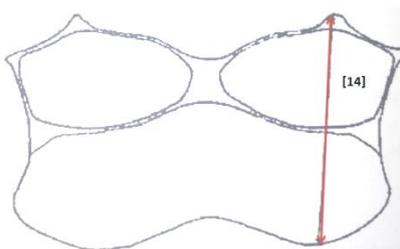


Figure 16. Première sternite d'une Abeille ouvrière (Ruttner *et al.*, 1978; Ruttner, 1988).

([14] : Longueur du 1^{ère} sternite).

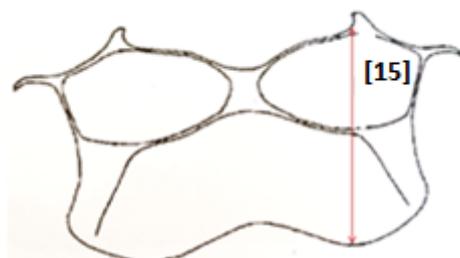


Figure 17. Troisième sternite d'une Abeille ouvrière (Ruttner *et al.*, 1978; Ruttner, 1988).

([15] : Longueur du 3^{ème} sternite).

2.8.3 Méthode de mensuration

Les Abeilles ouvrières adultes sont disséquées une par une à l'aide de matériel de dissection. Les articles sont prélevés et montés entre lame et lamelle dans quelques gouttes d'un milieu de montage du gel glycéro-gélatiné (gélatine : 24 g ; saccharose : 31 g ; glycérine : 76 ml ; eau distillée : 120 ml ; thymol : 0,5 ml) (Hassanein & El Banby, 1956; El Bamby & Aboukorah, 1976 ; Achou, 2007 ; Bendjedid & Achou, 2014).

Tous les caractères biométriques ont fait l'objet de mesures précises réalisées sous une loupe binoculaire (Zeiss) équipés d'un micromètre oculaire étalonné avec l'objectif (X10). Ainsi 15

caractères ont été mesurés pour l'ensemble de nos échantillons soit 23 Abeilles dans chaque sites, soit un total de 69 individus.

2.9 Analyse moléculaire

2.9.1 Extraction des ADN totaux

Nous avons utilisé un Kit d'extraction commercialisé (ZR Tissue & Insect DNA Mini Prep™ Kit; Zymo Research, U.S.A), c'est une technique rapide mais permet d'obtenir des ADN totaux de bonne qualité et de les préserver plus longtemps.

Pour chaque échantillon, l'ADN génomique a été extrait à partir de la tête d'une ouvrière (10 ouvrières/site) selon le protocole du Kit d'extraction. Chaque tête d'Abeille est broyée individuellement dans un tube eppendorf de 2 ml (broyage mécanique).

Les échantillons sont transférés dans des tubes de lyse ZR BashingBead™, Pour des performances optimales, on a ajouté du β -mercaptoéthanol au tampon de lyse génomique jusqu'à une dilution finale de 0,5% (v/v). 750 μ l de la solution de lyse sont ajoutés, avec une bonne homogénéisation par le vortex (10 mn). Les tubes de lyse sont ensuite centrifugés dans une micro-centrifugeuse (10 000 x g/1 mn). 400 μ l de surnageant sont transférés dans un filtre Zymo-Spin™ IV (bouchon orange) dans un tube collecteur et centrifugés (7 000 x g/1 mn). Nous avons ajoutés 1, 200 μ l de tampon de lyse génomique au filtrat dans le tube collecteur de l'étape précédente et on mélange le tout. Ensuite, 800 μ l de ce mélange sont transféré dans une colonne Zymo-Spin™ IIC dans un tube collecteur et centrifugés (10 000 x g/1 mn). Ce qui s'est écoulé du tube de collecte a été jeté et l'étape précédente est répétée. Puis, On ajoute 200 μ l de tampon de pré-lavage DNA Pre-Wash Buffer à la colonne Zymo-Spin™ IIC dans un nouveau tube collecteur et centrifuger (10 000 x g/1 mn). 500 μ l de tampon de lavage g-DNA Wash Buffer sont ajoutés dans la colonne Zymo-Spin™ IIC et une centrifugation (10 000 x g/1 mn) a été réalisé. Pour finir, les colonnes Zymo-Spin™ IIC sont transférées dans des tubes de microcentrifugeuse propres de 1,5 ml dans lesquels on ajoute 30 μ l de tampon d'élution d'ADN directement dans la colonne, puis sont centrifugés (10 000 x g/ 30 s) pour diluer l'ADN (Annexe 1).

La qualité et la concentration de l'ADN ont été mesurées à l'aide d'un spectrophotomètre (NanoPhotometer™ Pearl, Impln GmbH, Schatzbogen, Allemagne).

L'ADN peut être utilisé immédiatement pour des applications moléculaires ou stockés à -20°C pour une utilisation ultérieure.

Par la suite nous avons procédé à des essais afin de déterminer la concentration optimale d'ADN pour les amplifications. Des dilutions d'ADN au 1/10, 1/20, 1/30, 1/40 et 1/50^{ème} ont été testées. Les meilleurs profils ont été obtenus avec la dilution au 1/20^{ème}.

2.9.2 Evaluation de la diversité mitochondriale

- ADN mitochondrial (ADNmt)

La mitochondrie est la source majeure d'énergie cellulaire, sous forme d'ATP, cet organite est présent chez tous les Eucaryotes.

L'ADN mitochondrial d'*A. mellifera* est une molécule circulaire à double brin, sa longueur totale est comprise entre 16500 et 17600 paires de bases (pb) (Smith & Brown, 1990, Hu et al., 2014) (Fig. 18). Il constitue un excellent marqueur pour l'étude de l'évolution et la structure génétique des populations naturelles (Orlando et al., 2003; Naderi et al., 2007 ; Achou et al., 2015). Dans le cas de l'Abeille domestique, tous les membres d'une colonie partagent le même type d'ADNmt (haplotype), puisque la reine transmet l'ADNmt à l'ensemble de sa descendance: ouvrière, mâle et nouvelle reine (Garnery et al., 1992).

Cette transmission uniparentale à évolution clonale constitue un marqueur particulièrement apprécié pour les études phylogénétiques, bien qu'une faible quantité d'ADNmt d'origine paternelle pénètre dans les œufs d'Abeilles lors de la fertilisation, elle disparaît au cours des stades de développement et l'ADNmt des adultes semble être exclusivement d'origine maternelle (Hensuel & Moritz, 1993, Achou, 2007).

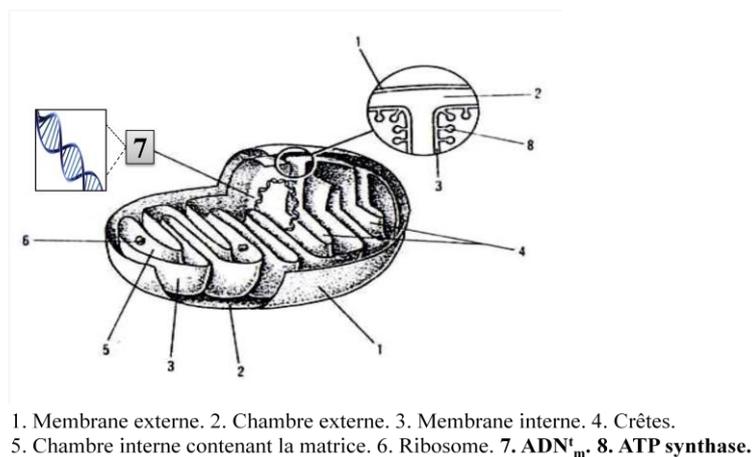


Figure 18. Position de L'ADN mitochondrial au sein de la mitochondrie (François & Roland, 1997).

• **Description de la région intergénique COI-COII (cytochrome oxydase I et II)**

La molécule de l'ADNmt de l'Abeille domestique présente des tailles variables, comprises entre 16500 et 17600 pb (Smith & Brown, 1990). Cette diversité a été étudiée à l'aide d'enzymes de restrictions (Smith *et al.*, 1997) et des données de séquences partielles (Garnery *et al.*, 1995). L'ensemble de ces études suggère que cette exceptionnelle variabilité résulte du polymorphisme de taille de plusieurs régions de la molécule (Smith & Brown, 1990) en particulier la région comprise entre les gènes COI et COII (cytochrome oxydase I et II) (Mensel & Moritz, 1992). Chez *A. mellifera*, la région située entre COI-COII varie de 192 à 832 pb selon les sous espèces. Deux types de séquences peuvent être reconnus dans cette région : P et Q.

L'étude de la région intergénique COI-COII de l'ADNmt est élaboré par Garnery *et al.*, (1993). Elle est une méthode rapide fondée sur l'hydrolyse de l'ADN par l'enzyme de restriction *DraI* de la région COI-COII au niveau du site de restriction AAA/TTT (Vienne & Santoni, 2000) après amplification par PCR (Polymérase Chain Réaction). Ce test permet, non seulement de caractériser les trois lignées mitochondriales, mais aussi de mettre en évidence une importante variabilité génétique dans la population au sein de chaque lignée (Sheppard *et al.*, 1999) (Fig. 19).

- La lignée Africaine **A** possède une séquence P₀ (68 pb) suivie d'une, deux ou de trois répétitions en tandem de la séquence Q (192-196 pb).
- La lignée Ouest-méditerranéenne **M**, il existe un nombre variable de séquences Q, mais la séquence P₀ est remplacée par une séquence plus courte (54 pb) nommée P.
- La lignée Nord méditerranéenne **C** ne possède aucune des séquences P₀ et P, et ne présente qu'un seul exemplaire de la séquence Q (Garnery *et al.*, 1993).

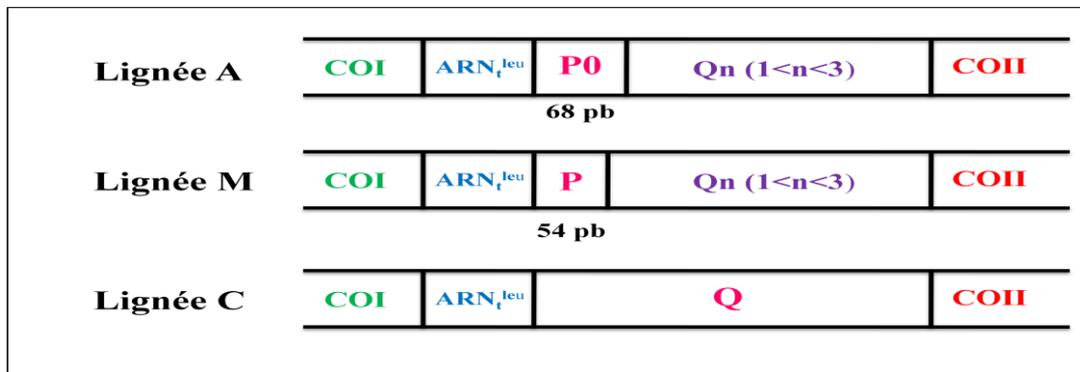


Figure 19. Les régions COI-COII des lignées évolutives A, M et C d'*A. mellifera* (Garnery *et al.*, 1993).

- **Amplification de l'ADN**

Dans le cas de l'ADNmt les amorces E2 et H2 (Garnery, 1992) ont été utilisées pour amplifier la séquence intergénique qui s'étend entre les locus du cytochrome oxydase I et II (Fig. 20). Ces appellations E et H sont en relation avec la séquence clonée. H pour le côté Hind III et E pour le côté Ecor I (Crozier *et al.*, 1989 ; Cornuet *et al.*, 1991 ; Garnery, 1992).

E2 : 5'-GGCAGAATAAGTGCATTG-3'

H2 : 5'-CAATATCATTTGATGACC-3'

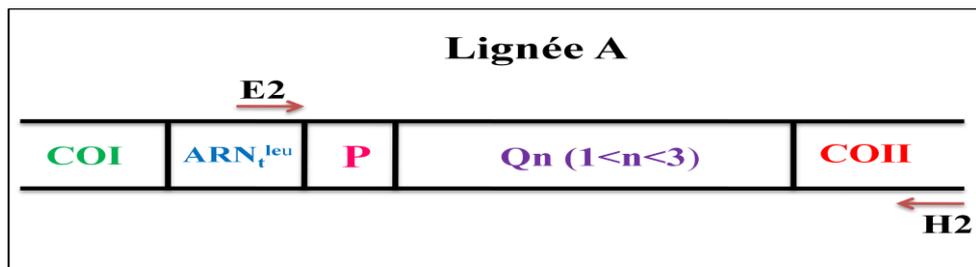


Figure 20. Localisation des amorces E2 et H2 sur la région mitochondriale COI-COII (Garnery *et al.*, 1992).

Cette amplification est effectuée à partir de 1µl d'ADN dilué au 1/20^{ème} dans un volume réactionnel de 25 µl.

Tableau 3: La quantité des produits utilisés dans chacune des polymérases de la réaction en chaîne.

Produits	Volume des produits utilisés dans chaque réaction (µl)	Concentration final
PCR Buffer	5	10X
MgCl ₂	2	25mM
dNTP mix	0.5	10mM
E2	1	100µM
H2	1	100µM
Taq ADN polymerase	0.1	500U/µl
ADN génomique	2	-
H ₂ O	13.40	-

La PCR permet l'amplification in vitro de la région COI-COII de l'ADN mitochondrial de manière exponentielle, chaque PCR a débuté par une dénaturation initiale pendant 3 mn à 92°C, suivi par 30 réactions cycliques et chacun de ces cycles consiste en trois parties: **dénaturation** à 92°C/1 mn, **hybridation** à 48°C/1 mn et **élongation** à 62°C/2 mn. Finalement le mélange réactionnel est élevé à 62°C pour 7 minutes pour admettre la stabilisation de l'ADN synthétisé nouvellement.

Ces différentes étapes d'amplification d'ADN ont été réalisées dans un Thermocycleur C1000™ «CFX96™ Real-Time PCR Detection System, Bio-Rad, U.S.A». Une fois l'amplification achevée, les produits de PCR sont analysés par électrophorèse en gel d'agarose à 1.4%.

- **Détection du polymorphisme de la longueur de fragment de restriction**

La caractérisation du polymorphisme de taille (Q, PQ, PQQ PQQQ) est réalisée par électrophorèse.

Nous dissolvons à chaud (à lamicro-onde) 1,4g d'agarose dans un 100ml de TBE 1X [Tris 90 mM, Borate 90 mM, EDTA 2 mM, pH entre 8,0 et 8,6] à 65°C°. Nous plaçons le moule sur une surface bien horizontale et nous disposons dans les encoches prévues un peigne nécessaire à la réalisation des puits dans le gel. Lorsque la température du gel atteint 50°C (On refroidit dans un agitateur), nous le versons lentement dans la cuve sans dépasser le niveau supérieur des dents du peigne. Nous le laissons refroidir 30 mn environ avant d'enlever délicatement le peigne. Ce gel permet de mettre en évidence les fragments d'ADN de plus de 500 pb.

On met le gel dans la cuve de l'électrophorèse en plaçant les puits du côté de la cathode et nous remplissons la cuve de tampon TBE 1X jusqu'au niveau supérieur du gel. Nous déposons 2 µl du produit d'amplification de la région COI-COII avec 1 µl de tampon de réaction [5X Green GoTaq® Reaction Buffer] de chaque échantillon dans les puits du gel d'agarose avec dépôt du marqueur de taille M7123-100bp DNA ladder marker (Biomatik, Allemagne) dans le premier puits. Le tampon 5X Green GoTaq® permettra de suivre l'avancement de l'électrophorèse car elle migre plus vite que tous les fragments de restrictions.

La migration des fragments amplifiés nécessite 2 heures à 100V dans un tampon TBE 1X, le gel est ensuite plongé pendant 10mn dans une solution de Bromure d'éthidium (BET à 0.5

µg/ml) agent intercalant fluorescent aux ultraviolets (260 nm) afin de visualiser la longueur des fragments de la région inter-génique COI-COII sous un transilluminateur U.V.

- **Détermination des profils de restriction**

Le polymorphisme de la longueur du fragment de restriction est généré par hydrolyse de l'ADN par une endonucléase de restriction *DraI* (4 unités/µl) (Takara Bio Inc) dans un volume total de 10µl de [1 µl d'enzyme de restriction *DraI*, 1 µl de tampon X10, 0.2µl BSA, 2.8µl d'H₂O et 5µl de produit de la PCR]. La digestion a lieu sous incubation à 37°C pendant 24 heures. L'enzyme *DraI* hydrolyse la région COI-COII au niveau du site de restriction AAA/TTT (Vienne & Santoni, 2000).

Les différents profils de restriction sont visualisés sur un transilluminateur U.V. et les images de gels ont été enregistrées au format jpeg pour stockage.

2.10 Dosage des biomarqueurs :

2.10.1 Dosage de la glutathion S-transférase

La mesure de l'activité de la glutathion S-transférase (GST) est déterminée selon la méthode de Habiget *al.* (1974). Elle est basée sur la réaction de conjugaison entre la GST et un substrat, le CDNB (1-chloro 2, 4 dinitrobenzène) en présence d'un cofacteur le glutathion (GSH).

Les échantillons (Abdomen) sont homogénéisés dans 1 ml de tampon phosphate (0,1 M, pH 6). L'homogénat est centrifugé à 14000 tours/mn pendant 30 mn et le surnageant récupéré servira comme source d'enzyme.

Le dosage consiste à faire réagir 200 µl du surnageant avec 1,2 ml du mélange CDNB (1mM)/GSH (5 mM) [20,26 mg CDNB, 153,65 mg GSH, 1 ml éthanol, 100 ml tampon phosphate (0,1 M, pH 6)]. La lecture des absorbances est réalisée dans un spectrophomètre UV/visible (WPA). Elle est effectuée toutes les 1 mn pendant 5 minutes à une longueur d'onde de 340 nm contre un blanc contenant 200 µl d'eau distillée remplaçant la quantité du surnageant. L'activité spécifique est déterminée d'après la formule suivante:

$$\text{Activité spécifique de la GST } (\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg de protéines}) = \frac{\Delta DO/\text{mn}}{e} \times \frac{Vt}{Vs} / \text{mg de protéines}$$

X : micromole de substrat hydrolysé par minute et par mg de protéines ($\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines).

ΔDo : pente de la droite de régression obtenue après hydrolyse du substrat en fonction du temps.

e : 9,6 coefficient d'extinction molaire du CDNB ($\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

V_t : volume total dans la cuve : 1,4 ml [0,2 ml surnageant + 1,2 ml du mélange CDNB/GSH].

V_s : volume du surnageant dans la cuve: 0,2 ml.

mg de protéines: quantité de protéines exprimée en mg.

2.10.2 Dosage de l'acétylcholinestérase

Le dosage de l'acétylcholinestérase (AChE) est réalisé selon la méthode d'Ellman *et al.* (1961) qui consiste à fournir à l'enzyme un substrat, l'acétylthiocholine (ASCh) dont l'hydrolyse libère de l'acide acétique et de la thiocholine (SCh). Cette dernière en présence de DTNB (acide 5, 5'-dithio-bis-2-nitrobenzoïque) forme un complexe de couleur jaune dont l'intensité est lue à une longueur d'onde de 412 nm. Les têtes des abeilles ouvrières (pool de 2 têtes) sont homogénéisées dans 1 ml de solution détergente (solution D) [38,03 mg EGTA (acide éthylène glycol-bis, β -aminoéthyl éther NNN'N' tétra-acétique), 1ml Triton X 100%, 5,845 g NaCl (chlorure de sodium), 80 ml tampon tris (10 mM, pH 7)]; à l'aide d'un homogénéisateur à ultrasons, puis centrifugés (5000 tours/mn, 5 mn). Le surnageant récupéré servira comme source d'enzyme.

Le dosage de l'activité AChE est réalisé sur une fraction aliquote de 100 μl de surnageant à laquelle on ajoute 100 μl de DTNB préparé extemporanément [39,6 mg DTNB, 15 mg CO_3HNa (bicarbonate de sodium), 10 ml tampon tris (0,1 M, pH 7)] et 1 ml de tampon tris (0,1 M, pH 7). Après 3 à 5 minutes, 100 μl de substrat acétylthiocholine préparé extemporanément [23,6 mg ASCh, 1 ml eau distillée] sont ajoutés. La lecture des absorbances (spectrophomètre WPA) s'effectue toutes les 4 mn pendant 20 mn à une longueur d'onde de 412 nm contre un blanc où 100 μl de la solution détergente remplace les 100 μl du surnageant.

$$\text{Activité spécifique de l'AChE } (\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg de protéines}) = \frac{\Delta DO/\text{mn}}{e} \times \frac{V_t}{V_s} / \text{mg de protéines}$$

X : micromole de substrat hydrolysé par minute et par mg de protéines ($\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines).

ΔDo : pente de la droite de régression obtenue après hydrolyse du substrat en fonction du temps.

e : $1,36 \times 10^4$: coefficient d'extinction molaire du DTNB ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

V_t : volume total dans la cuve : 1,3 ml [0,1 ml surnageant + 0,1 ml DTNB + 1 ml tampon tris (0,1 M, pH 7) + 0,1 ml acétylthiocholine].

V_s : volume du surnageant dans la cuve: 0,1 ml.

mg de protéines : quantité de protéines exprimée en mg.

2.10.3 Dosage des protéines

Les protéines sont quantifiées selon la technique de Bardford *et al.*, (1976) sur une fraction aliquote de 0,1 ml de l'homogénat avec 4 ml de bleu brillant de Coomassie (BBC) (G 250, Merk) comme réactif (50 mg de bleu brillant de Coomassie, 25 ml d'éthanol (95%), 50 ml d'acide orthophosphorique (85%) et complété à 500 ml avec l'eau distillée) et l'albumine sérum de bœuf (BSA) (Sigma, France) comme standard.

La lecture des absorbances s'effectue à une longueur d'onde de 595 nm, et la gamme d'étalonnage est réalisée à partir d'une solution d'albumine de bœuf (1mg/ml) selon les indications ci-dessous.

Tableau 4. Dosage des protéines, réalisation de la gamme d'étalonnage.

Tubes	1	2	3	4	5	6
Solution d'albumine (μ l)	0	20	40	60	80	100
Eau distillée (μ l)	100	80	60	40	20	0
Réactif BBC (ml)	4	4	4	4	4	4

2.11 Analyses statistiques

2.11.1 Morphométrie

2.11.1.1 Analyses statistiques univariées

- Description des données

Pour mieux décrire les différentes caractéristiques morphométriques des Abeilles récoltés, nous avons calculés certains paramètres statistiques de base tels que la moyenne arithmétique (\bar{X}), qui est un paramètre de position et de tendance centrale, l'écart type (S) qui mesure la dispersion de données autour de la moyenne, les valeurs minimales (X_{\min}) et maximales (X_{\max}) qui donnent toutes les deux une idée sur l'étendue des données, et enfin l'effectif (n) qui nous renseigne sur l'importance des données traités.

Les calculs ont été réalisés sur 3 sites à l'aide du logiciel d'analyse et de traitement statistique des données Minitab version 16.(Penn State College, PA, USA).

- **Comparaison des moyennes entre sites: Analyse de la variance (ANOVA)**

Pour comparer, entre les trois sites, les moyennes de chacune des 15 caractéristiques (variables), nous avons utilisé le test d'analyse de la variance à un critère de classification modèle fixe. Ce test consiste à comparer les moyennes de plusieurs populations à partir de données d'échantillons aléatoires, simples et indépendants (Dagnelie, 1982, 1999).

2.11.1.2 Analyses statistiques bivariées

- **Corrélation entre caractéristique morphométriques**

La méthode statistique bivariée utilisée consiste essentiellement à calculer le coefficient de corrélation linéaire de "Bravais-Pearson" entre les variables prises deux à deux. Il mesure l'intensité du lien qui existe entre deux caractéristiques ou variables quantitatives quelconques, pour autant que cette liaison soit linéaire ou approximativement linéaire (Dagnelie, 1999).

Il est compris entre +1 et -1. Il est positif quand les deux variables augmentent en même temps ou diminuent en même temps, et il est négatif quand l'une augmente et l'autre diminue et vice-versa.

Le logiciel Minitab fournit chaque fois la valeur du coefficient de corrélation et la valeur de la probabilité P correspondante afin de tester la signification de la corrélation en question.

2.11.1.3 Analyses statistiques multivariées

L'analyse multivariée, multidimensionnelle ou à plusieurs variables peut être considérée comme formée de l'ensemble des méthodes statistiques qui ont pour but l'étude des relations existantes entre plusieurs variables dépendantes et indépendantes (Dagnelie, 1982).

- **Comparaison des vecteurs de moyennes entre sites : Analyse de la variance multivariée (MANOVA)**

La comparaison des 3 sites, entre eux, pour l'ensemble des 15 variables étudiées, a été réalisée à l'aide de l'analyse de la variance multivariée en utilisant trois tests statistiques qui sont : Wilk's Lambda, Lawley-Hotteling et Pillai's Trace. Cependant aucun de ces tests n'est considéré comme étant le plus puissant et aucun ne peut être recommandé de manière préférentielle (Dagnelie, 1975). Selon Huberty (1994) le test de Wilk's est le plus populaire. Cette méthode d'analyse est une extension de l'analyse univariée, quand on a plusieurs variables qui ont été observées simultanément sur les mêmes individus (sites).

- **Analyse en composantes principales (ACP)**

L'analyse en composantes principales est une méthode exploratoire et descriptive (Dagnelie, 1982 ; Palm, 1998). Elle est utilisée pour interpréter une matrice de données sans structure particulière ne comportant, à priori, aucune distinction, ni entre les variables, ni entre les individus. Elle a pour but de remplacer les p variables initiales fortement corrélées entre elles en p variables appelées composantes principales ou axes principaux synthétiques non corrélés entre elles, et de variance progressivement décroissante. Les premières composantes pouvant éventuellement faire l'objet d'une interprétation particulière et les dernières pouvant généralement être négligées (Dagnelie, 1982).

Cette méthode a été appliquée à la matrice de données globales de dimensions (n x p), avec n=3 sites et p= 15 variables afin d'étudier la structure des colonies d'Abeilles.

2.11.2 Biomarqueurs

Les résultats obtenus sont exprimés par la moyenne arithmétique plus ou moins l'écart type ($m \pm SD$). L'étude statistique est réalisée à l'aide du logiciel d'analyse et de traitement statistique des données Minitab version 16. (Penn State College, PA, USA).

Les données sont traitées par l'analyse de la variance (ANOVA) à deux critères de classification suivis du test HSD (test de la différence franchement significative) de Tukey, nous a permis de classer les différentes moyennes.

3. Résultats :

3.1 Biométrie de l'Abeille

3.1.1 Analyse univariée

- **Caractérisation morphologique des populations d'Abeilles Algériennes**

Pour déterminer les caractéristiques biométriques des Abeilles récoltées, nous avons calculé la moyenne arithmétique (\bar{X}), l'écart type (s), les valeurs minimales (X_{\min}) et les valeurs maximales (X_{\max}) et enfin l'effectif (n) de chaque variable biométrique de chacun des 3 sites étudié.

Les résultats relatifs à cette analyse sont mentionnés dans le tableau 5.

L'examen de ce tableau révèle que les moyennes de **la longueur de la langue (variable X1)**, varient entre 8,92 mm (site 1), 8,16 mm (site 2) et 8,76 mm pour le site 3. Quant à leurs écarts types ils varient respectivement de 0,78, 0,40 et 0,73. Les valeurs maximales sont de 9,99 mm pour le site 1, 8,66 mm pour le site 2 et enfin 9,55 mm pour le site 3, les valeurs minimales sont respectivement de 7,55 mm, 7,33 mm et 6,88 mm.

En ce qui concerne **la longueur de l'aile antérieure (variable X2)**, les moyennes varient entre 13,56 mm (site1), 12,72 mm (site 2) et 13,28 mm (site 3). Les écarts types varient respectivement de 0,28, 0,21 et 0,18. Les valeurs maximales pour chaque site sont 13,99 mm, 13,11 mm et 13,55 mm. Les valeurs minimales varient entre 12,88 mm (site 1 et 3) et 12,22 mm (site 2).

Les moyennes de **la largeur de l'aile antérieure (variable X3)** sont comprises entre 4,58 mm (site 1), 4,29 mm (site 2) et 4,45 mm (site 3). Ses valeurs maximales sont de 4,66 mm (site 1 et 3) et 4,44 mm (site 2) et les valeurs minimales sont de 4,44 mm (site 1 et 3) et 4,22 mm (site 2). Les écarts types de cette variable varient entre 0,10 (site 1 et 2) et 0,06 (site 3).

Quant aux **longueurs et les largeurs moyennes de l'aile postérieure (variable X4 et X5)**, elles présentent respectivement des moyennes de 9,64 mm et de 2,62 mm pour le site 1; 9,19 mm et 2,51 mm (site 2) et enfin 9,57 mm et 2,61 mm (site 3). Pour la longueur maximale, elle est de 9,77 mm (site 1 et 3) et 9,33 mm (site 2); la longueur minimale de l'aile postérieure est de 9,33 mm (site 1 et 3) et 8,88 mm (site 2). Celle de la largeur maximale est de 2,66 mm et la largeur minimale est de 2,44 mm. Les écarts types variant de 0,16 (site 1 t 2) et 0,15 (site3) pour la longueur de l'aile postérieure et entre 0,08, 0,07 et 0,06 pour la largeur de l'aile postérieure.

Les longueurs moyennes de la nervure A (X6) se situent entre 8,10 mm (site1), 8,15 mm (site 2) et 8,25 mm (site 3). La longueur minimale de la nervure A est de 7,77 mm et la valeur

maximale est de 8,88 mm pour les 3 sites. Les écarts types sont respectivement entre 0,52, 0,54 et 0,56. En revanche, **les longueurs moyennes de la nervure B (X7)** se situent entre 4,34 mm (site 1) et 3,66 mm (site 2 et 3), les écarts types de ce paramètre sont entre 0,31 (site 1) et 0,52 (site 2 et 3). Les valeurs maximales et minimales sont comme suit : 4,44 mm et 3,33 mm.

Pour les 69 abeilles, les moyennes de **l'indice cubital (X8)** se situent respectivement entre 2,08 mm, 2,50 mm et 2,53 mm. Les écarts types sont de 0,20, 0,34 et 0,33. La valeur minimale de cette variable est de 1,94 mm et maximale entre 2,58 mm (site 1) et 2,95 mm (site 2 et 3).

Les valeurs maximales et minimales de **la longueur et la largeur du métatarse (X9 et X10)** sont respectivement : entre 3,55 mm (site 1) et 3,33 mm (site 2 et 3) et entre 3,11 mm (site 1 et 2) et 2,88 mm (site 3) pour la longueur, 1,66 mm et 1,55 mm (3 sites) pour la largeur du métatarse. Quand aux écarts types sont entre 0,12 (site 1 et 3) et 0,06 (site 2) pour la longueur et entre 0,05 (site 1 et 2) et 0,04 (site 3) pour la largeur du métatarse. En revanche, les moyennes de la variable **(X9)** sont respectivement entre 3,33 mm, 3,12 mm et 3,24 mm et de la variable **(X10)** sont 1,62 mm, 1,59 mm et 1,63 mm.

Pour les trois sites échantillonnés, la valeur maximale de **la longueur du fémur (X11)** est de 3,99 mm pour site 1 et 3 et 3,77 mm pour le site 2, la valeur minimale est de 3,55 mm pour les 3 sites. Les longueurs moyennes de cette variable variant entre 3,87 mm (site 1), 3,71 mm (site 2) et 3,86 mm (site 3). Concernant les écarts types, ces derniers se situent entre 0,16, 0,09 et 0,12 respectivement.

En ce qui concerne, la variable **(X12)** représentant **la longueur du tibia**, les valeurs moyennes sont comprises entre 4,62 mm (site 1), 4,38 mm (site 2) et 4,49 mm (site 3). Les deux valeurs extrêmes, minimales sont de 4,44 mm (site 1) et 4,22 mm (site 2 et 3) et maximales sont de 4,88 mm, 4,44 mm et 4,66 mm respectivement. Les écarts types varient entre 0,10, 0,09 et 0,11.

La **coloration (variable X13)**, présente des moyennes comprises entre 1,47 mm (site 1 et 3) et 1,37 mm (site 2). Les écarts types variaient entre 0,08 (site 1) et 0,10 (site 2 et 3). Les valeurs maximales de la largeur de la bande jaune sur le 2ème tergite sont 1,56 mm (site 1), 1,49 mm (site 2) et 1,63 mm (site 3) et minimales sont entre 1,27 mm (site 1 et 3) et 1,13 mm (site 2).

Enfin les moyennes, représentant les indices calculés de **la longueur de la 1^{ère} sternite (variable X14)** et de **la longueur de la 3^{ème} sternite (variable X15)**, sont respectivement :

4,11 mm (site 1), 3,82 mm (site 2) et 4,30 mm (site 3) pour la longueur du 1^{ère} sternite, et 3,40 mm, 3,13 mm et 3,33 mm pour la longueur du 3^{ème} sternite. Quand aux écarts types, ils sont de 0,32, 0,34 et 0,18 pour la **variable X14** et de 0,17, 0,07 et 0,11 pour la **variable X15**. Les valeurs maximales de ces paramètres sont 4,66 mm (**variable X14**) et 3,77 mm, 3,33 mm et 3,55 mm (**variable X15**), les valeurs minimales variaient entre 3,55 mm (site 1 et 2) et 3,99 mm (site3) pour la longueur du 1^{ère} sternite et égale à 3,11 mm pour la longueur du 3^{ème} sternite.

Tableau 5: Paramètres statistiques des 15 caractères morphologiques pour l'ensemble des 3 sites.

Caractères morphométriques	Sites	n	m ± s	X _{min}	X _{max}
Longueur de la langue (X1) en mm	1	23	8,92 ± 0,78	7,55	9,99
	2	23	8,16 ± 0,40	7,33	8,66
	3	23	8,76 ± 0,73	6,88	9,55
Longueur de l'aile antérieure (X2) en mm	1	23	13,56 ± 0,28	12,88	13,99
	2	23	12,72 ± 0,21	12,22	13,11
	3	23	13,28 ± 0,18	12,88	13,55
Largeur de l'aile antérieure (X3) en mm	1	23	4,58 ± 0,10	4,44	4,66
	2	23	4,29 ± 0,10	4,22	4,44
	3	23	4,45 ± 0,06	4,44	4,66
Longueur de l'aile postérieure (X4) en mm	1	23	9,64 ± 0,16	9,33	9,77
	2	23	9,19 ± 0,16	8,88	9,33
	3	23	9,57 ± 0,15	9,33	9,77
Largeur de l'aile postérieure (X5) en mm	1	23	2,62 ± 0,08	2,44	2,66
	2	23	2,51 ± 0,07	2,44	2,66
	3	23	2,61 ± 0,06	2,44	2,66
Longueur de nervure A (X6) en mm	1	23	8,10 ± 0,52	7,77	8,88
	2	23	8,15 ± 0,54	7,77	8,88
	3	23	8,25 ± 0,56	7,77	8,88
Longueur de nervure B (X7) en mm	1	23	4,34 ± 0,31	3,33	4,44
	2	23	3,66 ± 0,52	3,33	4,44
	3	23	3,66 ± 0,52	3,33	4,44
Indice cubital (X8) en mm	1	23	2,08 ± 0,20	1,94	2,58
	2	23	2,50 ± 0,34	1,94	2,95
	3	23	2,53 ± 0,33	1,94	2,95
Longueur du métatarse (X9) en mm	1	23	3,33 ± 0,12	3,11	3,55
	2	23	3,12 ± 0,06	3,11	3,33
	3	23	3,24 ± 0,12	2,88	3,33
Largeur du métatarse (X10) en mm	1	23	1,62 ± 0,05	1,55	1,66
	2	23	1,59 ± 0,05	1,55	1,66
	3	23	1,63 ± 0,04	1,55	1,66
Longueur du fémur (X11) en mm	1	23	3,87 ± 0,16	3,55	3,99
	2	23	3,71 ± 0,09	3,55	3,77
	3	23	3,86 ± 0,12	3,55	3,99
Longueur du tibia (X12) en mm	1	23	4,62 ± 0,10	4,44	4,88
	2	23	4,38 ± 0,09	4,22	4,44
	3	23	4,49 ± 0,11	4,22	4,66
Coloration (X13) en mm	1	23	1,47 ± 0,08	1,27	1,56
	2	23	1,37 ± 0,10	1,13	1,49
	3	23	1,47 ± 0,10	1,27	1,63
Longueur du 1 ^{ère} sternite (X14) en mm	1	23	4,11 ± 0,32	3,55	4,66
	2	23	3,82 ± 0,34	3,55	4,66
	3	23	4,30 ± 0,18	3,99	4,66
Longueur du 3 ^{ème} sternite (X15) en mm	1	23	3,40 ± 0,17	3,11	3,77
	2	23	3,13 ± 0,07	3,11	3,33
	3	23	3,33 ± 0,11	3,11	3,55

Site 1 : El-Taher, Site 2 : El-Ancer, Site 3 : Ziama mansouriah
n : effectifs, m : moyenne, s : écart type, X_{max}: valeurs maximale, X_{min} : valeurs minimale

• **Comparaison entre sites des caractéristiques moyennes: Analyse de la variance (ANOVA)**

Les résultats du test d'analyse de la variance univariée modèle fixe appliqué à chacune des 15 variables mesurées, pour l'ensemble des 3 sites échantillonnés figurent dans le tableau 6. L'examen de ce tableau montre qu'il existe entre les 3 sites des différences très hautement significatives pour les moyennes des variables biométriques (X1, X2, X3, X4, X5, X7, X8, X9, X11, X12, X13, X14 et X15), significative pour la largeur du métatarse (variable X10) et non significative pour la longueur de la nervure A de l'indice cubitale (variable X6).

Tableau 6. Comparaison intersites de moyennes relatives aux 15 variables biométriques des 3 sites d'échantillonnage (ANOVA).

Caractères morphométriques	ddl	SCE	CM	F _{obs}	P
Longueur de la langue	2	7,3023	3,6512	8,27	0,001 ***
Longueur de l'aile antérieure	2	8,4152	4,2076	78,46	0,000 ***
Largeur de l'aile antérieure	2	0,95257	0,47628	52,97	0,000 ***
Longueur de l'aile postérieure	2	2,7229	1,3614	54,40	0,000 ***
Largeur de l'aile postérieure	2	0,177817	0,088909	15,20	0,000 ***
Longueur de nervure A	2	0,2500	0,1250	0,43	0,655 NS
Longueur de nervure B	2	6,9998	3,4999	16,21	0,000 ***
Indice cubital	2	2,9164	1,4582	16,05	0,000 ***
Longueur du métatarse	2	0,51053	0,25527	21,21	0,000 ***
Largeur du métatarse	2	0,022096	0,011048	4,13	0,021 *
Longueur du fémur	2	0,38299	0,19150	10,96	0,000 ***
Longueur du tibia	2	0,65796	0,32898	27,74	0,000 ***
Coloration	2	0,16426	0,08213	8,20	0,001 ***
Longueur du 1 ^{ère} sternite	2	2,6348	1,3174	14,90	0,000 ***
Longueur du 3 ^{ème} sternite	2	0,87541	0,43770	27,35	0,000 ***

ddl : degrés de libertés, SCE : somme des carrés des écarts, CM : carré moyen, F_{obs} : valeur F de Fisher, P : seuil de signification

*$p \leq \alpha = 0,001$: (***) différence très hautement significative*

$p \leq \alpha = 0,05$: () différence significative*

$p \geq \alpha = 0,001$: (NS) non-significative

3.1.2 Corrélation simple

Nous avons calculé les coefficients de corrélation linéaire entre les 15 variables prises deux à deux ainsi que les valeurs des probabilités P correspondantes pour l'ensemble des 3 sites.

La liste des corrélations significatives, hautement significatives et très hautement significatives est donnée par le tableau 7, ainsi que la matrice de corrélation globale en Annexe 2.

L'examen de la matrice de corrélation de tableau 7 montre qu'il existe des corrélations positives et des corrélations négatives. Parmi ces corrélations, on observe des corrélations justes significatives, des corrélations hautement significatives et des corrélations très hautement significatives. Le tableau 7 synthétise l'essentiel des corrélations obtenues entre les 15 variables.

L'analyse de la matrice globale permet de constater que l'indice cubital (X8) est bien corrélé positivement ($r = 0,357$) avec la longueur de la nervure A (X6), et négativement avec la longueur de la nervure B (X7) ($r = -0,901$). Ceci est logique dans la mesure où l'indice cubital est le rapport des deux variables X6/X7.

Il existe aussi une corrélation positive ($r = 0,798$) entre la longueur (X2) et la largeur (X3) de l'aile antérieure qui augmentent ou diminuent en même temps.

On constate dans cette matrice également, des corrélations positives d'une part, entre la longueur de l'aile antérieure (X2) et la longueur de l'aile postérieure (X4) et la largeur de l'aile postérieure (X5) ($r = 0,729$ et $r = 0,640$), et d'autre part, entre la largeur de l'aile antérieure (X3) et la longueur de l'aile postérieure (X4) et la largeur de l'aile postérieure (X5) ($r = 0,629$ et $r = 0,632$) ; ceci montre que la taille des ailes antérieures et postérieures augmentent ou diminuent en même temps.

En plus, il existe une corrélation positive ($r = 0,175$) entre la longueur et la largeur du métatarse (X9 et X10) qui montre que ces deux derniers augmentent ou diminuent en même temps. Enfin, les deux variables, la longueur du fémur et du tibia (X11 et X12) présentent une corrélation positive ($r = 0,223$).

Tableau 7. Liste des corrélations significatives, hautement et très hautement significatives des 3 sites.

Corrélations positives			Corrélations négatives		
Significatives	Hautement significatives	Très hautement significatives	Significatives	Hautement significatives	Très hautement significatives
X1 et X7	X1 et X3	X1 et X2	X1 et X8	X4 et X8	X2 et X8
X1 et X9	X3 et X13	X1 et X4	X8 et X9	X8 et X12	X3 et X8
X1 et X10	X4 et X11	X2 et X3	X8 et X15		X7 et X8
X1 et X12	X4 et X13	X2 et X4			
X1 et X13	X5 et X9	X2 et X5			
X1 et X15	X5 et X11	X2 et X7			
X 2 et X10	X6 et X8	X2 et X9			
X2 et X14	X7 et X12	X2 et X11			
X3 et X14	X9 et X13	X2 et X12			
X4 et X10	X13 et X14	X2 et X13			
X5 et X6		X2 et X15			
X5 et X14		X3 et X4			
X7 et X9		X3 et X5			
X7 et X10		X3 et X7			
X7 et X15		X3 et X9			
X9 et X14		X3 et X11			
X10 et X11		X3 et X12			
X10 et X12		X3 et X15			
X10 et X13		X4 et X5			
X10 et X15		X4 et X7			
X11 et X12		X4 et X9			
X11 et X13		X4 et X12			
X11 et X14		X4 et X14			
X12 et X13		X4 et X15			
X12 et X14		X5 et X12			
		X5 et X15			
		X9 et X11			
		X9 et X12			
		X9 et X15			
		X11 et X15			
		X12 et X15			
		X13 et X15			
		X14 et X15			

3.1.3 Analyse multivariée

- **Analyse de la variance multivariée (MANOVA)**

L'analyse de la variance multivariée est une extension naturelle de l'analyse de la variance univariée au cas où plusieurs variables quantitatives ont été observées simultanément sur les mêmes objets. Par rapport à une série d'analyses univariées indépendantes, l'analyse multivariée prend en compte les corrélations qui existent très souvent entre les variables étudiées (Palm, 1998).

Les résultats de l'analyse de la variance multivariée sont indiqués dans le tableau 8.

On distingue les valeurs de F_{obs} avec les probabilités associées, et ce pour chacun des trois tests pour l'égalité des vecteurs des moyennes des caractéristiques des 3 sites échantillonnés.

Tableau 8. Comparaison entre sites, des vecteurs de moyennes des 15 variables morphométriques à l'aide de la MANOVA.

Tests	Valeurs observées du test	F_{obs}	P
Wilk's	0,08051	8,751	0,000 ***
Lawley-Hotelling	6,12724	10,416	0,000 ***
Pillai's	1,34569	7,267	0,000 ***
<i>F_{obs} : valeur F de Fisher, P : seuil de signification</i>			
<i>p ≤ α = 0,001 : (***) différence très hautement significative</i>			

Pour cette comparaison enter-sites, les trois tests (Wilk's Lambda, Hotelling-Lawley et Pillai's Trace) de la MANOVA conduisent au rejet de l'hypothèse d'égalité des vecteurs de moyennes pour l'ensemble des 3 sites avec des différences très hautement significatives.

- **Analyse en composantes principales**

Nous avons utilisé l'analyse en composantes principales (ACP) pour représenter les Abeilles dans les 3 sites étudiés. C'est une technique descriptive permettant d'étudier les relations qui existent entre variables quantitatives, sans tenir compte, à priori, d'une quelconque structure, ni des variables ni des individus (Palm, 1998).

Le tableau ci-dessous (Tab. 9) présente les valeurs propres de la matrice de corrélation, les pourcentages et les pourcentages cumulés de la variance expliquée par chacune des composantes principales pour l'ensemble des données de la matrice (n x p).

Tableau 9. Valeurs propres, pourcentages et pourcentages cumulés des variations totales expliquées par les quatre composantes principales.

	CP1	CP2	CP3	CP4
Valeur propre	5,7974	1,7872	1,3438	1,0928
Pourcentage %	38,6	11,9	9	7,3
Pourcentage cumulé %	38,6	50,6	59,5	66,8
<i>CP : composant principale</i>				

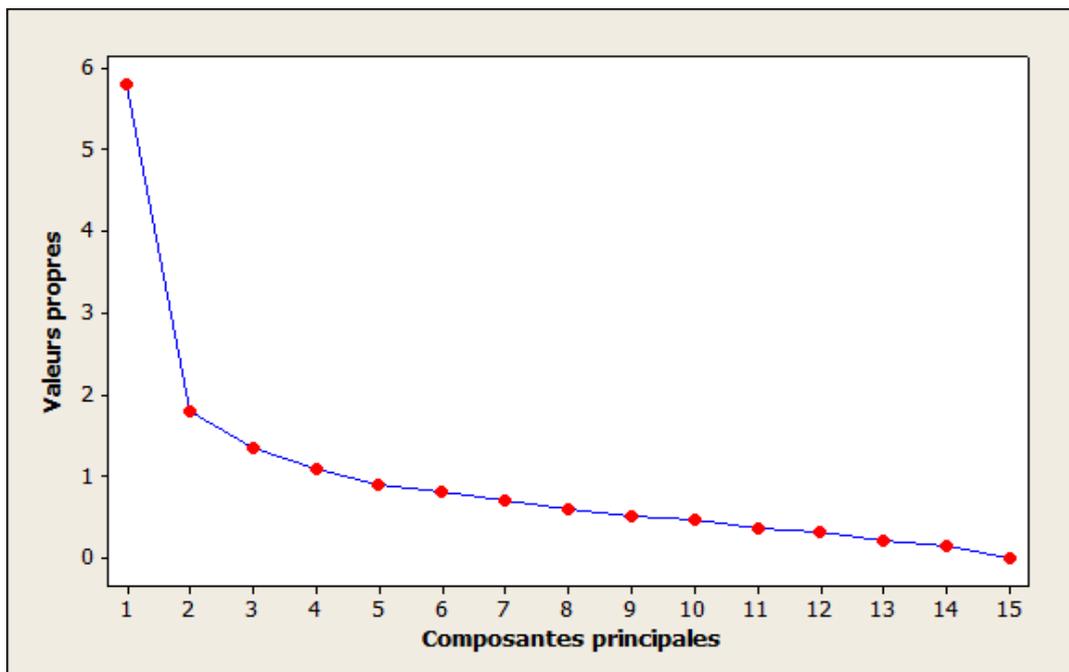


Figure 21. Diagramme en cône des composantes principales et leurs valeurs propres.

La première composante principale CP1 prend en compte 38,6 % de la variabilité ; c'est la plus importante puisque les autres ne représentent que 11,9 %, 9% et 7,3 % respectivement. A partir de la 5^{ème} les composantes sont moins utiles et correspondent à des valeurs propres inférieures à l'unité (<1).

Tableau 10. Matrice de corrélations des variables initiales avec les quatre premières composantes principales.

Variables	CP1	CP2	CP3	CP4
Longueur de la langue	0,211	-0,036	0,112	-0,291
Longueur de l'aile antérieure	0,379	0,027	0,077	0,097
Largeur de l'aile antérieure	0,348	-0,000	0,106	0,255
Longueur de l'aile postérieure	0,335	-0,017	0,006	-0,000
Largeur de l'aile postérieure	0,263	0,240	0,274	0,288
Longueur nervure A	0,024	0,293	0,694	-0,179
Longueur nervure B	0,230	-0,536	0,229	-0,093
Indice cubital	-0,205	0,630	0,088	0,012
Longueur du métatarse	0,282	0,044	-0,139	0,169
Largeur du métatarse	0,158	0,003	0,129	-0,721
Longueur du fémur	0,227	0,255	-0,098	0,069
Longueur du tibia	0,291	-0,032	0,077	0,133
Coloration	0,197	0,229	-0,319	-0,347
Longueur du 1 ^{ère} sternite	0,186	0,161	-0,409	-0,159
Longueur du 3 ^{ème} sternite	0,315	0,154	-0,182	-0,006
<i>CP : composant principale</i>				

L'examen des corrélations des variables avec la première composante CP1 montrent que toutes les variables sont positivement corrélées avec la première composante principale à l'exception de l'indice cubital.

La 2^{ème} composante CP2 est corrélée positivement avec la longueur de l'aile antérieure, la largeur de l'aile postérieure, la longueur de la nervure A, l'indice cubital, la longueur et la largeur du métatarse, la longueur du fémur, coloration et la longueur de la 1^{ère} et la 3^{ème} sternite.

La 3^{ème} composante CP3 est corrélée avec dix variables qui sont : la longueur de la langue, la longueur et la largeur des ailes antérieures et postérieures, la longueur de la nervure A et B, l'indice cubital, la largeur du métatarse et la longueur du tibia.

Enfin la 4^{ème} composante quant à elle est aussi corrélée positivement avec la longueur et la largeur de l'aile antérieure, la largeur de l'aile postérieure, l'indice cubital, la longueur du métatarse, longueur du fémur et du tibia.

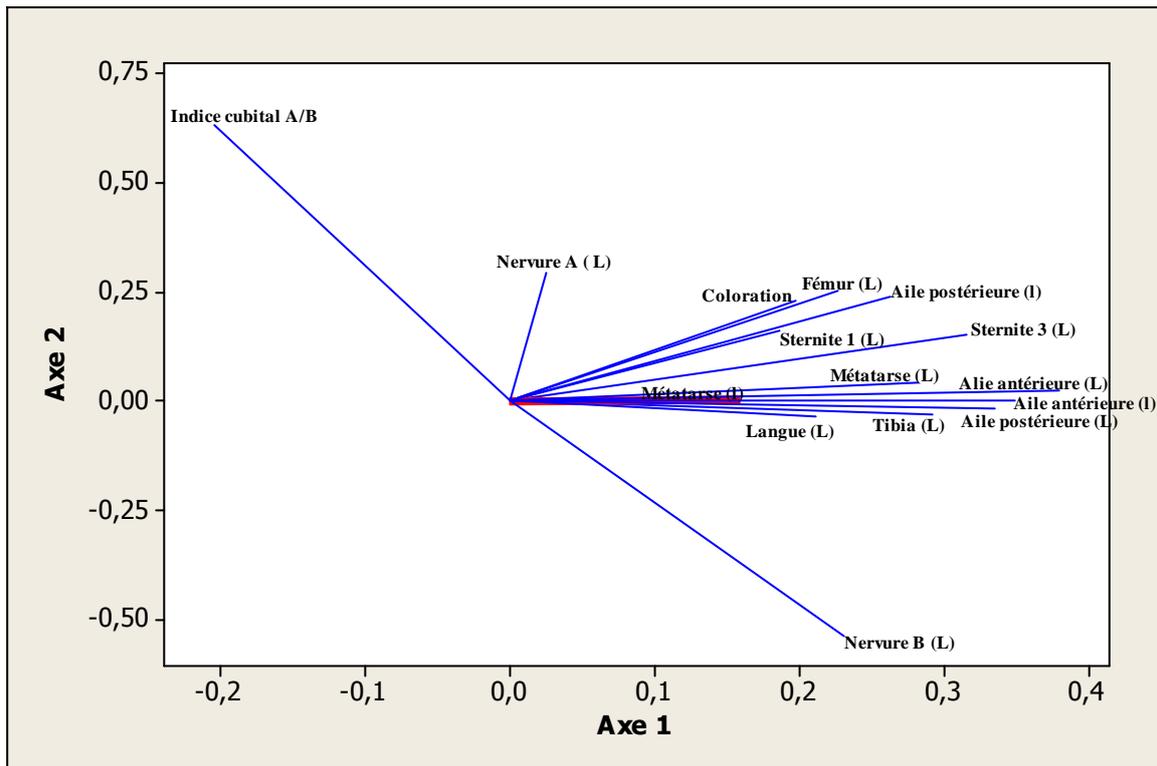


Figure 22. Représentation graphique des corrélations des 15 variables initiales sur le plan composé des axes 1 et 2 de l'ACP.

L'étude de la figure 22 représentant les corrélations des 15 variables par rapport aux axes 1 et 2 de l'ACP montre que la longueur de la nervure B est nettement corrélée positivement selon l'axe 1, tandis que la longueur de la nervure A se rapproche de 0. L'indice cubital est corrélé négativement selon l'axe 1 et positivement selon l'axe 2.

Le groupe composé de la largeur de l'aile postérieure, la longueur du fémur, la coloration et la longueur de la 1^{ère} et la 3^{ème} sternite est corrélé positivement selon l'axe 1 et l'axe 2.

Tandis que le groupe composé de la longueur de la langue, la longueur et la largeur de l'aile antérieure, la longueur de l'aile postérieure, la longueur et la largeur du métatarse et la longueur du tibia est proche de 0.

3.2 Génétique de l'Abeille

3.2.1 ADN mitochondrial

- Les profils de restriction de l'étude

Le gel d'agarose nous permet d'estimer la taille du fragment amplifié et donc de mettre en évidence les fragments d'ADN de plus de 500 pb ; la figure 23 représente les quatre longueurs de fragments que l'on peut théoriquement obtenir.

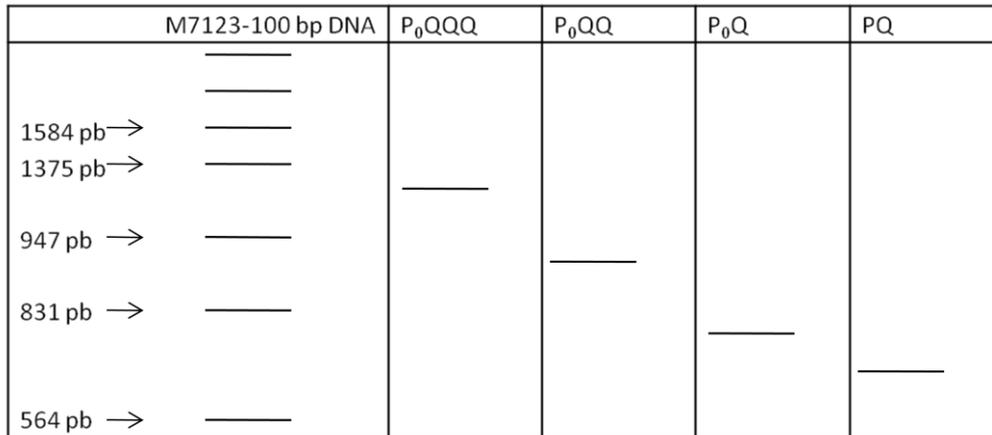


Figure 23. Représentation schématique des profils moyens du gel d’agarose (Achou, 2007).

La digestion par enzyme de restriction du fragment mitochondrial contenant la région intergénique avec *DraI* a donné lieu à deux modèles différents attribuables aux lignées mitochondriales A (lignée évolutive africaine) comme décrit par Cornuet & Garnery, (1991). Chez *A. mellifera*, la région située entre COI-COII varie de 192 à 832 pb selon les sous-espèces, il y a quatre formes de la région COI-COII: Ultra court, court, moyen et long (Tab. 11). Cette variabilité dépend de la présence ou de l’absence du motif P ou P₀ et le nombre de répétition du motif Q. Par rapport au marqueur que nous avons utilisé (M7123-100 pb DNA); le profil court P₀Q ou PQ (entre 500 et 600 pb) est dominant et représente 99% de nos échantillons (sites 1, 2 et 3), les échantillons de Zياما mansouriah ont été caractérisés par un profil moyen P₀QQ ou PQQ ayant un faible pourcentage de 1%, est cohabite avec le profil court P₀Q ou PQ (Fig. 24).

Tableau 11. Organisation structurale de la région mitochondriale COI-COII à partir d’échantillons d’Abeilles (Achou, 2007).

Type de variant	Interprétation	Lignées évolutives
Ultra court	Q	C
Court	PQ ou P ₀ Q	M ou A
Moyen	PQQ ou P ₀ QQ	M ou A
Long	PQQQ ou P ₀ QQQ	M ou A

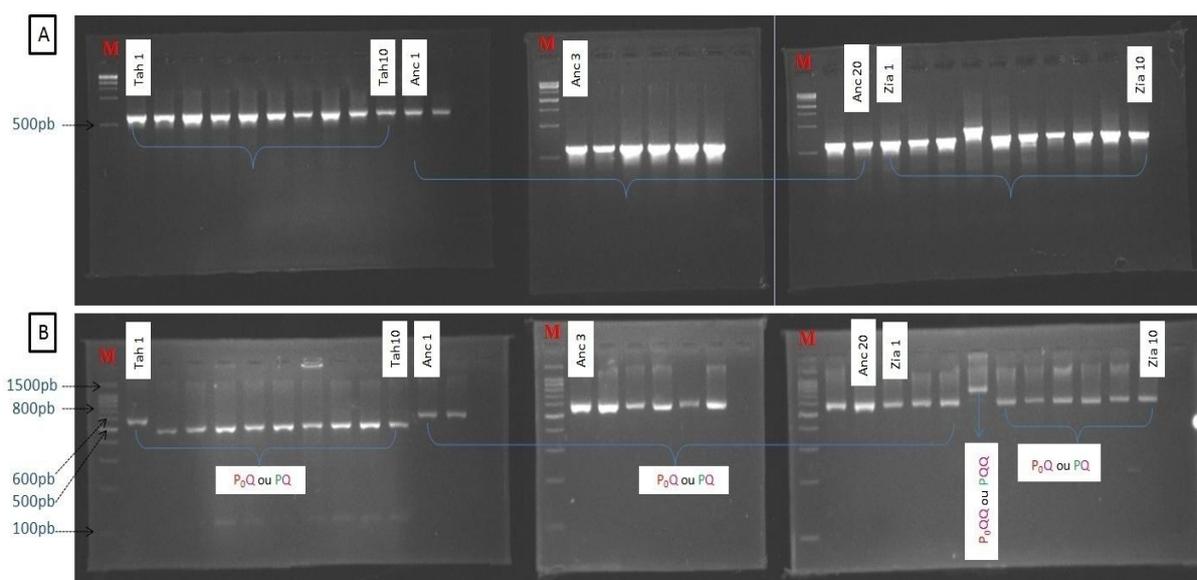


Figure 24. Visualisation de différentes tailles du fragment COI-COII sur gel d'agarose [Marqueur d'échelle d'ADN M7123-100]

Tah1-Tah10: site 1 (El-Taher); Anc1-Anc10: site 2 (El-Ancer); Zia1-Zia10: site 3 (Ziama mansouriah)
 (A): Avant la digestion avec l'enzyme de restriction *Dra* I, (B): Après la digestion avec l'enzyme de restriction *Dra* I.

3.3 Détermination de l'activité enzymatique chez *A. mellifera*

3.3.1 Activité spécifique de la glutathion S-transférase

Le dosage de la GST est réalisé au niveau de l'abdomen des ouvrières adultes d'*A. mellifera* collectées au niveau de trois sites de la wilaya de Jijel (le site 1: **El-Taher**, se situe au Nord de la wilaya de Jijel, sur le littoral méditerranéen; le site 2: **El-Ancer**, se situe au Nord-est de la wilaya de Jijel et le site 3: **Ziama mansouriah**, se situe à l'Ouest de la wilaya de Jijel).

Les données enregistrées pendant le printemps (2015) révèlent : une augmentation hautement significative ($p \leq 0,001$) de l'activité de la GST au niveau du site 3 qui est de l'ordre de $0,172 \pm 0,003 \mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines par rapport aux deux autres sites 1 et 2 dont les valeurs enregistrées sont de l'ordre $0,033 \pm 0,002$ et de $0,047 \pm 0,001 \mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines respectivement en mois de Mars. En Avril, les données enregistrées révèlent une forte activité de la GST au niveau du site 2 qui enregistre une valeur de $0,071 \pm 0,003 \mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines comparativement à celles enregistrées dans le site 1 et 3 $0,026 \pm 0,002$ et $0,044 \pm 0,002 \mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines respectivement. Les données enregistrées en mois de Mai montrent une augmentation de l'activité de la GST au niveau du site 1 qui est de l'ordre de $0,088 \pm 0,001 \mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines par rapport à celles enregistrées dans les sites 2 et 3

0,021 ± 0,001 et 0,049 ± 0,001 μM/mn/mg de protéines.

L'analyse de la variance à deux critères de classification (sites, mois) est suivie du test HSD de Tukey. Elle révèle une différence hautement significative ($p \leq 0,001$) ($F_{2, 53} = 1825,94$; $p \leq 0,000$) entre les sites 1, 2 et 3, entre les trois mois ($F_{2, 53} = 1312,06$; $p \leq 0,000$) et une interaction site/mois ($F_{4, 53} = 3218,94$; $p \leq 0,000$).

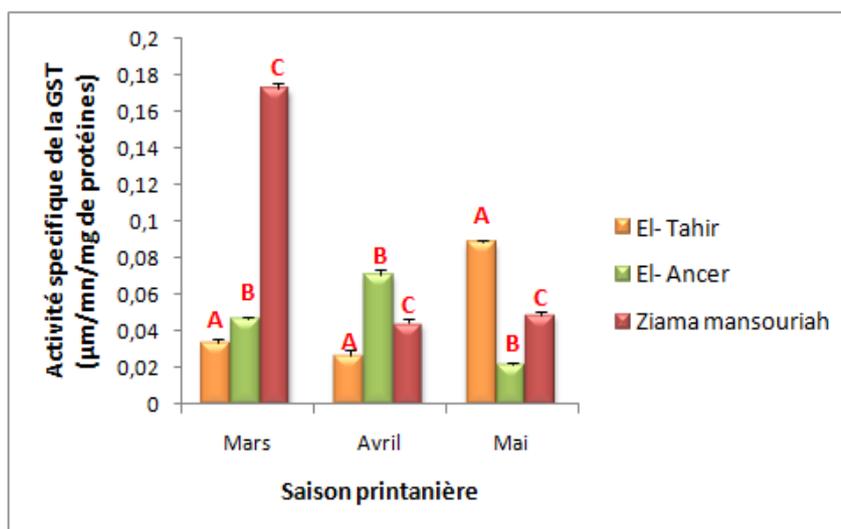


Figure 25. Activité spécifique de la glutathion S-transférase (μM/mn/mg de protéines) au niveau de l'abdomen d'*A. mellifera* dans les trois sites de la wilaya de Jijel : durant la saison printanière (2015) (m ± SD, n = 4-6)

Les valeurs enregistrées en été (2015) révèlent : une diminution hautement significative ($p \leq 0,001$) de l'activité de la GST au niveau du site 3 qui est de l'ordre de $0,022 \pm 0,004$ μM/mn/mg de protéines par rapport aux deux autres sites 1 et 2 dont les valeurs enregistrées sont de l'ordre de $0,033 \pm 0,002$ et de $0,025 \pm 0,006$ μM/mn/mg de protéines respectivement en mois de Juin. En juillet, les données enregistrées révèlent une augmentation significative de l'activité de la GST au niveau du site 2 qui enregistre une valeur de $0,017 \pm 0,002$ μM/mn/mg de protéines comparativement à celles enregistrées dans le site 1 et 3 $0,010 \pm 0,001$ et $0,011 \pm 0,000$ μM/mn/mg de protéines respectivement. Les valeurs obtenues en mois d'Aout sont sans différence significative ($p \geq 0,05$) dans les trois sites $0,021 \pm 0,000$, $0,021 \pm 0,001$ et $0,023 \pm 0,002$ μM/mn/mg de protéines respectivement.

L'analyse de la variance à deux critères de classification (sites, mois) est suivie du test HSD de Tukey. Elle révèle une différence significative ($p \leq 0,05$) ($F_{2, 53} = 3,89$; $p \leq 0,028$) entre les sites 1, 2 et 3, une différence hautement significative ($p \leq 0,001$) entre les trois mois ($F_{2, 53} = 101,98$; $p \leq 0,000$) et une interaction site/mois ($F_{4, 53} = 14,26$; $p \leq 0,000$).

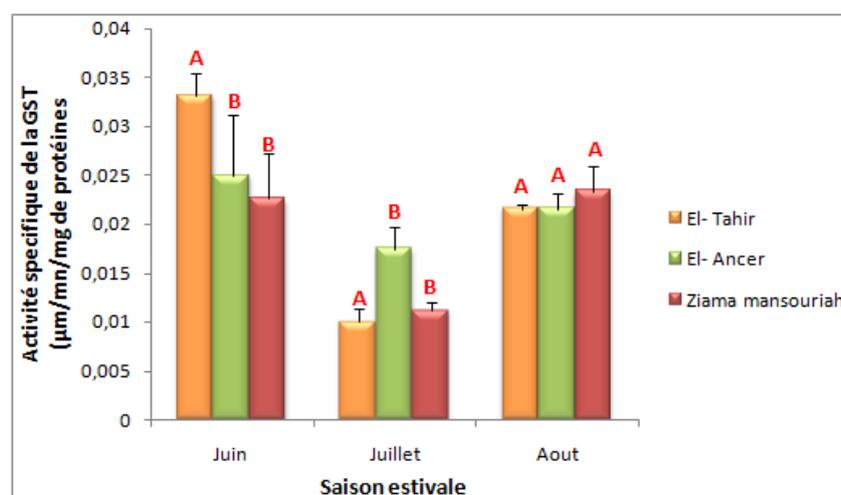


Figure 26. Activité spécifique de la glutathion S-transférase ($\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines) au niveau de l'abdomen d'*A. mellifera* dans les trois sites de la wilaya de Jijel : durant la saison d'été (2015) ($m \pm \text{SD}$, $n = 4-6$)

Durant l'automne (2015) les données révèlent : une diminution hautement significative ($p \leq 0,001$) de l'activité de la GST au niveau des site 2 et 3 qui enregistre des valeurs de l'ordre de $0,024 \pm 0,001$ et $0,031 \pm 0,002 \mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines par apport au site 1 dont la valeur enregistrée est de l'ordre $0,043 \pm 0,002 \mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines en mois de Septembre. En Octobre les données enregistrées révèlent une diminution hautement significative de l'activité de la GST au niveau du site 2 et 3 qui enregistre des valeurs de $0,024 \pm 0,003$ et de $0,021 \pm 0,000 \mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines comparativement à celle enregistrée dans le site 1 $0,034 \pm 0,002 \mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines. Les données enregistrées en mois de Novembre montrent une augmentation de l'activité de la GST au niveau du site 3 qui est de l'ordre de $0,097 \pm 0,001 \mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines par rapport à celles enregistrées dans les sites 1 et 2 $0,050 \pm 0,001$ et $0,063 \pm 0,003 \mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines respectivement.

L'analyse de la variance à deux critères de classification (sites, mois) suivie du test HSD de Tukey démontre une différence hautement significative ($p \leq 0,001$) entre les trois sites 1, 2 et 3 ($F_{2, 53} = 103,36$; $p \leq 0,000$), entre les trois mois ($F_{2, 53} = 1507,44$; $p \leq 0,000$) et une interaction site/mois ($F_{4, 53} = 273,94$; $p \leq 0,000$).

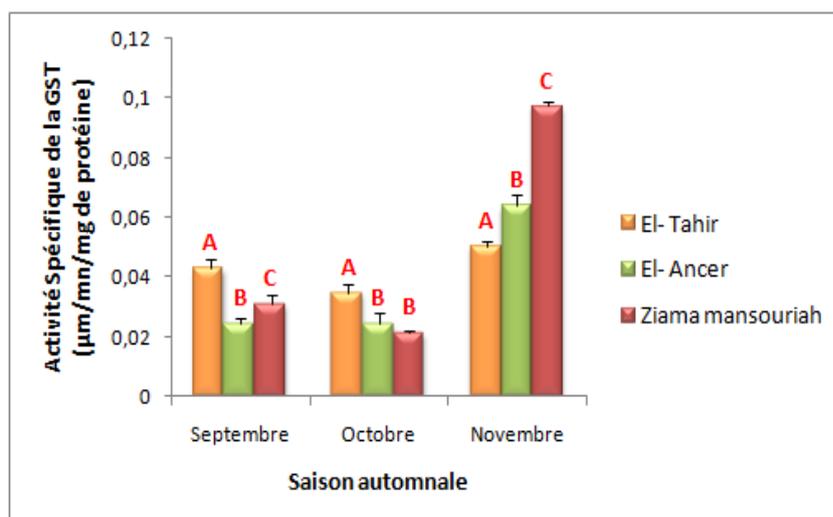


Figure 27. Activité spécifique de la glutathion S-transférase ($\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines) au niveau de l'abdomen d'*A. mellifera* dans les trois sites de la wilaya de Jijel : durant la saison d'automne (2015) ($m \pm \text{SD}$, $n = 4-6$)

Les données enregistrées pendant l'hiver (2015) montrent : une diminution significative ($p < 0,01$) de l'activité de la GST au niveau des site 2 et 3 qui sont de l'ordre de $0,014 \pm 0,000$ et $0,016 \pm 0,000 \mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines respectivement par rapport au site 1 où la valeur enregistrée est de l'ordre de $0,020 \pm 0,001 \mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines en mois de Décembre. En Janvier, Les valeurs obtenues de l'activité de la GST démontre une différence significative ($p \leq 0,05$) dans les trois sites $0,010 \pm 0,000$, $0,010 \pm 0,001$ et $0,014 \pm 0,003 \mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines respectivement. Les données enregistrées de l'activité en Février montrent une augmentation de l'activité de la GST au niveau du site 2 qui est de l'ordre de $0,025 \pm 0,002 \mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines par apport à celles enregistrées dans les site 1 et 3 où les valeurs enregistrées sont de l'ordre de $0,017 \pm 0,000$ et de $0,018 \pm 0,000 \mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines respectivement.

L'analyse de la variance à deux critères de classification (sites, mois) suivie du test HSD de Tukey démontre une différence hautement significative ($p \leq 0,001$) entre les trois sites 1, 2 et 3 ($F_{2, 53} = 9,30$; $p \leq 0,000$), entre les trois mois ($F_{2, 53} = 41,00$; $p \leq 0,000$) et une interaction site/mois ($F_{4, 53} = 3,92$; $p \leq 0,008$).

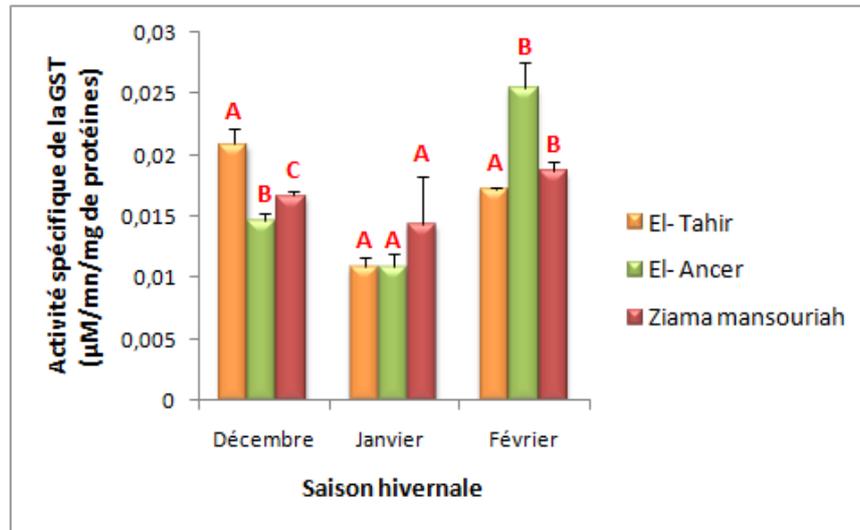


Figure 28. Activité spécifique de la glutathion S-transférase ($\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines) au niveau de l'abdomen d'*A. mellifera* dans les trois sites de la wilaya de Jijel : durant la saison hivernale (2015) ($m \pm \text{SD}$, $n = 4-6$)

3.3.2 Activité spécifique de l'acétylcholinestérase

La détermination de l'activité spécifique de l'AChE est réalisée au niveau de la tête des ouvrières adultes d'*A. mellifera* collectées au niveau de trois sites de la wilaya de Jijel (le site 1: **El-Taher**, se situe au Nord de la wilaya de Jijel, sur le littoral méditerranéen; le site 2: **El-Ancer**, se situe au Nord-est de la wilaya de Jijel et le site 3: **Ziama mansouriah**, se situe à l'Ouest de la wilaya de Jijel).

Les données relatives à la saison printanière (2015) révèlent une activité maximale de l'ordre de $0,010 \pm 0,001 \mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines chez les Abeilles récoltées au niveau du site 1. Cette activité diminue de manière hautement significative ($p \leq 0,001$) au niveau des sites 2 ($0,006 \pm 0,001$) et 3 ($0,008 \pm 0,001 \mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines) comparativement au site 1 en mois de Mars. Pendant le mois d'Avril, une diminution hautement significative ($p \leq 0,001$) de l'activité spécifique de l'AChE est enregistrée au niveau du site 3 qui de l'ordre de $0,006 \pm 0,001 \mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines. En effet, les valeurs obtenues en mois de Mai sont de l'ordre de $0,018 \pm 0,001 \mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines pour le site 1 et diminue jusqu'à $0,011 \pm 0,001 \mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines pour le site 2 et $0,009 \pm 0,001 \mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines pour le site 3.

L'analyse de la variance à deux critères de classification (sites, mois) est suivie du test HSD de Tukey. Elle révèle une différence hautement significative ($p \leq 0,001$) ($F_{2, 53} = 171,48$; $p \leq$

0,000) entre les sites 1, 2 et 3, entre les trois mois ($F_{2, 53} = 63,13$; $p \leq 0,000$) et une interaction site/mois ($F_{4, 53} = ; 20,61$; $p \leq 0,000$).

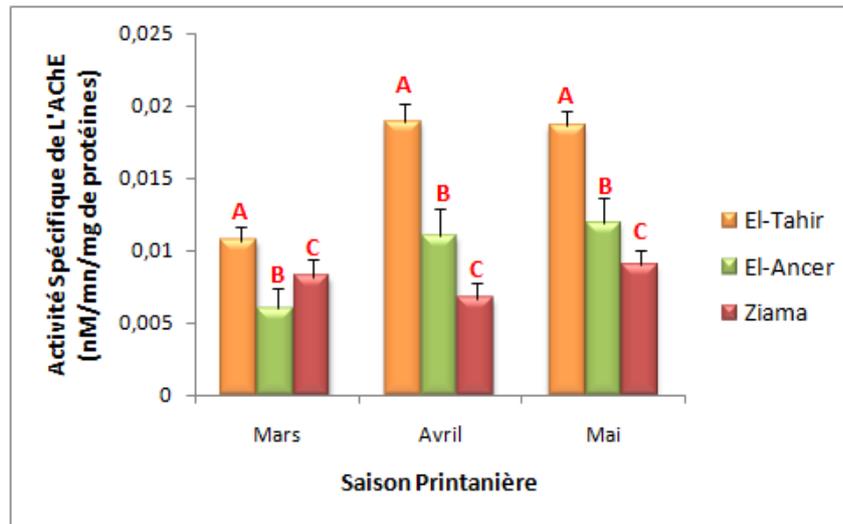


Figure 29. Activité spécifique de l'acétylcholinestérase (AChE) ($\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines) au niveau de la tête d'*A. mellifera* dans les trois sites de la wilaya de Jijel : durant la saison printanière (2015) ($m \pm \text{SD}$, $n=4-6$)

Quant à l'été (2015), on observe une diminution hautement significative ($p \leq 0,001$) de l'activité spécifique de l'AChE en mois de Juin ; dans le site 2 où la valeur marquée est de l'ordre $0,013 \pm 0,001 \mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines par rapport à celles enregistrées dans les sites 1 et 3 qui sont de l'ordre de $0,085 \pm 0,003$ et de $0,069 \pm 0,008 \mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines respectivement. Les mêmes résultats sont observés dans le mois de Juillet, avec une diminution marquée dans le site 2 avec une valeur de $0,036 \pm 0,001 \mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines par rapport aux sites 1 et 3 qui sont de l'ordre $0,065 \pm 0,003$ et de $0,058 \pm 0,000 \mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines respectivement. En ce qui concerne les résultats obtenus en mois d'Août, l'activité spécifique de l'AChE dans les trois sites est de $0,056 \pm 0,001$, $0,060 \pm 0,000$ et $0,059 \pm 0,000 \mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines respectivement.

L'analyse de la variance à deux critères de classification (sites, mois) suivie du test HSD de Tukey démontre une différence non significative ($p \geq 0,05$) entre les trois sites 1, 2 et 3 ($F_{2, 53} = 1,05$; $p \leq 0,357$), entre les trois mois ($F_{2, 53} = 1,02$; $p \leq 0,370$) et une interaction site/mois ($F_{4, 53} = 1,01$; $p \leq 0,410$).

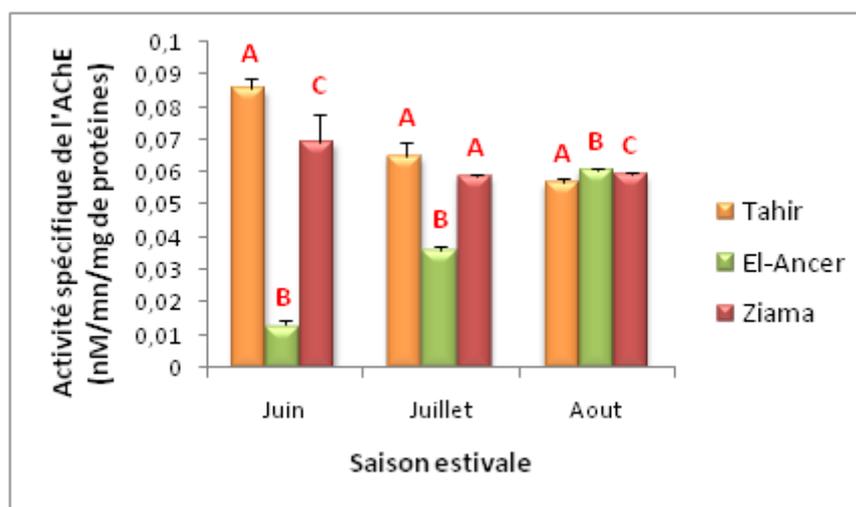


Figure 30. Activité spécifique de l'acétylcholinestérase (AChE) ($\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines) au niveau de la tête d'*A. mellifera* dans les trois sites de la wilaya de Jijel : en été (2015) ($m \pm \text{SD}$, $n=4-6$)

Les données enregistrées en automne (2015) révèlent une activité minimale de l'ordre de $0,001 \pm 0,000$, $0,003 \pm 0,000$ et $0,005 \pm 0,000$ $\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines chez les Abeilles récoltées au niveau des trois sites respectivement en mois de Septembre. Cette activité augmente de manière significative ($p \leq 0,05$) au niveau des sites 1 ($0,062 \pm 0,009$) et 2 ($0,044 \pm 0,009$ $\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines) comparativement au site 3 ($0,037 \pm 0,010$) en mois d'Octobre. Pendant le mois de Novembre, une diminution significative ($p \leq 0,01$) de l'activité spécifique de l'AChE est enregistrée au niveau des sites 1 et 3 qui sont de l'ordre de $0,739 \pm 0,108$ $\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines et de $0,721 \pm 0,020$ $\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines par apport au site 2 où la valeur obtenue est de $0,894 \pm 0,059$ $\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines.

L'analyse de la variance à deux critères de classification (sites, mois) suivie du test HSD de Tukey démontre une différence hautement significative ($p \leq 0,001$) entre les trois sites 1, 2 et 3 ($F_{2, 53} = 9,87$; $p \leq 0,000$), entre les trois mois ($F_{2, 53} = 1953,42$; $p \leq 0,000$) et une interaction site/mois ($F_{4, 53} = 10,65$; $p \leq 0,000$).

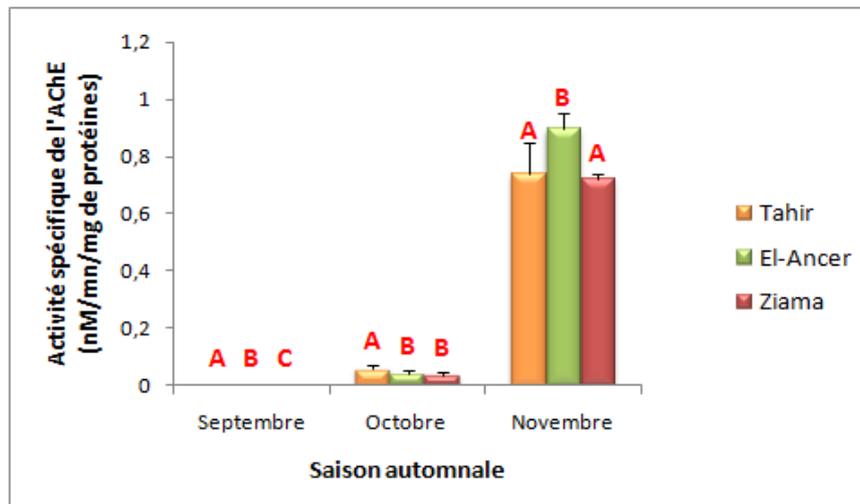


Figure 31. Activité spécifique de l'acétylcholinestérase (AChE) ($\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines) au niveau de la tête d'*A. mellifera* dans les trois sites de la wilaya de Jijel : en automne (2015) ($m \pm \text{SD}$, $n = 4-6$)

En hiver (2015), on observe une diminution significative ($p \leq 0,001$) de l'activité spécifique de l'AChE en mois de Décembre; dans les deux sites 1 et 2 où les valeurs enregistrées sont de l'ordre $0,466 \pm 0,088$ et de $0,671 \pm 0,120 \mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines par rapport au site 3 où la valeur obtenue est de $0,738 \pm 0,038 \mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines. Cette activité diminué de manière significative ($p \leq 0,05$) au niveau de site 1 ($0,581 \pm 0,089 \mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines) comparativement au site 2 et 3 où les valeurs enregistrées sont de l'ordre de $0,759 \pm 0,099$ et de $0,740 \pm 0,089 \mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines en mois de Janvier. En ce qui concerne les résultats obtenus en mois de Février, l'activité spécifique de l'AChE est sans différence significative ($p \geq 0,05$) dans les trois sites $0,950 \pm 0,055$, $0,873 \pm 0,116$ et $0,965 \pm 0,184 \mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines respectivement.

L'analyse de la variance à deux critères de classification (sites, mois) suivie du test HSD de Tukey démontre une différence hautement significative ($p \leq 0,001$) entre les trois sites 1, 2 et 3 ($F_{2, 53} = 9,30$; $p \leq 0,000$), entre les trois mois ($F_{2, 53} = 41,00$; $p \leq 0,000$) et une interaction site/mois ($F_{4, 53} = 3,92$; $p \leq 0,000$).

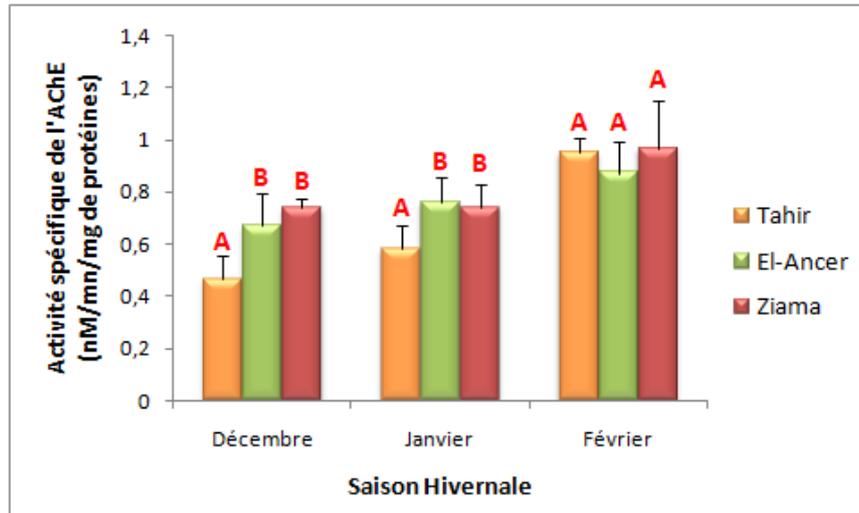


Figure 32. Activité spécifique de l'acétylcholinestérase (AChE) ($\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines) au niveau de la tête d'*A. mellifera* dans les trois sites de la wilaya de Jijel : durant la saison hivernale (2015) ($m \pm \text{SD}$, $n=4-6$)

4. Discussion

4.1 Biométrie

L'étude de la structure morphométrique, effectuée sur les Abeilles domestiques prélevées au niveau des 3 sites de Nord-est Algérien ; Wilaya de Jijel, nous a permis de définir les normes moyennes pour les 15 caractères biométriques mesurés.

Nos résultats morphométriques obtenus confrontés avec ceux obtenus par certains auteurs notamment Ruttner en 1975, ainsi que Cornuet *et al.* (1975, 1988) qui ont travaillé sur les Abeilles marocaines, Grissa *et al.* (1990) sur les Abeilles tunisiennes, de même que Shaibi *et al.* (2009) sur les Abeilles libyenne, et enfin Amoura (2004), Barour *et al.* (2005), Doumandji (2006), Achou (2007) et Bendjedid & Achou (2014) sur les Abeilles algériennes montrent que :

La longueur de l'aile antérieure obtenue est de 13,56 mm (site 1), 12,72 mm (site 2) et 13,28 mm (site 3) nettement très élevée par rapport à celle trouvée par Ruttner (1975) qui est de l'ordre de 9,19 mm, Amoura (2004) 8,51 mm, Barour *et al.* (2005) égale à 9,19 mm, Achou (2007) est de 8,58 mm, Shaibi *et al.* (2009) 9 mm et enfin Bendjedid & Achou (2014) égale à 7,24 mm. Quant à la largeur de l'aile antérieure, sa moyenne est comprise entre 4,58 mm (site 1), 4,29 mm (site 2) et 4,45 mm (site 3) supérieure à celle trouvée par Ruttner (1975) 3,08 mm, Amoura (2004) 3,02 mm, Barour *et al.* (2005) 2,94 mm, Achou (2007) est de 3,05 mm, Shaibi *et al.* (2009) 3,02 mm et Bendjedid & Achou (2014) de 2,39 mm. Pour la longueur moyenne de nervure A, 8,10 mm (site1), 8,15 mm (site 2) et 8,25 mm (site 3) est supérieure que celles rapportées par Cornuet *et al.* (1988) et Grissa *et al.* (1990) qui est de l'ordre de 0,544 mm et 0,563 mm, celles trouvées par Amoura (2004), Barour *et al.* (2005), Doumandji (2006), Achou (2007) et Bendjedid & Achou (2014) sont respectivement de l'ordre de 0,48 mm, 0,55 mm, 1,95 mm, 0,50 mm et 0,41 mm. Même chose pour la longueur de nervure B situent entre 4,34 mm et 3,66 mm est aussi plus élevé que celles rapportées par Cornuet *et al.* (1988), Grissa *et al.* (1990), Amoura (2004), Barour *et al.* (2005), Doumandji (2006), Achou (2007) et enfin Bendjedid & Achou (2014) qui sont respectivement : 0,222 mm, 0,249 mm, 0,20 mm, 0,25 mm, 0,869 mm, 0,21 mm et 0,176 mm.

La moyenne du variable coloration de nos trois sites est comprise entre 1,47 mm et 1,37 mm, est élevée par rapport aux résultats donnés par Amoura, Barour *et al.*, Doumandji, Achou et Bendjedid & Achou qui sont respectivement 0,38 mm, 0,35 mm, 0,73 mm, 0,40 mm et 0,45 mm. Pour le reste des paramètres, nos résultats sont supérieurs à ceux trouvés par les auteurs

cités. En effet, la longueur de la langue est de 6,228 mm (Cornuet *et al.*, 1988), 6,40 mm (Grissa *et al.*, 1990), 5,52 mm (Doumandji, 2006) et 4,283 mm (Bendjedid & Achou 2014), notre mesure varient entre 8,92 mm (site 1), 8,16 mm (site 2) et 8,76 mm pour le site 3. La longueur du métatarse 3,33 mm, 3,12 mm et 3,24 mm sont plus élevés par rapport à celles rapportés par Barour *et al.* (2005) et Bendjedid & Achou (2014) qui sont respectivement : 2,02 mm et 1,59 mm, quant à la largeur du métatarse qui est respectivement égale à 1,62 mm, 1,59 mm et 1,63 mm sont un peu plus proche à celles trouvés par Barour *et al.* (2005) et Achou (2007) qui est de l'ordre de 1,10 mm et 1,12 mm. La longueur du 3^{ème} sternite 2,62 mm (Barour *et al.*, 2005), 2,65 mm (Achou, 2007), nos mesures sont 3,40 mm, 3,13 mm et 3,33 mm.

Cette différenciation de la taille est probablement due à la grande richesse de la végétation et au climat tempéré du Nord-est de l'Algérie. Ainsi, cette Abeille a un corps plus gros pour parcourir les longues distances à la recherche de sa nourriture.

L'étude des écarts-type, montre pour l'ensemble de 15 variables étudiées sur les 3 sites, une faible dispersion pour la plupart des variables, ce qui prouve qu'on a à faire à des populations moyennement homogènes.

Pour la comparaison entre les trois sites, de chacune des 15 caractéristiques (variables), nous avons utilisé le test d'analyse de la variance à un critère de classification modèle fixe (ANOVA). Ce test a révélé qu'il existe entre les 3 sites des différences très hautement significatives ($p \leq 0,001$) pour les moyennes des variables biométriques (X1, X2, X3, X4, X5, X7, X8, X9, X11, X12, X13, X14 et X15), significative ($p \leq 0,05$) pour la largeur de métatarse (variable X10) et aucune différence significative pour la longueur de la nervure A de l'indice cubitale (variable X6). Et l'application de l'analyse de la variance à un critère de classification utilisée pour comparer les moyennes des 3 sites entre eux (MANOVA) a montré qu'il existe des différences très hautement significatives entre tous les sites pour chacun des 15 caractères morphologiques pris en considération.

Cette variation intersites ne peut pas être attribuée que aux facteurs éco-climatiques, étant donné que les Abeilles vivent dans le même biotope. Nous pouvons peut être l'attribuer à la taille des cellules du couvain, car c'est à ce niveau que se déroule le développement embryonnaire des Abeilles et par conséquent, peut affecter la taille des Abeilles (Abdellatif, 1977; Ruttner, 1988. Achou, 2007). En outre, le parasitisme, notamment les ectoparasites, ont

un effet sur le phénotype d'Abeilles (Achou, 1997 ; Radlof & Hepburn, 2000 ; Bendjedid & Achou, 2014).

Par ailleurs, l'étude des corrélations, sur l'ensemble des sites étudiés indique des différences hautement significatives pour la plupart des variables morphométriques. Ruttner (1988) a noté l'existence d'un géocline de longue distance des caractères morphologiques et latitude géographique le long des pays en partant de la Scandinavie jusqu'au Cap de Bonne Espérance en Afrique du sud.

Enfin, l'analyse en composantes principales a pour but d'étudier la structure des colonies d'Abeilles. Pour notre cas, il a été retenu les quatre premières composantes avec une proportion cumulée de 66,8%, la première composante à elle seule prend en compte 38,6% de variabilité. Ces quatre axes ou indices synthétiques résument mieux l'information apportée par les 15 variables biométriques initiales.

4.2 Caractérisation de la diversité génétique des populations d'Abeille d'Algérie

Le double emploi de gène nucléaires et mitochondriaux est important pour comprendre l'histoire évolutive d'une espèce, caractériser ses principales subdivisions et la taxonomie qui en découle. L'ADNmt offre généralement une grande lisibilité des évènements du passé notamment en termes de datation du fait de l'absence de recombinaison qui caractérise ce marqueur, il constitue un excellent marqueur pour l'étude de l'évolution et de la structure génétique des populations naturelles (Naderi *et al.*, 2007 ; Achou *et al.*, 2015), son intérêt dans son mode de transmission par voie maternelle (Harisson, 1989 ; Hensuel & Moritz, 1993, Achou, 2007). Plus particulièrement chez l'Abeille, ce marqueur constitue un marqueur de colonie, puisque la reine transmet sa molécule d'ADN mitochondrial à l'ensemble des individus qui la constitue.

L'analyse d'une seule Abeille permet ainsi d'en déduire le type mitochondrial de toutes les Abeilles de la colonie de laquelle elle provient. Enfin cette molécule, étant hérité maternellement, permet ainsi de suivre l'évolution des lignées maternelles au cours du temps et sa variabilité ne doit pas être diminuée chez les espèces à mode de reproduction haplo-diploïdes (Garnery, 1992).

4.2.1 Polymorphisme de l'ADN mitochondrial

L'amplification de la région intergénique COI-COII de l'ADNmt des Abeilles collectées suivie par la digestion par l'enzyme de restriction *DraI* des produits d'amplification (Garnery

et al., 1993) ont été particulièrement utilisées pour caractériser les lignées mitochondriales de l'Abeille domestique *A. mellifera* (Garnery *et al.*, 1993, 1995, 1998b), pour les études phylogéographiques des sous espèces d'*Apis* (Franck *et al.*, 1998, 2000) ou pour l'analyse de la diversité locale de certaines populations (De la Rúa, 1999 ; Palmer *et al.*, 2000 ; De la Rúa *et al.*, 2001b ; Perrier *et al.*, 2003).

Nos résultats concernant l'analyse de l'organisation structurale de la région intergénique COI-COII sont en accord avec ceux de Cornuet *et al.*, (1991), Garnery *et al.*, 1993, Amoura (2004), Achou (2007) et Chouchaine (2010), qui ont reconnu deux types de séquences P et Q. la séquence P (52-69 pb) correspondrait à la duplication ancestral de l'ARNtleu ; la séquence Q (192-196 pb) correspondrait à une duplication en tandem subséquente d'une courte partie de la région 3' du gène COI (sous région Q1) du gène de l'ARNtleu (sous région Q2) et de la séquence P (sous région Q3) (Cornuet & Garnery, 1991 ; Cornuet *et al.*, 1991). Le polymorphisme de taille observé sur les gels d'agarose résulte de la présence/absence de la séquence P et de la variation du nombre de copies de la séquence Q qui peut être présente en une unique exemplaire ou répétée en tandem de 2 à 4 fois. La séquence P à elle seule est caractéristique de la lignée évolutive (Cornuet *et al.*, 1991 ; Garnery *et al.*, 1993). Elle est absente dans la lignée C et présente une variation de la longueur entre la lignée M et A. Elle est ainsi plus courte dans la lignée M que dans la lignée A du fait de la présence d'une délétion de 15 pb dans cette lignée. Comme la séquence africaine semble moins différente de l'ARNtleu, la séquence P présente dans la lignée A est présumée ancestrale et a été appelé P₀ (Fig. 19).

4.2.2 Structure mitochondriale des populations d'Abeilles d'Algérie

Dans le cadre de cette étude, nous avons ainsi caractérisé le polymorphisme moléculaire d'un total de 30 Abeilles représentant les 3 sites échantillonnées. Ces analyses ont permis de déterminer l'organisation structurale de la région intergénique des différents échantillons Algériens étudiés. Ce test nous a permis de confirmer que les Abeilles échantillonnées appartiennent à la lignée africaine (A). des études antérieures ont montré des résultats similaires dans les populations d'Abeilles Algériennes (Amoura, 2004 ; Chahbar *et al.*, 2012) dans lesquelles les haplotypes africains étaient fortement dominants malgré les importations d'Abeilles européennes. Ces résultats sont très cohérents avec ceux basés sur l'analyse microsatellite des échantillons d'Abeilles (Loucif-Ayad *et al.*, 2014); les données de Achou *et al.* (2015) ont révélé la présence de trois lignées d'Abeilles différentes parmi les populations

étudiées, comprenant les lignées africaines (A), celle de la Méditerranée du Nord (C) et celle de la Méditerranée occidentale (M) dont huit différents haplotypes d'ADNmt (A1, A2, A8, A9, A10, A13, C7 et M4).

Dans tous les cas le niveau d'interrogation lié aux importations d'Abeilles provenant d'autres lignées évolutives reste faible à l'échelle du pays concernant la région Est, ne présente que 2,96% (Achou, 2007). De plus, lors d'une étude réalisée au Maroc sur 192 colonies, Garnery *et al.* (1995) n'avaient montré aucun type mitochondriaux dans ce pays alors que de nombreuses importations avaient eu lieu. Il était reconnu, que les colonies importées de France au Maroc dépérissaient en quelques années, ce qui permettait d'expliquer en partie l'absence de type M avec le marqueur mitochondrial. Il serait intéressant de demander aux apiculteurs possédant des haplotypes mitochondriaux si les colonies importées sont récents ou non, et si également les colonies importées dépérissent aussi rapidement en Algérie qu'au Maroc. Il semble logique que les populations du Maroc soient les plus proches de nos populations Algériennes puisqu'elles appartiennent toutes les deux à la lignée Africaine, et que les populations Algériennes proviennent de ce continent et sont très proches géographiquement de la population du Maroc.

Nos résultats sont confrontés avec ceux obtenus par Chouchaine (2010), étude confirmant que l'Abeille tunisienne *Apis mellifera intermissa* appartient à la lignée A.

4.3 Détermination de l'activité enzymatique chez *A. mellifera*

L'usage des insecticides est un facteur perturbant parfois très gravement les insectes pollinisateurs, insuffisamment protégés malgré leur statut d'auxiliaires de l'agriculture et leur action bénéfique dans le maintien de la diversité de la flore spontanée.

4.3.1 Activité spécifique de la glutathion S-transférase

Les glutathion S-transférases (GSTs), jouent un rôle important dans la physiologie du stress, le transport intracellulaire et dans les différentes voies biosynthétiques (Wilce & Parker, 1994 ; Sheehan *et al.*, 2001). Ils représentent une famille des enzymes substrats spécifiques qui catalysent la conjugaison du GSH avec les xénobiotiques dans la phase II de métabolisation favorisant leur élimination de l'organisme (Malmezat *et al.*, 2000).

Chez les insectes, les GSTs représentent un mécanisme très important de détoxification dus à leur participation dans la résistance aux insecticides (Kostaropoulos *et al.*, 2001;

Papadopoulos et *al.*, 2004; Yu, 2004). Ce système actif d'enzymes de détoxification chez les Abeilles est situé majoritairement à deux emplacements stratégiques: l'intestin et le corps gras. Cette localisation particulière lui permet d'intervenir rapidement sur les molécules qui doivent soit être transformées pour être biologiquement actives (comme certaines hormones) soit au contraire pour être inactives ou détoxifier (Smirle & Winston, 1988). Chez les Abeilles, cette activité enzymatique de détoxification semble être influencée non seulement par l'âge mais aussi par le comportement de la démographie de la colonie (Smirle, 1993 ; Bouchemma, 2011).

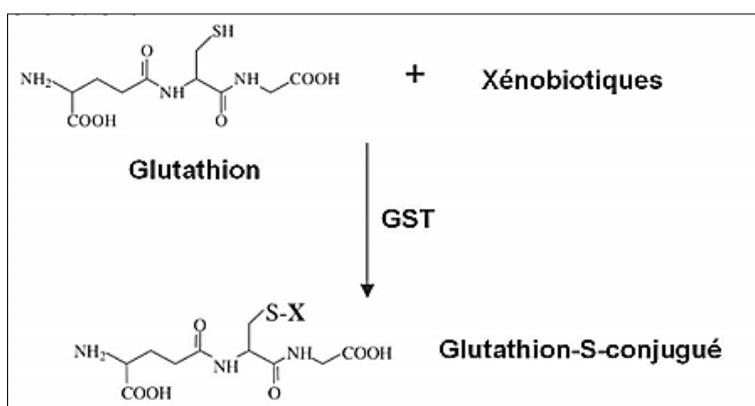


Figure 33. Schéma de conjugaison d'un substrat avec le glutathion réalisée par une GST.

Nos résultats ont démontré une induction de l'activité de la GST chez les Abeilles *A. mellifera* récoltées au niveau du site 3 (Ziama mansouriah) comparativement aux sites 1 et 2 (El-Taher, El-Ancer) en mois de Mars. Pendant le mois d'Avril une induction de cette activité est enregistrée au niveau du site 2 par apport aux sites 1 et 3, en mois de Mai l'activité spécifique de la GST est plus élevée au niveau de site 1 comparativement aux sites 2 et 3. De plus, une induction est enregistrée dans les sites 1 et 2 en mois de Juin par rapport à celle enregistrée au niveau de site 3. En ce qui concerne le mois de Juillet l'activité de la GST est augmenté dans le site 2 par apport aux sites 1 et 3. Les changements non significatifs dans l'activité de la GST dans les trois sites en mois d'Août suggèrent que les pesticides utilisés n'affectent pas l'activité spécifique de la GST.

Une augmentation élevée chez les Abeilles récoltées au niveau de site 1 en mois de Septembre et Octobre par apport aux sites 2 et 3. Pendant le mois de Novembre, une inhibition de la GST est enregistrée au niveau des sites 1 et 2 par apport à celle de site 3. En ce qui concerne la période hivernale, l'activité spécifique de la GST est inhibée en mois de Décembre dans les

deux sites 2 et 3 par rapport au site 1, des changements non significatifs dans l'activité de la GST dans les trois sites en mois de Janvier, tandis qu'une induction de l'activité est enregistrée au niveau de site 2 comparativement aux sites 1 et 3 en mois de Février.

Nos résultats sont conformes avec ceux de Loucif -Ayed *et al.* (2008) ont révélé une induction de la GST due à différents acaricides tels que l'amitraz, flumethrin, thymol et thymol mélangé avec des huiles essentiels chez *A. m. intermissa* dans trois stades de son développement (larve, nymphe et adulte). Benchaabane (2009) a évaluée les effets secondaires de deux acaricides Apilife Var et le Bayvarol sur les Abeilles ouvrières d'*A. m. intermissa* révèle que ces deux traitements provoquent une augmentation de l'activité de la GST. L'acaricide chimique (Apistan) entraîne une augmentation significative de l'activité enzymatique de la GST (Bouchama, 2011). Nabti *et al.* (2014) ont noté une induction de la GST pendant la saison printanière (2011, 2012) chez *A. m. intermissa* traitées par un mélange de pesticides (Fenthion, Thiram 80%, Topik 080EC...). Les travaux de Rouibi *et al.* (2016) ont également rapporté une augmentation au niveau de l'activité spécifique de la GST chez les Abeilles âgées de 0 et 7 jours traitées à l'acaricide synthétique Apistan (pyréthrinolide à base de fluvalinates) Chez les butineuses, l'activité enzymatique de la GST est similaire dans tous les groupes d'Abeilles. Néanmoins, l'acide oxalique (6,5 g et 3,25 g) ne semble pas provoquer de modifications dans l'activité enzymatique de la GST.

4.3.2 Activité spécifique de l'acétylcholinestérase

Les insectes développent des adaptations pour se protéger contre les composés potentiellement toxiques comme les pesticides. Ces derniers ont généralement pour cible le système nerveux de l'insecte (Francis *et al.*, 2002). En effet, certains pesticides altèrent la transmission de l'influx nerveux en réduisant l'activité catalytique de l'enzyme synaptique qui est l'acétylcholinestérase (AChE), responsable de l'hydrolyse de neurotransmetteur cholinergique universel acétylcholine (Rosenberry, 1975).

L'AChE qui est un sujet d'étude depuis de nombreuses années en raison de son importance biologique, est impliquée dans de nombreux problèmes tels que les intoxications aux insecticides (Badiou, 2007). Elle représente ainsi un biomarqueur de neurotoxicité largement utilisé pour identifier une exposition aux insecticides anticholinestérasiques (Fulton & Key, 2001; Matozzo *et al.*, 2005).

L'inhibition de l'AChE a été fréquemment employée en toxicologie pour diagnostiquer l'exposition aux produit chimiques anticholinestérase, tels que les organophosphorés (OP) et

les carbamates (Fulton & Key, 2001 ; Matozzo *et al.*, 2005 ; Loucif-Ayad *et al.*, 2008, Nabti *et al.*, 2014 ; Rouibi *et al.*, 2016). Par conséquent, ces troubles peuvent affecter la locomotion et l'équilibre des organismes exposés (Little *et al.*, 1990; Richmonds & Dutta, 1992; Hart 1993), qui conduisent généralement à la tétanie musculaire et à la mort de l'organisme (Bainy, 2000).

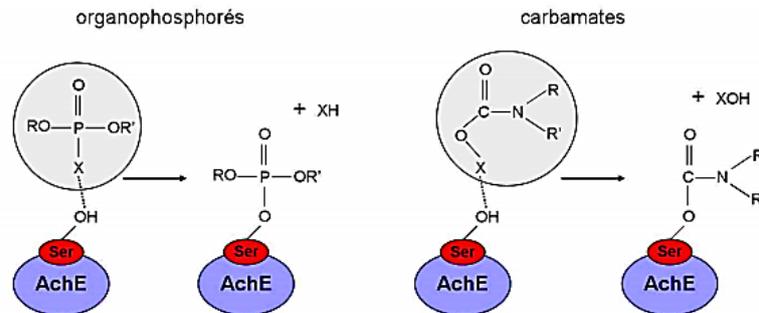


Figure 34. Schéma de l'action d'un organophosphoré ou d'un carbamate sur le site actif de l'acétylcholinestérase (AChE).

Nos résultats ont démontré une induction de l'activité de l'AChE chez les Abeilles *A. mellifera* récoltées au niveau du site 1 (El-Taher) comparativement aux sites 2 et 3 (El-Ancer, Ziama mansouriah) en mois de Mars. Pendant le mois d'Avril et Mai, une inhibition de cette activité est enregistrée au niveau du site 3 par rapport aux sites 1 et 2. De plus, l'inhibition est élevée dans le site 2 en mois de Juin et Juillet par rapport aux sites 1 et 3. En ce qui concerne le mois d'Août, une induction l'activité de l'AChE est enregistrée dans le site 2 par rapport aux sites 1 et 3.

L'inhibition est plus élevée, chez les Abeilles récoltées au niveau des trois sites respectivement en mois de Septembre. Cette activité est augmentée au niveau des sites 1 et 2 comparativement au site 3 en mois d'Octobre. Pendant le mois de Novembre, une inhibition de l'AChE est enregistrée au niveau des sites 1 et 3 par rapport au site 2. En ce qui concerne la période hivernale, l'activité spécifique de l'AChE est inhibée en mois de Décembre dans les deux sites 1 et 2 par rapport au site 3, une induction de cette activité est enregistrée aux niveaux de sites 2 et 3 comparativement au site 1 en mois de janvier. Les changements non significatifs dans l'activité de l'AChE dans les trois sites en mois de Février suggèrent que les pesticides utilisés ne provoquent pas de neurotoxicité.

Ces résultats nous permettent de suggérer une contamination par des polluants neurotoxiques tels que les pesticides, Kral & Schneider (1981) confirment que l'augmentation de l'AChE suit la maturation du système nerveux central.

En effet, ces conclusions sont conformes avec certains auteurs et opposés à d'autres. Les travaux de Loucif-Ayed *et al.* (2008) ont révélé une inhibition de l'AChE due à différents acaricides tels que l'amtiaz, flumethrin, thymol et thymol mélangé avec des huiles essentielles chez *A. m. intermissa* dans trois stades de son développement (larve, nymphe et adulte). Benchaabane (2009) a évalué les effets secondaires de deux acaricides Apilife Var et le Bayvarol sur les Abeilles ouvrières d'*A. m. intermissa* révèle que ces deux traitements n'entraînent aucune différence significative sur l'activité de l'AChE. L'acaricide chimique (Apistan) entraîne une diminution au niveau de l'activité enzymatique de l'AChE (Bouchama, 2011). Nabti *et al.* (2014) ont noté une inhibition de l'activité de l'AChE pendant la saison printanière (2011, 2012) chez *A. m. intermissa* traitées par un mélange de pesticides (Fenthion, Thiram 80%, Topik 080EC...). Les travaux de Rouibi *et al.* (2016) ont également rapporté une inhibition significative de l'activité spécifique de l'AChE chez les Abeilles âgées de 0, 7 et 21 jours traitées à l'acaricide synthétique Apistan (pyréthrine à base de fluvalinate).

5. Conclusion et perspectives

Le présent travail a traité une étude morphologique des Abeilles du Nord-est algérien dans 3 sites situées dans l'étage bioclimatique tempéré humide (Wilaya de Jijel), dont le but d'identifier les différentes races existantes dans cette région. En utilisant, les analyses statistiques appropriées à ce type de problématique, la description des données dans la méthode statistique univariée nous a révélé qu'il existe un polymorphisme de taille au sein des Abeille des 3 sites échantillonnées. Le polymorphisme de taille est lié essentiellement à la pratique apicole c'est -à-dire à la richesse de la végétation et au climat méditerranéen du Nord algérien. Nous avons aussi noté des différences hautement significatives à significatives pour la plupart des caractères morphologiques. L'analyse en composante principale montre que toutes les caractères sont discriminants à l'exception de l'indice cubital et que les quatre premières composantes prennent 66,8% de la variabilité, à noter que la première prend en compte à elle seule 38,6%. Cette variabilité des caractères morphométriques étudiés ne fait pas intervenir de modification de séquence d'ADN, on la qualifie de variabilité épigénétique qui résulte souvent de l'action des facteurs environnementaux que sur l'expression génétique d'un caractère (température, alimentation...). Cette étude morphométrique, quoique pas très fiable, devra être effectuée pour l'ensemble des échantillons à travers tout le territoire en utilisant seulement les caractères les plus discriminants et doit être complétée par l'utilisation de la géométrie des ailes.

La variabilité de l'ADN mitochondrial a été étudiée chez les Abeilles de la même région grâce à l'utilisation des profils des produits PCR de la région intergénique COI-COII (Cytochrome oxydase I et II), Cette analyse a révélé que les populations d'Abeilles étudiées ont des caractéristiques de groupe évolutif A (lignée africaine). Nos résultats semblent en contradiction avec ceux de Ruttner (1988) qui a classé *Apis mellifera intermissa* dans la lignée **M**.

Ce travail devra être complété d'une part, par une étude nucléaire en utilisant les marqueurs nucléaires (microsatellites) afin de déterminer les différents haplotypes des populations d'Abeilles étudiées et d'autre part, par une étude étho-écologique afin de déterminer les modalités de contrôle de la dynamique des populations.

Les applications envisagées comme la mise en place de conservatoire pour la gestion du cheptel au niveau local et national et les études d'impact sont nécessaires afin de mieux caractériser le niveau de variabilité des Abeilles locales et de préserver la diversité génétique

avant qu'il ne soit trop tard, et que les Abeilles locales n'aient plus les ressources génétiques suffisantes pour assurer durablement leur maintien.

Pour se prémunir de nombreuses espèces dites nuisibles, l'Homme disperse volontairement dans la nature (et dans la ruche) des substances toxiques, le plus souvent synthétiques. Pour évaluer l'impact de ces substances sur des organismes qui ne sont pas initialement ciblés et définir les risques associés, nous avons choisies l'Abeille domestique *A. mellifera* comme modèle d'étude, est un sujet d'autant plus pertinent qu'elle est l'outil de travail de plusieurs millions d'apiculteurs et participe activement par son activité pollinisatrice au maintien de la biodiversité végétale.

Cette étude consiste à préciser l'impact toxicologique des pesticides sur les Abeilles par la détermination de l'activité de deux biomarqueurs, la glutathion S-transférase (GST) et l'acétylcholinestérase (AChE). Induction et l'inhibition significatives de ces deux biomarqueurs due à l'effet toxique des pesticides utilisées par les apiculteurs à l'égard des Abeilles *A. mellifera*.

Il serait important de poursuivre les recherches sur des acaricides afin d'évaluer leurs éventuels effets secondaires sur la physiologie de l'Abeille. L'étude de la présence des acaricides dans les différents produits de la ruche et chez l'Abeille doit être entreprise par l'analyse des résidus.

L'Abeille est un excellent indicateur biologique. Elle signale l'état de santé de l'environnement dans lequel elle vit. Elle assure en outre la biodiversité grâce à son rôle de pollinisateur. L'Abeille mérite donc d'être protégée!

6. Résumés

6.1 Résumé

Dans cette étude nous avons utilisé l'Abeille domestique *Apis mellifera* (Linnaeus, 1758) comme espèce modèle.

Une étude biométrique a été réalisée sur des Abeilles ouvrières domestiques prélevées dans 3 sites du Nord-est Algérien situés dans l'étage bioclimatique tempéré humide (Wilaya de Jijel). Sur chaque site, 23 Abeilles ont été prélevées aléatoirement, ce qui représente un total de 69 Abeilles. Pour chaque Abeille, 15 caractères morphologiques ont été mesurés en fonction de leur pouvoir discriminant et de leur signification biologique, ces caractères en question contribuent beaucoup dans la production du miel et de la cire.

Les moyennes des caractères morphologiques ont été analysées par des méthodes statistiques afin de déterminer le domaine de variation des populations d'Abeilles.

Ces analyses ont révélé l'existence des différences significatives pour la plupart des caractères morphologiques entre les Abeilles de l'ensemble des 3 sites.

La variabilité de l'ADN mitochondrial des échantillons prélevés au niveau de ces 3 sites a été étudiée grâce à l'analyse des profils de restriction des produits de PCR de la région intergénique COI-COII. Cette analyse a révélé que les populations d'Abeilles étudiées ont des caractéristiques de groupe évolutif A (lignée africaine).

L'Activité spécifique de la glutathion S-transférase et l'Activité spécifique de l'acétylcholinestérase ont été étudiés chez des Abeilles adultes d'*A. mellifera* collectées au niveau des 3 sites révèlent une induction et inhibition significatives de ces deux biomarqueurs durant la période s'étalant du mois de mars de l'année 2015 jusqu'au mois de février de l'année 2016 afin d'évaluer l'impact des pesticides dans cette région.

Mots- clés : *Apis mellifera* ;Morphométrie ;ADN mitochondrial ;Région intergénique COI-COII ; Evolution moléculaire ;Biomarqueurs

6.2 Abstract

In this study we used the honey bee *Apis mellifera* (Linnaeus, 1758) as a model species.

The morphometric study was conducted on domestic worker bees coming from three sites in north-east Algerian located in the wet moderate bioclimatic stage (Province Jijel). On each site, 23 bees were taken randomly, that is to say a total of 69 individuals. For each bee, 15 morphological characters were measured according to their discriminating power and their biological significance; these characters in question contribute a lot in the production of honey and wax.

The means of the morphological characters were analyzed by statistical methods in order to determine the domain of variation of bee populations.

These analyses revealed the existence of significant differences for most of the morphological characters between the bees of all 3 sites.

The mitochondrial DNA variability of the samples taken from these stations was studied, thanks to the analysis of the product restriction profiles of PCR of the intergenique area COI-COII. Our study revealed that studied honeybee populations have A (African lineages) evolutionary group features.

The specific activity of glutathione S-transferase and the specific activity of acetylcholinesterase were studied in bees adults of *A. mellifera* collected at the 3 sites reveal a significant induction and inhibition of these two biomarkers during the period extending from March of 2015 to February of 2016 in order to assess the impact pesticides in this region

Key words: *Apis mellifera*; Morphometric; Mitochondrial DNA; COI-COII intergenic region; Molecular evolution; Biomarker

3.6 الملخص

في هذا الدراسة استخدمنا نحال العسل (*Apis mellifera*) (Linnaeus, 1758) كنموذج للأنواع.

أجريت دراسة مورفومترية على مجموعة من عاملات نحل العسل تم جمعها من 3 مواقع شمال شرق الجزائر تتميز بمناخ معتدل رطب (ولاية جيجل). في كل موقع، تم أخذ 23 عينة من نحل العسل، ما يمثل مجموع 69 نحلة لكل نحلة، تم قياس 15 صفة مورفولوجية تقيدا بالعديد من الباحثين نظرا لدورها في تحسين إنتاج العسل و الشمع و كذا التمييز بين السلالات.

تم استخدام عدة طرق إحصائية لدراسة الصفات المورفولوجية من أجل تحديد مدى تنوع مجموعات النحل. كشفت هذه الدراسات عن وجود فروق ذات دلالة إحصائية بالنسبة لمعظم الصفات المورفولوجية بين النحل من جميع المواقع الثلاث.

إننا قابلية التنوع التي يتميز بها الحمض النووي الميتوكوندري للنماذج المدروسة في هذه المواقع، قد تمت ملاحظتها بفضل تحليل الأشكال التقليدية لمتوجات تفاعل البرمّة المتسلسلة لمنطقة بين الجينات. كشف هذا التحليل أن مجموعات نحل العسل التي تمت دراستها لها خصائص المجموعة التطورية A (الفصيلة الإفريقية).

تمت دراسة النشاط النوعي للجلوتاثيون-S-ترانسفيراز و النشاط المحدد للأستيل كولينستراز في النحل البالغ *A. mellifera* التي تم جمعها في المواقع الثلاثة تكشف عن تحويض كبير و تثبيط لهدين النشاطين الحيويين خلال الفترة الممتدة من مارس 2015 إلى فبراير 2016 من أجل تقييم تأثير المبيدات في هذه المنطقة.

الكلمات المفتاحية :

الدراسة المورفومترية. نحل العسل. الحمض النووي الميتوكوندري. منطقة بين الجينات. التطور النووي. المؤشرات الحيوية.

7. Références bibliographiques

A

- Abdellatif M. A., Abou-E-Naga A.M., Ali M.H., Shakir P.M. & Al-Jaltli M.K.,1977.** Biometrical studies on Iraq honeybees. *Journal of Apicultural research*,**16** (3): 143- 144.
- Achou M. &Soltani N., 1997.**Impact of *Varroajacobsoni*Oud. on the morphometryandbiochemical composition of hemolymph in honeybees *Apismellifera*intermissaL. *Parasitica*, **53**: 127-134.
- Achou M., 1997.** Impact de l'ectoparasite, varroa jacobsoni, sur l'abeille ouvrière *Apis mellifera*intermissa, dans la région d'El Tarf: épidémiologie, effet sur la morphologie, l'anatomie et la composition chimique de l'hémolymph. Thèse de Magistère, Université Annaba.
- Achou M., 2007.**Morphometric, biochemical and molecular Populations of honeybees in eastern Algeria Physiopathological effects of its major parasite*Varroa destructor*. Doctoral thesis in animal biology. University of Annaba,Algeria p: 136.
- Achou M., Loucif-Ayad W., Legout H., Hmidan H., Alburaki M. &Garnery L., 2015.**An Insightful MolecularAnalysis Reveals Foreign Honeybees Among Algerian Honeybee Populations (*Apismellifera*L.).*Journal of Data MiningGenomics&Proteomics*, **6**:166.
- Adam F., 1953.**A la recherche de meilleures lignées d'abeilles. Premier voyage (5), La Belgique Apicole, **17** (6), pp139-140. Original in the Bee world **32** (1), pp49-52, pp57-62.
- Adam G., 2010.** La biologie de l'abeille. Ecole d'apiculture Sud-Luxembourg. 26 p.
- Adjare S. O., 1990.***Beekeeping in Africa*. FAO Agricultural Service Bulletin 68/6.
- Adjlane N., Doumandji S.E.& Haddad N., 2012.**Situation de l'apiculture en Algérie : facteurs menaçant la survie des colonies d'abeilles locales *Apis mellifera*intermissa. *CahAgric*, **21**: 235-241.
- Afssa (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments), 2008.** Mortalités, effondrements et affaiblissement des colonies d'abeilles. 218p.

Aguilar R., Ashworth L., Galetto L. & Aizen M.A., 2006. Plant reproductive susceptibility to habitat fragmentation: review and synthesis through a meta-analysis. *Ecology letters*, **9**: 968-

Alburaki M., Moulin S., Legout H., Alburaki A., Garnery L., 2011. Mitochondrial structure of Eastern honeybee populations from Syria, Lebanon and Iraq. *Apidologie*, **42** (5): 628-641.

Amdam G.V., Aase A.L.T.O., Seehuus S.C., Kim Fondrk M., Norberg K., Hartfelder K., 2005. Social reversal of immunosenescence in honey bee workers. *Experimental gerontology*, **40**: 939-947.

Amoura M., 2004. Etude de la Diversité Morphométrique et Génétique des Populations D'abeilles Domestiques *Apis mellifera* intermissade l'Est Algérien. Thèse de Magistère, Université Annaba.

Anderson K.E., Sheehan T.H., Eckholm B.J., Mott B.M. & DeGrandi-Hoffman G., 2011. An emerging paradigm of colony health: microbial balance of the honeybee and hive (*Apis mellifera*). *Insect. Soc.*, **58**: 431-444.

Arias M.C. & Sheppard W.S., 1996. Molecular phylogenetics of honey bee subspecies (*Apis mellifera* L.) inferred from mitochondrial DNA sequence. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **5** (3): 557-566.

Arias M.C. & Sheppard W.S., 2005. Phylogenetic relationships of honey bees (Hymenoptera: Apinae: Apini) inferred from nuclear and mitochondrial DNA sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. **37**: 25-35.

B

Badiou A., 2007. Caractérisation Cinétique et Moléculaire du Biomarqueur Acétylcholinestérase chez l'Abeille *Apis mellifera*. Thèse de doctorat. Université Paul Cezanne Aix-Marseille III.

Badiou A., Meled M. & Belzunces L.P., 2008. Honeybee *Apis mellifera* acetylcholinesterase-Abiomarker to detect deltamethrin exposure. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **69**: 246-253.

- Badiou-Bénéteau A., Carvalho S.M., Brunet J.L., Carvalho G.A., Buleté A., Giroud B. & Belzunces L.P., 2012.** Development of biomarkers of exposure to xenobiotics in the honey bee *Apis mellifera*: application to the systemic insecticide thiamethoxam. *Ecotoxicology and environmental safety*, **82**: 22-31.
- Badren M.A., 2016.** La situation de l'apiculture en Algérie et les perspectives de développement. 26p.
- Bainy A.C.D., 2000.** Biochemical responses in penaeids caused by contaminants. *Aquaculture*, **191**: 163-168.
- Baldensperger P. J., 1924.** North African bees. II. *Bee World*, **5**: 189-190.
- Barata C., Navarro J., Varo I., Riva M., Arun S. & Porte C., 2005.** Changes in antioxidant enzyme activities, fatty acid composition and lipid peroxidation in *Daphnia magna* during the aging process. *Comp. Biochem. Physiol.*, **B140**: 81-90.
- Barour C., 2003.** Etude de la variabilité morphométrique et génétique de populations d'Abeilles domestiques *Apis mellifera* L. (Hymenoptera : Apidea) du Nord-est et du Sud algérien. Thèse de magistère. Université Badji-Mokhtar, Annaba. Algérie.
- Barour C., Tahar A., Radloff S. E. & Hepburn H.R., 2005.** Multivariate analysis of honeybees, *Apis mellifera* Linnaeus (Hymenoptera: Apidae) of the northeastern and southern regions of Algeria. *African Entomology*, **13**(1):17-23
- Barour C., Tahar A. & Baylac M., 2011.** Forewing shape variation in Algerian honeybee populations of *Apis mellifera intermissa* (Buttel-Reepen, 1906) (Hymenoptera: Apidae): A landmark based geometric morphometrics analysis. *African Entomology*, **19** (1): 11-22.
- Barour C., 2012.** Analyse De La Biodiversité Des Populations D'abeilles Mellifères *Apis mellifera intermissa* (Buttel-Reepen, 1906) (Hymenoptera: Apoidea) Dans Le Nord Algérien: Morphométrie Moderne Basée Sur la Configuration des Points-Repères (Landmark). Thèse de Doctorat en biologie animale. Université de Annaba, Algérie.
- Benchaabane S., 2009.** L'évaluation des effets secondaires de deux acaricides Apilife Var et le Bayvarol sur les Abeilles ouvrières d'*A. m. intermissa* : aspects biochimiques et

- enzymatiques. Mémoire de Magister en Biologie et Physiologie Animale. Université de Annaba, Algérie.
- Bendjedid H. & Achou M., 2014.** Etude de la diversité morphométrique de deux populations d'abeilles domestiques (*Apis mellifera intermissa* et *Apis mellifera sahariensis*) du sud Algérien. *RevSciTechnol Synthèse*, **28**: 84-95.
- Biri M., 2010.** Tout savoir sur les abeilles et l'apiculture. Paris : De Vecchi. 302 p.
- Bogdanov S., 2006.** Contaminants of bee products. *Apidologie*, **38** (1): 1-18.
- Bouchema W.F., 2011.** Activité comparée de deux acaricides (Acide oxalique et Apistan) sur l'Abeille *Apis mellifera intermissa* et son parasite *Varroa destructor* (Aspect biochimiques et enzymatiques). Thèse de magistère, Biologie animale. Université Badji-Mokhtar Annaba.
- Bradford M.M., 1976.** A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*, **72**: 254-278.
- Breed M.D., Robinson G.E. & Page R.E., 1990.** Division of labor during honey bee colony defense. *BehavEcolSociobiol*, **27**: 395-401.
- Breeze T.D., Bailey A.P., Balcombe K.G. & Potts S.G., 2011.** Pollination services in the UK: How important are honeybees? *Agriculture, Ecosystems and Environment*, **142**: 137-143.
- Bruneau E., 2006.** Nutrition et malnutrition des abeilles. Biodiversité des plantes : une clé pour l'alimentation et la survie des abeilles. Comptes rendus de l'Académie d'agriculture de France. 10p.
- Buco S.M., Rinderer T.E., Syvester H.R., Lancaster V.A. & Crewe R.M., 1987.** Morphometric differences between South American Africanised and South African (*Apis mellifera scutellata*) Honey Bees. *Apidologie*, **18** (3): 217-222.

Buttel-Reepen H., V., 1906. Apistica Beiträge zur Systematik. Biologie sowie zur geschichtlichen und geographischen Verbeitung du Honigbiene (*Apis mellifera* L.) iharevarietaten und übrigen. *Apis- Arten.*, Berlin.

C

Cánovas F., De la Rúa P., Serrano J. & Galián J., 2008. Geographical patterns of mitochondrial DNA variation in *Apis mellifera iberiensis* (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, **46**: 24-30.

Caron D. M., 1999. Honey bee biology and beekeeping. *Wicwas Press, LLC.* Cheshire, CT. 355p.

Carreck N.L. & Williams I., 1998. The economic value of bees in the UK. *Bee World*, **79**: 115-23.

Celli G. & Maccagnani B., 2003. Honey bees as bioindicators of environmental pollution. *Bulletin of Insectology*, **56**: 137-139.

Chahbar N., Muñoz I., Dall’Olio R., De la Rúa P., Serrano J. & Doumandji S., 2012. Population structure of North African honey bees is influenced by both biological and anthropogenic Factors. *Journal of Insect Conservation*, **17**: 385-392.

Charpentier G., 2013. Étude des effets létaux et sublétaux d’une intoxication au thymol sur le développement et l’immunité des larves d’*Apis mellifera* élevées in vitro. Thèse de doctorat en Pathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition. Université Toulouse III Paul Sabatier- France.

Chouchaine M., 2010. Contribution à l’Etude de la Biodiversité des Apoidea en Tunisie. Etude Morphométrique, Moléculaire et Eco-Physiologique de l’Abeille Tunisienne : *Apis mellifera intermissa* (Buttel–Reepen, 1906) (Hymenoptera : Apidae). Thèse de doctorat en sciences agronomiques. Université du 7 Novembre à Carthage –Tunisie.

Chouchaine M., 2010. Contribution in the study of biodiversity of Apoidea in Tunisia: Morphometric, molecular and eco-physiologic study of Tunisian bee: *Apis mellifera intermissa* (Hymenoptera: Apidae). *Tunisian Journal of Plant Protection*, **5**: 205.

- Clément H., 2000.** Les cahiers de l'élevage. Editions Rustica. Paris. 543p.
- Clément H., 2009.** L'abeille sentinelle de l'environnement. Paris, Alternatives, 144 p.
- Clément H., 2010.** Une ruche au jardin. Editions Rustica. Paris. **79** :20-29.
- Cornuet J.M., Fresnaye J.&Tassencourt., 1975.** Discrimination et classification d'abeilles à partir de caractères biométriques. *Apidologie*, **9**(1): 145-187.
- Cornuet J.M., Fresnaye J. &Lavie P., 1978.** Etude biométrique de deux populations d'abeilles Cévenoles. *Apidologie*, **9**(1): 41-55.
- Cornuet J. M., Daoudi A., Mosshine E.H. &Fresnaye J., 1988.** Etude biométrique de populations d'abeilles Marocaines. *Apidologie*, **19**: 355- 366.
- Cornuet J.M.&Fresnaye J., 1989.** Étude biométrique de colonies d'abeilles d'Espagne et du Portugal. *Apidologie*, **20**: 93-101.
- Cornuet J.M. &Garnery L. 1991.** Mitochondrial DNA variability in honey bees and its phylogeographic implications. *Apidologie*, **22**: 627-642.
- Cornuet J.M., Garnery L. &Solignac M., 1991.** Putative origin and function of the intergenic region between COI and COII of *Apis mellifera* L. mitochondrial DNA. *Genetics*, **128**: 393-403.
- Crane E., 1976.** The world's beekeeping - past and present. *Dadant and Sons (ed.), The Hive and the Honey Bee. Dadant and Sons, Inc, Hamilton, Illinois, U.S.A*, p1- 38.
- Crane E., 1990.** Bees and Beekeeping: Science, Practice and World Resources. *Comstock Publishing Associates (Cornell University Press), Ithaca, New York*.
- Crane E., 1999.** The world history of beekeeping and honey hunting. Routledge, New York, 682 p.
- Crozier R., Crozier Y.&Mackinlay A., 1989.** The COI and COII region of honey bee mitochondrial DNA: Evidence for variation in insect mitochondrial evolutionary rates. *Genetics*, **100** :89-110.

D

Dagnelie P., 1975. *Analyse statistique à plusieurs variables*. Ed. Presses agronomiques de Gembloux, 359 p.

Dagnelie P., 1982. *Analyse statistique à plusieurs variables*. Gembloux, Presses agronomiques, 362p.

Dagnelie P., 1999. *Statistique théorique et appliquée*. Tome 2. Bruxelles. Université DE BOECK et LARCIER. 659p.

Danforth B.N., Sipes S., Fang J. & Brady G., 2006. The history of early bee diversification based on five genes plus morphology. *PNAS*, **103**: 15118-15123.

Daşcan H.Y., Özdoğan A.O., Kaftanoğlu O. & Abak K., 2004. Effectiveness of Bumblebee Pollination in Anti-Frost Heated Tomato Greenhouses in the Mediterranean Basin. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, **28**: 73-82.

De La Rúa P., 1999. Variabilidad genética, análisis molecular y filogenia de poblaciones ibéricas y canarias de *Apis mellifera* (Linneo 1758) (Hymenoptera: Apidae). Ph.D. tesis, Universidad de Murcia.

De La Rúa P., Galian J., Serrano J. & Mortiz R.F.A., 2001b. Molecular characterization and population structure of the honeybees from the Balearic Islands (Spain). *Apidologie*, **3**: 1-11

Doumandji H., 2006. Biometric study of populations of bees from Northern Algeria *Apis mellifera intermissa*. Thèse de magistère ; Science animale. El-Harrach-Alger National Agricultural Institute.

E

El Bamby M.A. & Aboukorah M., 1976. The inheritance of certain quantitative characters in the *ligustica x faciata* honeybee hybrid. *The Libyan Journal of Agriculture*, **5**: 131-137.

Eldefrawi A. T., 1985. Acetylcholinesterase and anticholinesterase; in *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and pharmacology*, Kerkut G.A. & Gilbert L.I., (eds), vol.12, pp. 115-130, Pergamon, New York

Elliott J.E., Bishop C.A. & Morrissey C.A., 2011. *Wildlife Ecotoxicology, forensic Approaches*. Springer. 463 pp.

Ellman G.L., Courtney K.D., Abdres V. & Featherstone R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol. Physiol.*, **38**: 84-90.

Engel M.S., 2004. Geological history of the bees (Hymenoptera: Apoidea). *Revista de Tecnologia e Ambiente*, **10** : 9-33.

F

Faucon J.P., 1992. Précis de pathologie, connaître et traiter les maladies des abeilles. Edit. FNOSAD, 512p.

Fluri P., 1994. Réflexions des chercheurs en apiculture sur la régulation de la durée de vie des ouvrières. *Journal suisse d'Apiculture*, **91**: 19-27.

Francis F., Haubruge E. & Dierickx P., 2002. Glutathione S-transferase isoenzymes in the two-spot ladybird, *Adalia bipunctata* (Coleoptera: Coccinellidae). *Arch. Insect. Biochem. Physiol.* **49**: 158-166.

Franck P., Garnery L., Solignac M. & Cornuet J.M., 1998. The origin of west European subspecies of honeybees (*Apis mellifera*): New insights from microsatellite and mitochondrial data. *Evolution*, **52**: 1119-1134.

Franck P., Garnery L., Solignac M. & Cornuet J.M., 2000. Molecular confirmation of a fourth lineage in honeybees from the Near East. *Apidologie*, **31**: 167-180.

François W. & Roland B., 1997. Aide mémoire de Biochimie et de biologie moléculaire. Edition Médicales Internationales. 220p.

Frérés J.M.&Guillume, J.C., 2011. L'apiculture écologique de A à Z. nouvelle Ed. marcopietteur.pp.816.119-142p.

Fresnaye J., 1981. Biometrie de l'abeille, 2^{ème} édition. 54p.

Fulton M. H. & Key P.B., 2001. Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. *Environ. Toxicol. Chem.*, **20**: 37-45.

G

Gallai N., Salles J. M., Settele J. & Vaissiere B.E., 2009. Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecol. Econom.*, **68**:810-821.

Garnery L., 1992. Variabilité de l'AND mitochondrial de l'abeille domestique : implication phylogénétiques, Université Paris VI, 170p.

Garnery L., Cornuet J.M. & Solignac M., 1992. Evolutionary History of the honey bee *Apis mellifera* inferred from mitochondrial DNA analysis. *Molecular Ecology*, **1**: 145-154.

Garnery L., Solignac G., Celebrano G. & Cornuet J., 1993. A simple test using restricted PCR-Amplified mitochondrial DNA to study the genetic structure of *Apis mellifera* L. *Experientia*, **49**: 1016-1021.

Garnery L., Mohsine E., Oldroyd B. & Cornuet J., 1995. Mitochondrial DNA variation in Moroccan and Spanish honey bee populations. *Mol. Ecol.*, **4**: 465-471.

Garnery L., Franck P., Baudry E., Vautrin D., Cornuet J.M. & Solignac M., 1998a. Genetic diversity of the West European honey bee (*Apis mellifera mellifera* and *A. m. iberica*) I: Mitochondrial DNA. *Genetics Selection Evolution*, **30**: S31-S47.

Garnery L., Franck P., Baudry E., Vautrin D., Cornuet J.M. & Solignac M., 1998b. Genetic diversity of the West European honey bee (*Apis mellifera mellifera* and *A. m. iberica*) II. Microsatellite loci. *Genetics Selection Evolution*, **30**: S49-S74.

Gempe T., Hasselmann M., Schiøtt M., Hause G., Otte M., Beye M., 2009. Sex Determination in Honeybees: Two Separate Mechanisms Induce and Maintain the Female Pathway. *PLoS Biol*, vol. 7.

Grissa K., Cornuet J. M., M'Sadda K. & Fresnaye J., 1990. Etude biométrique de populations d'abeilles Tunisiennes. *Apidologie*, **21** : 303- 310.

Gustin Y., 2008. L'apiculture illustrée. Eds. Rustica. Fler. Paris. pp.223.

H

Habig W.H., Pabst M.J., & Jacobi W.B., 1974.The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem*, **249**: 7130-7139.

Haccour P., 1960. Research on the Saharan bee in Morocco. *Comptes Rendus, Society of Natural and Physical Sciences of Morocco*, **6**: 96-98.

Haddad N.J., Loucif-Ayad W., Adjlane N., Manchiganti R., Krishnamurthy V., AlShagoor B., Batainh A. M. & Mugasimangalam R., 2015. Draft genome sequence of the Algerian bee *Apis mellifera intermissa*. *Genomics Data*, **4**:24-2.

Haddad N.J., Adjlane N., Loucif-Ayad W., Dashd A., et al. 2017. Mitochondrial genome of the North African Sahara Honeybee, *Apis mellifera sahariensis* (Hymenoptera: Apidae). Mitochondrial DNA Part B: *Resources*, **2**(2): 548-549.

Haddad N.J., Adjlane N., Saini D., Menon A., kishnamurthy V., Jonklass D., Tomkins J.P., Loucif-Ayad W., Horth L. 2018. Whole-genome sequencing of north African honey bee *Apis mellifera intermissa* to assess its beneficial traits. *Entomological Research*, **48**: 174-186

Hall H.G. & Smith D.R. 1991. Distinguishing African and European honeybee matriline using amplified mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **88**: 4548-4552.

Harisson R.G., 1989. Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology. *Trends ecol. Evol*, **4**:6-11.

Hart A.D.M., 1993. Relationship between behaviour and the inhibition of acetylcholinesterase in birds exposed to organophosphorus pesticides. *Environ.Toxicol. Chem.*, **12**: 321-336.

Hassanein M. H.& El Banby M. A., 1956. Studies on the biometrics of Egyptian honey bee, *Apis mellifera fasciata* Latr. (Hymenoptera: Apidae). Bulletin de la Société Entomologique d'Egypte, **42**: 127-130.

Hensel M.& Moritz R., 1993. Transfer of paternal mitochondrial DNA during fertilization of honeybee (*Apis mellifera* L.) eggs. *Current Genetics*, **24**: 539-543.

Hu P., Lu Z.X., Haddad N., Nouredine A., Loucif- Ayad W., Wang Y.Z., Zhao R.B., Zhang A.L., Guan X., Zhang H.X. & Niu H., 2014. Complete mitochondrial genome of the Algerian honeybee, *Apis mellifera intermissa* (Hymenoptera: Apidae). *Mitochondrial DNA Part A*, **27**: 1791–1792.

Huberty C.J., 1994. Applied discriminant analysis. New York, Wiley, 466p.

I

Imdorf A., Rickli P.& Fluri P., 1996. Dynamique des populations d'abeilles. Rapport du Centre Suisse d'Apiculture. 48p.

Ioiriche EN., 1979. Les abeilles. Pharmaciennes ailées. Ed. Mir. Moscou. PP.228.

J

Jean-Proste P. & Le Conte Y., 2005. Apiculture: Connaître l'abeille, conduit le rucher. Edition Lavoisier, Cachan, France.

K

Kandemir I., Kence M.& Kence A., 2000. Genetic and morphometric variation in honeybee (*Apis mellifera* L.) populations of Turkey. *Apidologie*, **31**: 343–356.

Kekecoglu M., Bouga M., Soysal M.I. & Harizanis P., 2009. Genetic divergence and phylogenetic relationships of Honey Bee populations from Turkey using PCR-RFLP's analysis of two mtDNA segments. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, **15**: 589-597.

Klein A.M., Vaissière B.E., Cane J.H., Steffan-Dewenter I., Cunningham S.A., Kremen C. & Tscharnkte T., 2007. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proc. Roy. Soc. Lond., B., Biol. Sci.*, **274** (1608): 303-313.

Kostaropoulos I., Papadopoulos A.I., Metaxakis A., Boukouvala E. & Papadopoulou-Mourkidou E., 2001. Glutathione S-transferase in the defense against pyrethroids in insect. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **31**: 313– 319.

Kral K. & Schneider., 1981. Fine structural localization of acetylcholinesterase activity in the compound eye of the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Cell Tissue Res.* **221**: 351-359.

Krupke C.H., Hunt G.J., Eitzer B.D., Andino G. & Given K., 2012. Multiple Routes of Pesticide Exposure for Honey Bees Living Near Agricultural Fields. *PLoS One*, **7**(1):e29268.

Kshirsagar K.K. & Renade D.R., 1981. Morphometric characterization of Indian hive bee *Apis cerana* F. (Apidae, Hymenoptera), worker. *J. Univ. Poona Sci. Trch.*, **54**: 101-120.

ℒ

Lagadic L., Caquet T., Amiard J-C. & Ramade F., 1998. Utilisation de biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement. Lavoisier, *Editions Tec & Doc*, Paris, France, p 320.

Laidlaw H. H. & Page R. E., 1997. Queen rearing and bee breeding. *Wicwas Pres, Cheshire, CT*: 224-78.

Le Conte Y., Mohammedi A. & Robinson G.E., 2001. Primer effects of a brood pheromone on honeybee behavioural development. *Proc Biol Sci*, **268**: 163-8.

Le Conte Y., 2002. Le traité rustica de l'apiculture. Rustica edition, Paris, p. 12-83.

Le Conte Y.& Franck P., 2005. Les races de l'abeille domestiques *Apis mellifera* Linneaus. *Abeille&fleurs*, **659**:22-23.

Le Conte Y.&Navajas M., 2008. Climate change: impact on honey bee populations and disease. In: Climate change impact on the epidemiology and control of animal diseases. *Revue scientifique internationale d'épidémiologie*, **27**: 499-510.

Le Conte Y., 2011. Mieux connaître l'abeille. In : Clément. Le Traité Rustica de l'Apiculture. Éd Rustica. Paris. p 528.

Leita L., Muhlbachova G., Cesco R., Barbattini R. & Mondini C., 2004. Investigation of the use of honeybees and honeybee products to assess heavy metals contamination. *Environ. Monitor Assess*, **43**: 1-9.

Leporati M., Valli M. & Cavcchi S., 1984. Etude biométrique de la variabilité géographique des populations d'*Apis mellifera* en Italie septentrionale. *Apidologie*, **15**(3):285-302.

Little E. E., Archeski R.D., Flerov, B.A. & Koslovskay V.I., 1990. Behavioural indicators of sublethal toxicity in rainbow trout. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **19**: 380-385.

Loucif W., 1993. Étude biométrique de populations d'abeilles dans l'est Algérien. Thèse de magistère ; *Ecologie et physiologie animale*. ISN. Université Annaba.

Loucif-Ayad W., Aribi N. & Soltani N., 2008. Evaluation of secondary effects of some acaricides on *Apis mellifera intermissa* (Hymenoptera, Apidae): Acetylcholinesterase and Glutathione S-transferase activities. *Eur. J. Sci. Res.*, **4**: 642-649.

Loucif-Ayad W., Achou M., Legout H., Alburaki M. & Garnery L., 2014. Genetic assessment of Algerian honeybee populations by microsatellite markers. *Apidologie*, **46**: 392-402.

M

Malmezat T., Breuille D., Capitan P., Mirand P.P. & Obled C., 2000. Glutathione turnover is increased during the acute phase of sepsis in rats. *J. Natr.*, **130**: 1239-1246.

Marchenay P. & Berard L., 2007. L'homme, l'abeille et le miel. Ed. Borée. Paris. pp.223.

- Martin C., Provost E., Roux M., Bruchou C., Crauser D., Clément J.J. & Leconte Y., 2001.** Resistance of the honey bee, *Apis mellifera* to the acarid parasite *Varroa destructor*: behavioural and electroantennographic data. *Physiological Entomology*, **26**:362-370.
- Matozzo V., Tomei A. & Marin M.G., 2005.** Acetylcholinesterase as a biomarker of exposure to neurotoxic compounds in the clam *Tapes philippinarum* from the Lagoon of Venice. *Mar. Pollut. Bull.*, **50**: 1686–1693.
- Maxwell D.M., 1992.** The specificity of carboxylesterase protection against the toxicity of organophosphorus compounds. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **114**: 306-312.
- Meixner M.D., Sheppard W.S., Dietz A. & Krell R., 1994.** Morphological and allozyme variability in honey bees from Kenya. *Apidologie*, **25**: 188-202.
- Meixner M. D., Pinto M., Bouga M., Kryger P., Ivanova E. & Fuchs S., 2013.** Standard methods for characterizing subspecies and ecotypes of *Apis mellifera*. *Journal of Apicultural Research*, **52**: 1-28.
- Mensel M. & Moritz R., 1992.** Mitochondrial DNA length variation in the cytochrome oxidase of honeybee (*Apis mellifera* L). *Apidologie*, **23**: 147-150.
- Michener C.D., 2000.** The Bees of the World. The Johns Hopkins University Press, 807p.
- Michener C. D., 2007.** The bees of the world. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, 913 p.
- Miguel I., Baylac M., Iriondo M., Manzano C., Garnery L., Esteban A., 2011.** Both geometric morphometric and microsatellite data consistently support the differentiation of the *Apis mellifera* M evolutionary branch. *Apidologie*, **42** (2): 150-161.
- Moritz R.F.A., 1991.** The limitations of biometric control on pure race breeding in *Apis mellifera*. *Journal of Apicultural Research*, **30**(2): 54-59.
- Moritz F., De Miranda J., Fries I., Le Conte Y., Neumann P. & Paxton R.J., 2010.** Research strategies to improve honeybee health in Europe. *Apidologie*, **41**: 227-242.

Moure J.M., Urban D. & Melo G.A. R., 2007. Catalogue of bees (Hymenoptera, Apoidea) in the neotropical region. *Sociedade Brasileira de Entomologia, Curitiba*, 1058p.

N

Nabti D., Achou M., Soltani N., 2014. The toxic effect of the pesticides on *Apismelliferaintermissa* (Hymenoptera, Apidae): *Glutathione S-Transferase Activity*. *Advances in Applied Science Research*, 5(4): 51-55.

Nabti D., Achou M., Soltani N., 2014. Evaluating the Effects of Pesticides Used in East-Algerian Orchards on *Apismelliferaintermissa*: Enzymatic Activity of Acetylcholinesterase. *Academic Journal of Entomology*, 7(4):128-133.

Naderi S., Rezaei H.R., Taberlet P., Zundels., Rafat S.A. et al., 2007. Large-scale mitochondrial DNA analysis of the domestic goat reveals six haplogroups with high diversity. *Public Library of Science*, pp: 1012.

O

Ollerton J., Winfree R. & Tarrant S., 2011. How many flowering plants are pollinated by animals? *Oikos*, 120: 321-326.

Orlando L., Leonard J. A., Thenot A., Laudet V., Guerin C. et al., 2003. Ancient DNA analysis reveals woolly rhino evolutionary relationships. *Elsevier*, pp. 485-499.

Oudjet K., 2012. Etudes & Enquêtes, le miel une Denrée à Promouvoir, Le miel en Algérie, Infos-CACQE N°:00 / <http://www.Cacqe.org/fichier-etude/2.pdf>.

P

Palm P., 1998. L'analyse en composantes principales: principes et applications. *Notes stat. Inform.* (Gembloux) 2000 / 1, 40p.

Palmer M.R., Smith D.R. & Kaftanoglu O., 2000. Turkish honeybees: Genetic variation and evidence for fourth lineage of *ApismelliferamtDNA*. *The journal of Heredity*, 9 (1):42-46.

Papachristoforou A., Rortais A., Bouga M., Arnold G.&Garnery L.,2013. Genetic characterization of the Cyprian honey bee (*Apismelliferacypria*) based on microsatellites and mitochondrial DNA polymorphisms. *Journal of Apicultural Science*, **57** (2) : 127-134.

Papadopoulos A. I., Polemitou I., Laifi P., Yiangou A. &Tananaki C., 2004. GlutathioneS-transferase in the developmental stages of the insect *Apismelliferamacedonica*.*Comparative Biochem. Physiol. C*, **139**: 87-92.

Paterson P. D., 2008. L'apiculture. Ed. Quae CTA .p 163.

Payette A., 1998. Apoïdes et agroécosystèmes : des abeilles pour la pollinisation. *In* : Colloque sur la pollinisation : *de la fleur aux profits*. (Saint-Hyacinthe). Conseil des Productions Végétales du Québec : 21-38

Pedigo L. P., 2002. Entomology and pest management. Fourth edition. Prentice Hall.742p.

Perrier C., Strange J., Langella O., Sheppard W.S.&Garnery L., 2003. Diversité génétique, introgressions mitochondriales et nucléaires dans une population d'abeilles des landes de Gascogne. *Les Actes du BRG*, **4** :79-100.

Pohl F., 2008. L'élevage des abeilles. Ed. Artémis.95p.

Ponikvar M., Snajder J. &Sedej B., 2005. Honey as a bioindicator for environmentalpollution with SO₂. *Apidologie*, **36**:403-409.

Proctor M., Yeo P.&Lack A., 1996. The natural History of pollination. HARPER COLLINS Publishers, London, 479 p.

Prost J. P., 2005. Apiculture : Connaître l'abeille. Conduire le rucher. Ed. J.B. Baillière.7^{ème} édition revue et complétée par Le conte Y. pp. 698.

R

Rader R., Howlett B.G., Cunningham S.A., Westcott D.A., Newstrom-Lloyd L.E.,Walker M.K., Teulon D.A.J. & Edwards W., 2009. Alternative Pollinator Taxa areEquallyEfficient but not as Effective as the Honeybee in a Mass-flowering Crop.*Journal of Applied Ecology*,**46**: 1080-1087.

- Radloff S.E. & Hepburn H.R., 2000.** Population structure and morphometric variance of the *Apis mellifera scutellata* group of honeybees in Africa. *Genetic and Molecular Biology*, **23**(2): 305-316.
- Ravazzi G., 2007.** Abeilles et apiculture. De Vecchi. 159.
- Richmonds C. & Dutta H.M., 1992.** Effect of malathion on optomotor behaviour of blue gill sunfish *Lepomis macrochirus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **102**: 523-526.
- Ricketts T. H., Regetz J., Steffan-Dewenter I., Cunningham S.A., Kremen C., Bogdanski A., Gemmill-Herren B., Greenleaf S.S., Klein A.M., Mayfield M.M., Morandin L. A., Ochieng A., Potts S.G. & Viana B.F., 2008.** Landscape effects on crop pollination services: are there general patterns? *Ecology letters*, **11**: 499–515.
- Riondet J., 2013.** Le rucher durable. Ed. ulmer. Paris. p 271.
- Rosenberry T. L., 1975.** Acetylcholinesterase. *Adv. Enzymol.*, **43**: 103-300.
- Rouibi A., Bouchemma W.F., Loucif-Ayad W., Achou M. & Soltani N., 2016.** Risks assessment of two acaricides (fluvalinate and oxalic Acid) in *Apis mellifera intermissa* (Hymenoptera, Apidae): Acetylcholinesterase and glutathione S-transferase activities. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, **4** (2): 503-508.
- Rouibi A., 2016.** Efficacité de quelques acaricides sur le varroa et effets secondaires chez *Apis mellifera intermissa*: Aspects toxicologique, physiologique et biochimique. Thèse de doctorat en ecotoxicologie. Université de Annaba-Algérie.
- Ruttner F., 1975b.** african races of honeybees. *Proc. XXV Inter. Apic. Congress*, Grenoble, pp. 325-344.
- Ruttner F., Tassencourt L. & Louveaux J., 1978.** Biometrical statistical analysis of the geographic variability of *Apis mellifera* L., *Apidologie*, **9**: 368-381.
- Ruttner F., 1988.** Biogeography and Taxonomy of honeybees. Springer-Verlag publishers, London, 284p.

S

- Seeley TD., 1983.** Division of labor between scouts and recruits in honey bee foraging. Behavioral ecology and sociobiology. vol. 12. 253-259p.
- Shaibi T., Muñoz I., Dall'Olio R., Lodesani M., De La Rúa P. & Moritz R.F.A., 2009.** *Apis mellifera* evolutionary lineages in northern Africa: Libya, where orient meets occident. *Insects Soc.* **56**: 293-300.
- Sheehan D., Meade G., Foley V. M. & Dowd C. A., 2001.** Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme super family. *Biochem J.* **360** :1-16.
- Sheppard W., Arias M.C., Grech A. & Meixner M., 1997.** *Apis mellifera ruttnerii*, a new honey bee subspecies from Malta. *Apidologie*, **28**: 287-293.
- Sheppard W., Thomas E., Garnery L. and Hachiro S.H., 1999.** Analysis of Africanized honey bee mitochondrial DNA reveals further diversity of origin. *Genet. Mol. Biol.*, **22** :73-75.
- Sheppard W. & Meixner M., 2003.** *Apis mellifera promonella*. A New Honey bee subspecies from central Asia. *Apidologie*, **34**:367-375.
- Smirle M.J. & Wisnton M.L., 1988.** Detoxifying enzyme-activity in worker honey bees. An adaptation for foraging in contaminated ecosystems. *Can. J. Zool.*, **66**: 1938–1942.
- Smirle M. J., 1993.** The influence of colony population and brood rearing intensity on the activity of detoxifying enzymes in worker honeybees. *Physiol. Entomol.*, **87**: 420-424.
- Smith D., 1988.** Mitochondrial polymorphisms in five old subspecies of honey bee and in New World hybrid. In: Africanized honey bees and bee mites, edited by Needham G.R., Page R.E. Jr., Delfinado-Baker M. & Bowman C.E., Ellis Harwood, Chichester, pp303-312.
- Smith D. & Brown W., 1990.** Restriction endonuclease cleavage site and length polymorphism in mitochondrial DNA of *Apis mellifera mellifera* and *Apis mellifera carnica* (Hymenoptera: Apidae). *Annals of the entomological society of America*, **83**(1): 81-88.

Smith D., Palopoli M.F., Taylor B.R., Garnery L., Cornuet J.M., Solignac M. & Brown W.M., 1991. Geographical overlap of two mitochondrial genomes in Spanish honeybees (*Apis mellifera iberica*). *Journal of Heredity*, **82**: 96–100.

Smith D., Slaymaker M., Palmer & Kaftanoglu L., 1997. Turkish honey bees belong to the cast Mediterranean mitochondrial lineage. *Apidologie*, **28**: 269-274.

Spürgin A., 2010. Guide de l'abeille. Ed. Delachaux et Niestlé. Paris. PP.125.29-58p.

Stegeman J.J., Bruwer M., Di Giulio R.T., Forlin L., Flower B.A., Sanders B.M. & Van Veld P.A., 1992. Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. *In*: Huggett R.J., Kimerle R.A., Merhle P.M. & Bergman H.L. (Eds.), *Biomarkers: Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress. A Special Publication of SETAC. Lewis Publishers, Chelsea, MI*, 235-335 pp.

Stone D., Jepson P. & Laskowski R., 2002. Trends in detoxification enzymes and heavy metal accumulation in ground beetles (Coleoptera: Carabidae) inhabiting a gradient of pollution. *Comp. Biochem. Physiol*, **132**: 105-112.

Straub P., 2007. (in Science.Direct.com). Faune et Flore. L'abeille sentinelle écologique.

Sue M., Mikova T., Ueda T., Namoto Y., Miyamoto T., 2006. A novel function of housefly glutathione S-transferase 6B. Its effect on the retention and increase of insecticidal activity of the insecticide prothiofos. *J. Pestic.Sci*, **32** (2): 139-145.

T

Tomassone R. & Fresnaye J., 1971. Etude d'une méthode biométrique et statistique permettant la discrimination et la classification de populations d'abeilles (*Apis mellifera* L.). *Apidologie*, **2**(1): 49-65.

V

Vaissière B., 2002. Abeilles et pollinisation. Le courrier de la Nature 196, Spécial Abeilles : 24-27.

Velterop O., 2000. Effects of fragmentation on pollen and gene flow in insect-pollinated plant population. Thèse de doctorat. Rijkuniversiteit Groningen, 156 p.

Vienne D. & Santoni S., 2000. Les marqueurs moléculaires en génétique, 200p.

Von Frisch K., 2011. Vie et mœurs des abeilles. Editions Albin Michel, Paris, 21-66.

W

Whitfield C.W., Behura S.K., Berlocher S.H., Clark A.G., Johnston J.S., Sheppard W.S., Smith D.R., Suarez A.V., Weaver D. & Tsutsui N.D., 2006. Thrice out of Africa: ancient and recent expansions of the honey bee, *Apis mellifera*. *Science*, **314**: 642-645.

Wilce M.C. & Parker M. W., 1994. Structure and function of glutathione-S-transferase. *Biochem. Biophys. Acta.*, **1205**: 1.

Williams I.H., 1996. Aspects of bee diversity and crop pollination in the European Union. In: Matheson A., Buchmann S. L., O'Toole C., Westrich P., Williams I.H., editors. The conservation of bees Linnean. *Society Symposium Series*, 18. London: Academic Press, p.63-80.

Winston M. L., 1993. La biologie de l'abeille. Ed Frison-Roche p276.

Y

Yu S.J., 2004. Introduction of detoxification enzymes by triazine herbicide in the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera : Noctuidae). *Pest. Biochem. Physiol.*, **80**: 113-122

Sites web:

- [Morphologie de l'abeille : abeilletpe-wix.com](http://abeilletpe-wix.com)
- Les animaux ont-ils un cœur, un cerveau ? Sciences Heembeek
- Vie de l'abeille : Apis Bruoc Sella

Annexe 1. Protocol d'extraction d'ADN selon le kit commercialisé (ZR Tissue & Insect DNA MiniPrep™)

Préparation des échantillons

Pour rincer les Abeilles conservées dans l'éthanol :

- Etaler les Abeilles sur un papier filtre pour un égouttage rapide.
- Disposer chaque Abeille dans un tube de 2 ml contenant 1,5 ml de Ringer.
- Mettre les tubes numérotés dans une boîte de 50 et agiter fortement pendant 20 mn horizontalement.
- Etaler les Abeilles sur un papier filtre en respectant leur numéro.
- Couper les têtes et les disposer dans des tubes de 1,5 ml ; lisser les abdomens et les thorax dans des tubes de 2 ml numérotés.

Préparation du Ringer

NaCl : 7,5 g
KCl : 0,35 g
CaCl₂ : 0,21 g
H₂O distillée : 1L

Ajuster à pH 7/7,4 (quelques gouttes de NaOH 0,1N)

Protocole

For optimal performance, add beta-mercaptoethanol (user supplied) to the **Genomic Lysis Buffer** to a final dilution of 0.5% (v/v) i.e., 500 µl per 100 ml.

1. Add specimen(s) to a **ZR BashingBead™ Lysis Tube**. Add 750 µl **Lysis Solution** to the tube.

Generally, no more than 50 mg tissue should be sampled, for larger samples will exceed the DNA binding capacity of the spin column (See **Specifications** on page 1). Up to 400 µl of whole blood or up to 8.5 x10⁶ cells suspended in 200 µl PBS can also be sampled.

2. Secure in a bead beater fitted with a 2 ml tube holder assembly (e.g., Disruptor Genie™) and process at maximum speed for 10 minutes.

Processing times may be as little as 40 seconds when using high-speed cell disrupters (e.g., the portable **Xpedition™ Sample Processor**, page 5, FastPrep®-24 or similar). See manufacturer's literature for operating information.

3. Centrifuge the **ZR BashingBead™ Lysis Tube** in a microcentrifuge at $\geq 10,000 \times g$ for 1 minute.
4. Transfer up to 400 μl supernatant to a **Zymo-Spin™ IV Spin Filter** (orange top) in a **Collection Tube** and centrifuge at 7,000 rpm ($\sim 7,000 \times g$) for 1 minute.
5. Add 1,200 μl of **Genomic Lysis Buffer** to the filtrate in the **Collection Tube** from Step 4 and mix.
6. Transfer 800 μl of the mixture from Step 5 to a **Zymo-Spin™ IIC Column** in a **Collection Tube** and centrifuge at $10,000 \times g$ for 1 minute.
7. Discard the flow through from the **Collection Tube** and repeat Step 6.
8. Add 200 μl **DNA Pre-Wash Buffer** to the **Zymo-Spin™ IIC Column** in a new **Collection Tube** and centrifuge at $10,000 \times g$ for 1 minute.
9. Add 500 μl **g-DNA Wash Buffer** to the **Zymo-Spin™ IIC Column** and centrifuge at $10,000 \times g$ for 1 minute.
10. Transfer the **Zymo-Spin™ IIC Column** to a clean 1.5 ml microcentrifuge tube and add 50 μl (25 μl minimum) **DNA Elution Buffer** directly to the column matrix. Centrifuge at $10,000 \times g$ for 30 seconds to elute the DNA.

L'AND est près pour les amplifications.

Annexe 2. Matrice des corrélations linéaires des 15 caractéristiques morphométriques prises deux à deux

	(X1)	(X2)	(X3)	(X4)
(X2)	0,481 *** (0,000)			
(X3)	0,354 ** (0,003)	0,798 *** (0,000)		
(X4)	0,461 *** (0,000)	0,729 *** (0,000)	0,629 *** (0,000)	
(X5)	0,189 (0,120)	0,640 *** (0,000)	0,632 *** (0,000)	0,452 *** (0,000)
(X6)	0,090 (0,464)	0,071 (0,562)	0,101 (0,410)	0,045 (0,715)
(X7)	0,262 * (0,030)	0,450 *** (0,000)	0,468 *** (0,000)	0,411 *** (0,000)
(X8)	-0,213* (0,079)	-0,392 *** (0,001)	-0,397 *** (0,001)	-0,363** (0,002)
(X9)	0,266 * (0,027)	0,622 *** (0,000)	0,506 *** (0,000)	0,486 *** (0,000)
(X10)	0,226* (0,062)	0,297 * (0,013)	0,121 (0,320)	0,251 * (0,037)
(X11)	0,175 (0,150)	0,465*** (0,000)	0,395*** (0,001)	0,342** (0,004)
(X12)	0,274* (0,023)	0,606 *** (0,000)	0,566 *** (0,000)	0,553 *** (0,000)
(X13)	0,225* (0,063)	0,384 *** (0,001)	0,339 ** (0,004)	0,310 ** (0,009)
(X14)	0,163 (0,180)	0,295* (0,014)	0,286* (0,017)	0,402 *** (0,001)
(X15)	0,284 * (0,018)	0,656 *** (0,000)	0,598 *** (0,000)	0,548 *** (0,000)

NB : les valeurs entre parenthèses correspondent à la valeur de la probabilité P

	(X5)	(X6)	(X7)	(X8)
(X6)	0,271 * (0,024)			
(X7)	0,189 (0,121)	0,080 (0,516)		
(X8)	-0,050 (0,682)	0,357 ** (0,003)	-0,901 *** (0,000)	
(X9)	0,362 ** (0,002)	-0,071 (0,561)	0,266 * (0,027)	-0,283 * (0,018)
(X10)	0,152 (0,211)	0,172 (0,158)	0,279 * (0,020)	-0,182 (0,135)
(X11)	0,349 ** (0,003)	0,070 (0,570)	0,102 (0,403)	-0,062 (0,615)
(X12)	0,435 *** (0,000)	0,051 (0,676)	0,369 ** (0,002)	-0,315** (0,008)
(X13)	0,184 (0,129)	-0,021 (0,862)	0,034 (0,779)	-0,045 (0,715)
(X14)	0,264 * (0,028)	-0,116 (0,341)	0,071 (0,565)	-0,117 (0,340)
(X15)	0,409 *** (0,000)	-0,026 (0,833)	0,232* (0,055)	-0,226* (0,062)

NB : les valeurs entre parenthèses correspondent à la valeur de la probabilité P

	(X9)	(X10)	(X11)	(X12)
(X10)	0,175 (0,151)			
(X11)	0,489 *** (0,000)	0,213* (0,079)		
(X12)	0,424*** (0,000)	0,201* (0,099)	0,223* (0,065)	
(X13)	0,323** (0,007)	0,263* (0,029)	0,239* (0,048)	0,271* (0,024)
(X14)	0,217* (0,073)	0,150 (0,218)	0,244* (0,043)	0,214* (0,077)
(X15)	0,456*** (0,000)	0,285* (0,018)	0,523*** (0,000)	0,531*** (0,000)

NB : les valeurs entre parenthèses correspondent à la valeur de la probabilité P

	(X13)	(X14)
(X14)	0,372 ** (0,002)	
(X15)	0,419 *** (0,000)	0,411 *** (0,000)

NB : les valeurs entre parenthèses correspondent à la valeur de la probabilité P

$p > \alpha = 0,05$: (ns) différences non significative

$p \leq \alpha = 0,05$: (*) différence juste significative

$p \leq \alpha = 0,01$: (**) différence hautement significative

$p \leq \alpha = 0,001$: (***) différence très hautement significative

Annexe 3. Données statistiques

Tableau 1. Activité spécifique de la glutathion S-transférase ($\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines) au niveau de l'abdomen d'*A. mellifera* dans les trois sites de la wilaya de Jijel : durant la saison printanière (2015) ($m \pm \text{SD}$, $n = 4-6$). Tableau de l'analyse de la variance à deux critères de classification.

Source de variation	DDL	SCE	CM	Fobs	P
Sites	2	0,019953	0,009976	1825,94	P <0,001 ***
Mois	2	0,014337	0,007169	1312,06	P <0,001 ***
Interaction	4	0,070349	0,017587	3218,94	P <0,001 ***
Erreur résiduelle	45	0,000246	0,000005		

***Différence hautement significative ($p < 0,001$).

DDL: degré de liberté, SCE: somme des carrés des écarts, CM : somme des carrés, Fobs: F observé, P: seuil de signification.

Tableau 2. Activité spécifique de la glutathion S-transférase ($\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines) au niveau de l'abdomen d'*A. mellifera* dans les trois sites de la wilaya de Jijel : durant la saison d'été (2015) ($m \pm \text{SD}$, $n = 4-6$). Tableau de l'analyse de la variance à deux critères de classification.

Source de variation	DDL	SCE	CM	Fobs	P
Sites	2	0,0000698	0,0000349	3,89	P <0,028 *
Mois	2	0,0018304	0,0009152	101,98	P <0,001 ***
Interaction	4	0,0005118	0,0001279	14,26	P <0,001 ***
Erreur résiduelle	45	0,0004038	0,0000090		

*Différence significative. ($p < 0,05$), *** Différence hautement significative ($p < 0,001$).

DDL: degré de liberté, SCE: somme des carrés des écarts, CM : somme des carrés, F obs: F observé, P: seuil de signification.

Tableau 3. Activité spécifique de la glutathion S-transférase ($\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines) au niveau de l'abdomen d'*A. mellifera* dans les trois sites de la wilaya de Jijel : durant la saison d'automne (2015) ($m \pm \text{SD}$, $n = 4-6$). Tableau de l'analyse de la variance à deux critères de classification.

Source de variation	DDL	SCE	CM	Fobs	P
Sites	2	0,0013783	0,0006892	103,36	P <0,001 ***
Mois	2	0,0201014	0,0100507	1507,44	P <0,001 ***
Interaction	4	0,0073060	0,0018265	273,94	P <0,001 ***
Erreur résiduelle	45	0,0003000	0,0000067		

*** Différence hautement significative ($p < 0,001$).

DDL: degré de liberté, SCE: somme des carrés des écarts, CM : somme des carrés, F obs: F observé, P: seuil de signification.

Tableau 4. Activité spécifique de la glutathion S-transférase ($\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines) au niveau de l'abdomen d'*A. mellifera* dans les trois sites de la wilaya de Jijel : durant la saison hivernale (2015) ($m \pm \text{SD}$, $n = 4-6$). Tableau de l'analyse de la variance à deux critères de classification.

Source de variation	DDL	SCE	CM	Fobs	P
Sites	2	0,0000046	0,0000023	0,89	P =0,417 ns
Mois	2	0,0006539	0,0003269	129,38	P <0,001***
Interaction	4	0,0003996	0,0000999	38,61	P <0,001***
Erreur résiduelle	45	0,0001164	0,0000026		

ns : Différence non significative ($p \geq 0,05$). *** Différence hautement significative ($p < 0,001$).

DDL: degré de liberté, SCE: somme des carrés des écarts, CM : somme des carrés, F obs: F observé, P: seuil de signification.

Tableau 5. Activité spécifique de l'acétylcholinestérase (AChE) ($\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines) au niveau de la tête d'*A. mellifera* dans les trois sites de la wilaya de Jijel : durant la saison printanière (2015) ($m \pm \text{SD}$, $n = 4-6$). Tableau de l'analyse de la variance à deux critères de classification.

Source de variation	DDL	SCE	CM	Fobs	P
Sites	2	0,0006585	0,0003293	171,48	P <0,001***
Mois	2	0,0002424	0,0001212	63,13	P <0,001***
Interaction	4	0,0001583	0,0000396	20,61	P <0,001***
Erreur résiduelle	45	0,0000864	0,0000019		

*** Différence hautement significative ($p < 0,001$).

DDL: degré de liberté, SCE: somme des carrés des écarts, CM : somme des carrés, F obs: F observé, P: seuil de signification.

Tableau 6. Activité spécifique de l'acétylcholinestérase (AChE) ($\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines) au niveau de la tête d'*A. mellifera* dans les trois sites de la wilaya de Jijel : durant la saison d'été (2015) ($m \pm \text{SD}$, $n = 4-6$). Tableau de l'analyse de la variance à deux critères de classification.

Source de variation	DDL	SCE	CM	Fobs	P
Sites	2	4,657	2,328	1,05	P =0,357 ns
Mois	2	4,498	2,249	1,02	P =0,370 ns
Interaction	4	8,975	2,244	1,01	P =0,410 ns
Erreur résiduelle	45	99,511	2,211		

ns : Différence non significative ($p \geq 0,05$).

DDL: degré de liberté, SCE: somme des carrés des écarts, CM : somme des carrés, F obs: F observé, P: seuil de signification.

Tableau 7. Activité spécifique de l'acétylcholinestérase (AChE) ($\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines) au niveau de la tête d'*A. mellifera* dans les trois sites de la wilaya de Jijel : durant la saison d'automne (2015) ($m \pm \text{SD}$, $n = 4-6$). Tableau de l'analyse de la variance à deux critères de classification.

Source de variation	DDL	SCE	CM	Fobs	P
Sites	2	0,03509	0,01755	9,87	$P < 0,001$ ***
Mois	2	6,94241	3,47120	1953,42	$P < 0,001$ ***
Interaction	4	0,07570	0,01893	10,65	$P < 0,001$ ***
Erreur résiduelle	45	0,07996	0,00178		

*** Différence hautement significative ($p < 0,001$).

DDL: degré de liberté, SCE: somme des carrés des écarts, CM : somme des carrés, F obs: F observé, P: seuil de signification.

Tableau 8. Activité spécifique de l'acétylcholinestérase (AChE) ($\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines) au niveau de la tête d'*A. mellifera* dans les trois sites de la wilaya de Jijel : durant la saison d'hiver (2015) ($m \pm \text{SD}$, $n = 4-6$). Tableau de l'analyse de la variance à deux critères de classification.

Source de variation	DDL	SCE	CM	Fobs	P
Sites	2	0,20820	0,10410	9,30	$P < 0,001$ ***
Mois	2	0,91824	0,45912	41,00	$P < 0,001$ ***
Interaction	4	0,17579	0,04395	3,92	$P < 0,008$
Erreur résiduelle	45	0,50386	0,01120		

*** Différence hautement significative ($p < 0,001$).

DDL: degré de liberté, SCE: somme des carrés des écarts, CM : somme des carrés, F obs: F observé, P: seuil de signification.

Productions scientifiques

Publications (2):

1. **Bouzeraa H.**, Sellami H., Gdoura R., Achou M. & Soltani N., 2020. Genetic diversity of the Honeybee *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera Apidae) from Jijel (Northeast Algeria). *Biodiversity Journal*, 11 (1): 7–14.
2. **Bouzeraa H.**, Achou M., Sellami H. & Soltani N., 2016. Study of the Morphometric Diversity of the Population of Honeybees (*Apis Mellifera*) In the North-East Algeria. *European Journal of Experimental Biology*. 6:6.

Communications internationales (7):

1. BOUZERAA H., Sellami H., ACHOU M., Gdoura R. & SOLTANI N (2019). Etude de la diversité génétique des populations d'abeilles mellifères algérienne (*Apis mellifera*) en utilisant la région intergénique COI-COII de l'ADNm. 30^{ème} Congrès International de l'Association Tunisienne des Sciences Biologiques (ATSB), Sousse (Tunisie), 25-28 Mars 2019. (Communication orale).
2. BOUZERAA H., ACHOU M. & SOLTANI N (2019). L'effet toxique des pesticides sur les abeilles mellifères (Hymenoptera, Apidae) dans le nord-est de l'Algérie: Activité de l'acétylcholinestérase et Activité de Glutathion S-transférase. Séminaire International Environnement et Toxicologie (*snextox 2019*), Constantine (Algérie), 18- 19 février 2019. (Communication affichée).
3. BOUZERAA H., ACHOU M. & SOLTANI N (2017). The toxic effect of the pesticides on *honey bees* (Hymenoptera, Apidae) in the North- Eastern Algeria: acetylcholinesterase activity and Glutathione S-transferase activity. 6^{ème} Congrès de l'Association Tunisienne de Physiologie & de Bio-surveillance de l'Environnement (atp-be), Douz (Tunisie), 18 – 21 Décembre 2017. (Communication oral).
4. BOUZERAA H., ACHOU M. & SOLTANI N (2017). Biodiversité des abeilles dans la région de Jijel et impact toxicologique des pesticides : Etude biométrique et Activité de l'acétylcholinestérase (AChE). 5^{ème} Congrès International de Biotechnologie et Valorisation des Bio-Ressources (AT-BVBR), Tabarka (Tunisie), 22-25 Mars 2017. (Communication affichée).
5. BOUZERAA H., ACHOU M. & SOLTANI N (2016). Biodiversité des abeilles dans la région de Jijel et impact toxicologique des pesticides : Etude biométrique. 5^{ème}

Congrès de l'Association Tunisienne de Physiologie & de Bio-surveillance de l'Environnement (atp-be), Hammamet (Tunisie), 18-21 Décembre 2016. (Communication affichée).

6. BOUZERAA H., ACHOU M. & SOLTANI N (2016). Biodiversité des abeilles dans la région de Jijel et impact toxicologique des pesticides : Etude biométrique et Activité de l'acétylcholinestérase (AChE). 27ème Congrès International de l'Association Tunisienne des Sciences Biologiques (ATSB), Hammamet (Tunisie), 28-31 Mars 2016. (Communication affichée).
7. BOUZERAA H., ACHOU M. & SOLTANI N (2015). Biodiversité des abeilles dans la région de Jijel et impact toxicologique des pesticides : Etude biométrique et Activité de la glutathion S- transférase (G.S.T). 4^{ème} Congrès de l'Association Tunisienne de Physiologie & de Bio-surveillance de l'Environnement (atp-be), Tabarka (Tunisie), 20-23 Décembre 2015. (Communication affichée).

Tâches pédagogiques :

- **2018-2019** : Chargée de TP de Biologie animale (1^{ère} année tronc commun).
- **2018-2019** : Chargée de TP de Zoologie (2^{ème} année tronc commun).
- **2017-2018** : Chargé de TD d'Immunologie (2^{ème} année tronc commun).
- **2017-2018** : Chargé de TD de Biologie Cellulaire (1^{ème} année tronc commun).
- **2016-2017** : Chargé de TD d'Immunologie (2^{ème} année tronc commun).
- **2015-2016** : Chargé de TD d'Immunologie (2^{ème} année tronc commun).
- **2015-2016** : Chargée de TP de Biologie cellulaire (1^{ère} année tronc commun).

Study of the Morphometric Diversity of the Population of Honeybees (*Apis Mellifera*) In the North-East Algeria

Bouzeraa H¹, Achou M², Sellami H¹ and Slotani N¹

¹Laboratory of Applied Animal Biology, Faculty of Science, University Badji-Mokhtar, Annaba, Algeria

²Research Unit Toxicology-Environmental Microbiology and Health (UR11ES70), Faculty of Sciences of Sfax, University of Sfax, Tunisia

Corresponding author: Bouzeraa H, Laboratory of Applied Animal Biology, Faculty of Science, University Badji-Mokhtar, Annaba, Algeria, Tel: +234 8032886428; E-mail: bou-houda@outlook.fr

Received Date: November 24, 2016; **Accepted Date:** December 29, 2016; **Published Date:** December 29, 2016

Copyright: © 2016 Bouzeraa H, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Citation: Bouzeraa H, Achou M, Sellami H, et al. Study of the morphometric diversity of the population of honeybees (*Apis mellifera*) in the North-East Algeria. Eur Exp Biol. 2016, 6:6

Abstract

A biometric study was conducted on domestic worker bees coming from three 03 sites (Tahir, Al-Ancer and Ziama) of the Algerian north-east located in the wet moderate bioclimatic stage (Province Jijel). On each site, 23 bees were taken randomly, that is to say a total of 69 individuals. For each bee, 15 morphological characters were measured.

The statistical analyzes show a very highly significant effect concerning the length of the tongue, the length and width of the anterior wing and the posterior wing, the length of the nervure B of the cubital index, the cubital index (Ratio A/B), the length of the metatarsus, femur, tibia, the sternite 1 and 3, and coloration ($P \leq 0.001$), and significant concerning the width of the metatarsus ($P \leq 0.05$), and non-significant concerning the length of nervure A of the cubital index ($P \geq 0.05$).

Keywords: Domestic bee; Biometric study; Statistical analysis; Algerian north-east

Introduction

Pollinating insects play a key role in cultivated ecosystems [1,2]. Among them, the Bees who belong to the order of Hymenoptera, the superfamily of Apoidea which forms the widest and specialized group [3,4]. This specialization is the result of a long co-evolution between bees and angiosperms group which have begun after synchronous evolutionary radiation in the mid-Cretaceous [5,6]. Today, there are 11 bee families with about 700 genera and 20,000 living species [7-10]. Its abundance and density are higher in the temperate zone due to genera: *Apis* which is characterized by a highly social behavior and comprises four species: *Apis dorsata*, *Apis florea*, *Apis cerana*, and *Apis mellifera* (honey bee) (Linné, 1758) (Apidae), that is exploited by the Man in beekeeping for approximately 7000 years [3,11,12].

In Algeria, 02 breeds have been identified: The first one, *Apis mellifera intermissa* (Tellian bee) described by Buttel-Reepen (in Ruttner), it is a breed of north Africa found in northern Algerian Sahara and Libya to Morocco [13-15]. The second breed, was successively described by Baldensperger and also by Haccour [16,17]. *Apis mellifera sahariensis* is found in the south of Morocco and Algeria [14]. The studies aiming to know and characterize morphologically and biologically the breed which populates the Algerian territory are of a great interest in so far as they constitute the basis of any work of selection. It can be obtained using many morphological characters used in systematic. We therefore consider biometrics as a working method to highlight the purity of race or on the contrary, the hybrid character of the selected colonies. Several works were realized in certain regions of Algeria [18-23]. Our present study at 03 sites in the province of Jijel aims to complement and deepen the knowledge of Algerian bee populations.

Materials and Methods

Equipment for collection of samples and the measurement of studied morphological characters

The bees come from healthy apiaries. Shaking the frame covered with bees on top of a small plexiglass hive (6 × 8 × 10 cm) and transported to the laboratory where they were transferred in a freezer at -20°C waiting to be measured. Morphometric measurements of 15 characters on a sample of 69 bees are performed using a binocular magnifying glass (Carl Zeiss, GERMANY) and that of coloration is carried out under a microscope (OLYMPUS OPTICAL, JAPAN) equipped with an ocular micrometer calibrated with objective (X10) [21,23].

Description of the area of study

The sampling of worker bees of unknown ages has been carried out at the level of 03 stations (Tahir, Al-Ancer and Ziama) in the Province of Jijel; located at the extreme north-east of the Algerian coast during the beginning of the winter period (December 2014) (**Figure 1**). This region is located in the

bioclimatic floor wet temperate and characterized by a type of diverse vegetation [24].

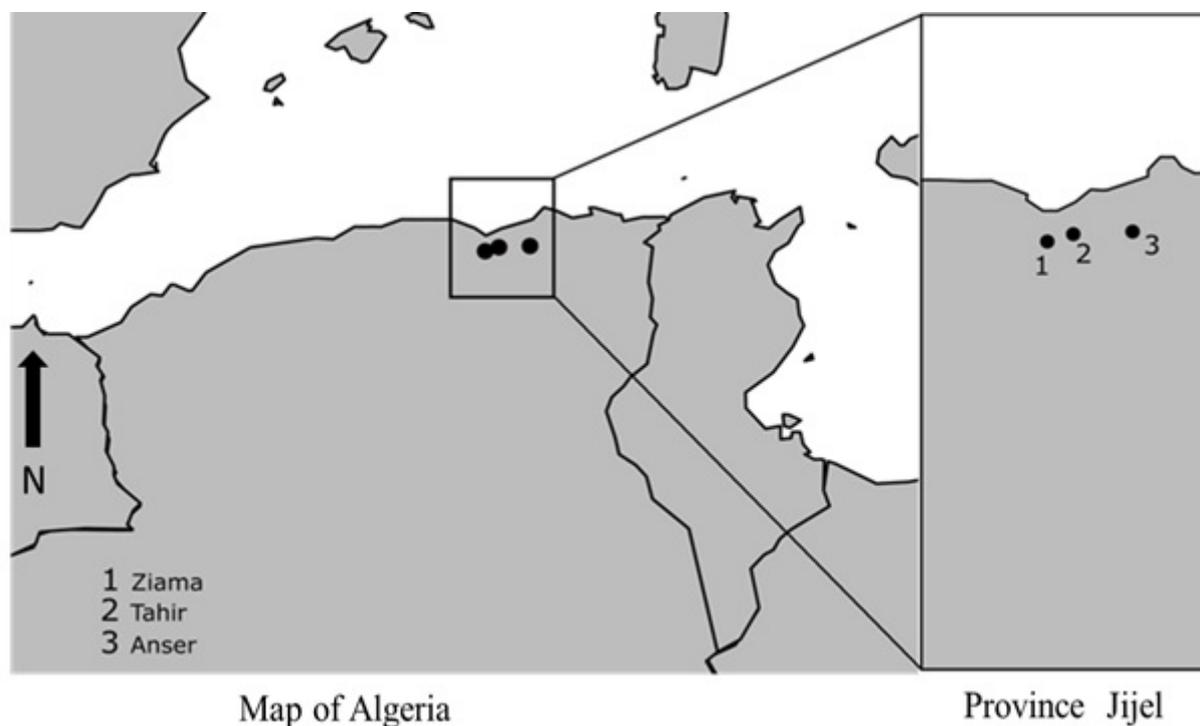


Figure 1 Geographical situation of the study sites in the Province of Jijel.

In each apiary, it was randomly sampled 23 bees, a total of 69 individuals (**Table 1**). All resident bees in hives of type "Langstroth". It has been verified that they were not object of transhumance and diseases such as it has been advocated by Cornuet et al. and Leporati et al. [25,26].

Table 1 Sites, geographic coordinates, number of worker bees measured per apiary of sampling.

	Sites	Geographical coordinates	Effective
1	Tahir	36°46'N 5°53'E	23
2	El- Ancer	36°48'N 6°10'E	23
3	Zياما	36°40'N 5°28'E	23
Total	3 sites		69

Morphological characters studied and methods of measurement

The measures carried out on the workers relate to 15 characters which have been selected on the basis of their biological significance; these characters contribute much in the production of honey and wax.

The settings selected are: length of the tongue, length and width of the anterior wing, length and width of the posterior wing, length of the nervure A and B, the cubital index (ratio

A/B), length and width of the metatarsus, length of the femur, length of the tibia, coloration, and length of the sternite 1 and 3.

The bees as well chosen are dissected one by one. The articles are collected and assembled between blade and cover glass in a few drops of a middle of mounting (glycerine gel) [27,28].

Statistical Analysis

For each studied site we have calculated the means, the standard deviations and the extreme values of each variable.

A comparative study of the means between the 3 sites for each variable (character) was carried out by using the analysis of variance to one classification criterion fixed template (ANOVA) [29,30].

The comparison of 3 sites, between them, for all 15 variables was performed by the analysis of variance multivariate (MANOVA) while using three statistical tests namely: Wilk's Lambda-Lawly Hotteling and Pillai's Trace. However none of these tests is considered as the most powerful and none of them can't be recommended a preferential manner [29].

According to Huberty, the test Wilk's is the most commonly used. This analysis method is an extension of the univariate analysis, to several variables [31].

We used also the analysis in main component (ACP), in order to look for eventually the groups of apiaries homogeneous and the groups of variable. This method was applied to the matrix of the correlation of the averages of the dimension data (nxp) with

n=3 sites and p=15 variables in order to study the structure of bee colonies.

All statistical analyses were performed using MINITAB Software (Version 16, Penn State College, PA, USA).

Results

Description of biometric data

The mean \pm standard deviations (SD) and the two extreme values calculated for 03 sites are shown in **Table 2**.

Table 2 Statistical parameters of 15 morphological characters for the whole of 03 sites.

Morphological characters	Site	M \pm s	X min	X max
Length of the tongue (X1) in mm	1	8.92 \pm 0.78	7.55	9.99
	2	8.16 \pm 0.40	7.33	8.66
	3	8.76 \pm 0.73	6.88	9.55
Length of the anterior wing (X2) in mm	1	13.56 \pm 0.28	12.88	13.99
	2	12.72 \pm 0.21	12.22	13.11
	3	13.28 \pm 0.18	12.88	13.55
Width of the anterior wing (X3) in mm	1	4.58 \pm 0.10	4.44	4.66
	2	4.29 \pm 0.10	4.22	4.44
	3	4.45 \pm 0.06	4.44	4.66
Length of the posterior wing (X4) in mm	1	9.64 \pm 0.16	9.33	9.77
	2	9.19 \pm 0.16	8.88	9.33
	3	9.57 \pm 0.15	9.33	9.77
Width of the posterior wing (X5) in mm	1	2.62 \pm 0.08	2.44	2.66
	2	2.51 \pm 0.07	2.44	2.66
	3	2.61 \pm 0.06	2.44	2.66
Length of the nervure A (X6) in mm	1	8.10 \pm 0.52	7.77	8.88
	2	8.15 \pm 0.54	7.77	8.88
	3	8.25 \pm 0.56	7.77	8.88
Length of the nervure B (X7) in mm	1	4.34 \pm 0.31	3.33	4.44
	2	3.66 \pm 0.52	3.33	4.44
	3	3.66 \pm 0.52	3.33	4.44
Cubital index (X8)	1	2.08 \pm 0.20	1.94	2.58
	2	2.50 \pm 0.34	1.94	2.95
	3	2.53 \pm 0.33	1.94	2.95
Length of the metatarsus (X9) in mm	1	3.33 \pm 0.12	3.11	3.55
	2	3.12 \pm 0.06	3.11	3.33
	3	3.24 \pm 0.12	2.88	3.33
Width of the metatarsus (X10) in mm	1	1.62 \pm 0.05	1.55	1.66
	2	1.59 \pm 0.05	1.55	1.66
	3	1.63 \pm 0.04	1.55	1.66

Table 3 Inter-site comparison of medium sized relating to 15 biometric variables of 03 sites sampling (ANOVA).

Length of the femur (X11) in mm	1	3.87 \pm 0.16	3.55	3.99
	2	3.71 \pm 0.09	3.55	3.77
	3	3.86 \pm 0.12	3.55	3.99
Length of the tibia (X12) in mm	1	4.62 \pm 0.10	4.44	4.88
	2	4.38 \pm 0.09	4.22	4.44
	3	4.49 \pm 0.11	4.22	4.66
Coloration (X13) in mm	1	1.47 \pm 0.08	1.27	1.56
	2	1.37 \pm 0.10	1.13	1.49
	3	1.47 \pm 0.10	1.27	1.63
Length of the sternite1 (X14) in mm	1	4.11 \pm 0.32	3.55	4.66
	2	4.82 \pm 0.34	3.55	4.66
	3	4.30 \pm 0.18	3.99	4.66
Length of the sternite 3 (X15) in mm	1	3.40 \pm 0.17	3.11	3.77
	2	3.13 \pm 0.07	3.11	3.33
	3	3.33 \pm 0.11	3.11	3.55

X min : minimum value, X max : maximum value Site1: Tahir, Site 2: El-Ancer, Site3: Ziama

Analysis of the variance (ANOVA)

The test results of analysis of the variance univariate applied to each of the 15 variables measured, for all 3 sites. Sampling show that there are very highly significant differences concerning the length of the tongue, the length and width of the anterior wing and the posterior wing, the length of the nervure B of the cubital index, the cubital index (Ratio A/B), the length of the metatarsus, femur, tibia, the sternite 1 and 3, and coloration ($P \leq 0.001$), is significant concerning the width of the metatarsus ($P \leq 0.05$), and non-significant concerning the length of the nervure A of the cubital index (**Table 3 and Figure 2**).

Analysis of the variance multivariate or MANOVA

The results of the analysis of variance multivariate are shown in **Table 4**. We distinguish the values of Fobs with associated probabilities, and this for each of the test for equality of vectors of the averages of all the characteristics of 03 sites sampled. For this comparison Inter-apiaries, the three tests (Wilk's Lambda, Hotelling-Lawley and Pilla's Trace) of MANOVA lead to the rejection of legality of the vectors averages for all 03 sites with a very highly significant difference.

Analysis in main components (ACP)

The eigenvalues of the correlation matrix, so the percentages and the cumulative percentages of variation explained by each of the components main for all of the data of the matrix (nxp) (**Table 5 and Figure 3**).

Morphological characters	ddl	SCE	CM	Fobs	P
Length of the tongue	2	7.3023	3.6512	8.27	0.001***
Length of the anterior wing	2	8.4152	4.2076	78.46	0.000***
Width of the anterior wing	2	0.95257	0.47628	52.97	0.000***
Length of the posterior wing	2	2.7229	1.3614	54.40	0.000***
Width of the posterior wing	2	0.177817	0.088909	15.20	0.000***
Length of the nervure A	2	0.2500	0.1250	0.43	0.655NS
Length of the nervure B	2	6.9998	3.4999	16.21	0.000***
Cubital index	2	2.9164	1.4582	16.05	0.000***
Length of the metatarsus	2	0.51053	0.25527	21.21	0.000***
Width of the metatarsus	2	0.022096	0.011048	4.13	0.021*
Length of the femur	2	0.38299	0.19150	10.96	0.000***
Length of the tibia	2	0.65796	0.32898	27.74	0.000***
Coloration	2	0.16426	0.08213	8.20	0.001***
Length of the sternite 1	2	2.6348	1.3174	14.90	0.000***
Length of the sternite 3	2	0.87541	0.43770	27.35	0.000***

ddl: degrees of freedom; SCE: sum of squared deviations; CM: the means square Fobs: value F of Fisher; P: threshold of the signification. $P \leq \alpha = 0.001$: (***) difference very highly significant, $P \leq \alpha = 0.05$: (*) difference significant, $P \geq \alpha = 0.05$: (NS) non-significant

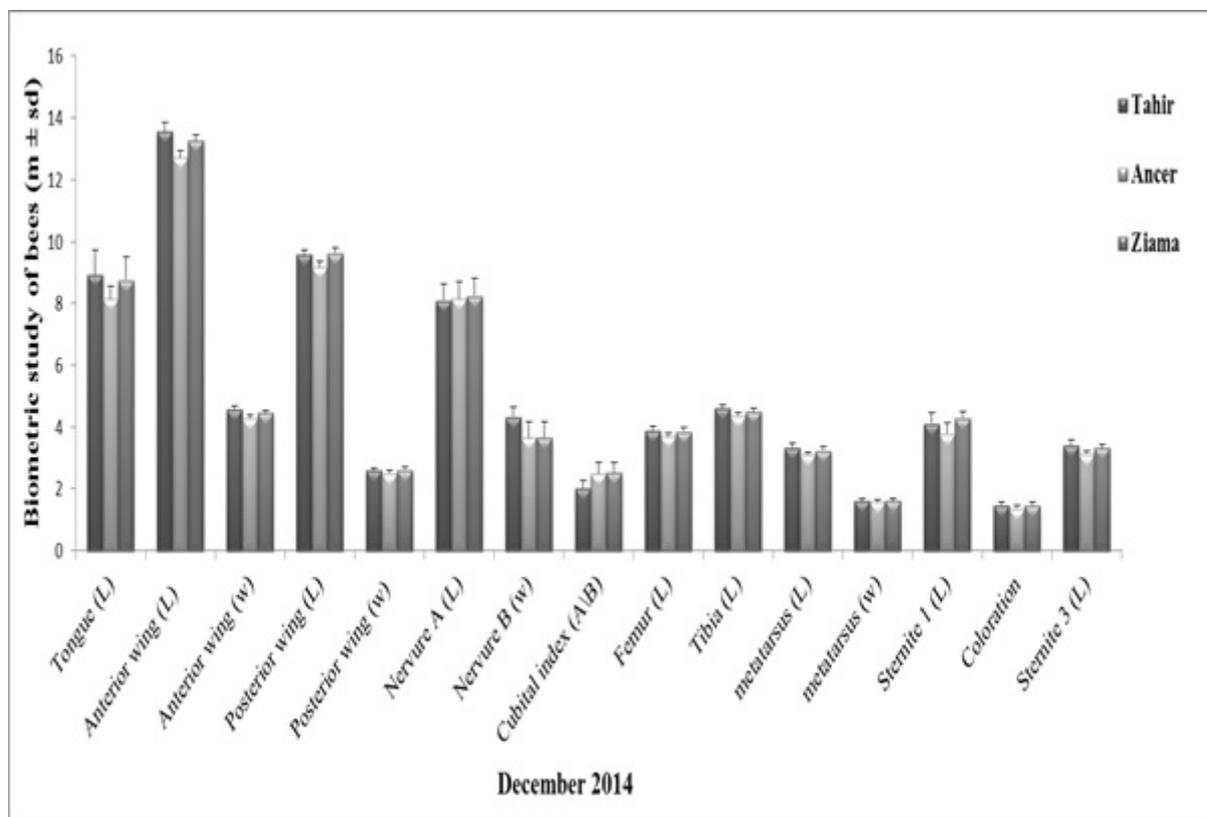


Figure 2 Morphometric study of the bees at the level of the three sites during the winter (December 2014) ($m \pm s$, $n=23$), (L: Length, w: width).

Table 4 Comparison between sites, vectors of the means of 15 different morphometric variables using MANOVA.

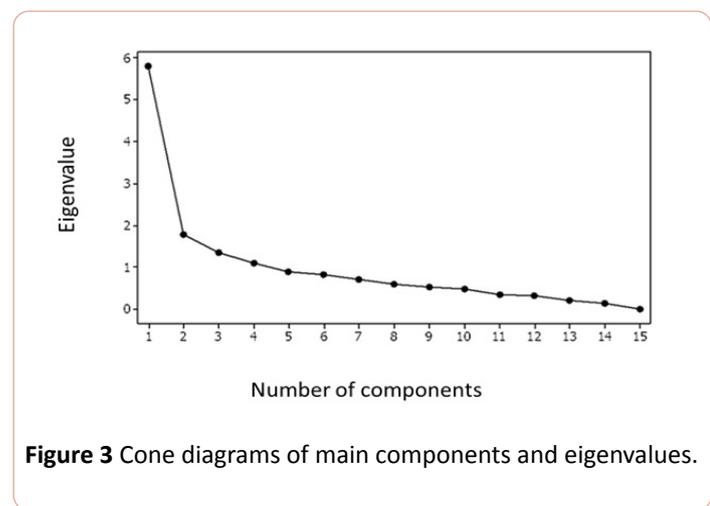
Test	Observed values of the test	Fobs	P
Wilk's	0.08051	8.751	0.000***
Lawley-Hotelling	6.12724	10.416	0.000***
Pillai's	1.34569	7.267	0.000***

Fobs: value F of Fisher; P: threshold of the signification, $P \leq \alpha = 0.001$: (***) difference very highly significant

Table 5 Eigen values and percentages of total variation explained by the four main components and the cumulative percentages.

	CP1	CP2	CP4	CP4
Eigenvalue	5.7974	1.7872	1.3438	1.0928
Percentage %	38.6	11.9	9	7
cumulative percentage %	38.6	50.6	59.5	66.8

CP : Main component

**Figure 3** Cone diagrams of main components and eigenvalues.

We note that the first component CP1 explains himself 38.6% of the total variation of the initial variables, the first two

Table 6 Correlation matrix of the initial variables with the first four principal components.

Variables	PC 1	PC2	PC3	PC4
(X1)	0.211	-0.036	0.112	0.291
(X2)	0.379	0.027	0.077	-0.097
(X3)	0.348	-0.000	0.106	-0.255
(X4)	0.335	-0.017	0.006	0.000
(X5)	0.263	0.240	0.274	-0.288
(X6)	0.024	0.293	0.694	0.179

component explain the all 50.6%; the first three component explain together 59.5%; and finally the fourth first component explain together 66.8 %. So, these four components or synthetic indices summarize the better the information given by the 15 initials biometric variables. From the 5 the components are less useful and correspond to eigenvalues less than unity (<1).

Table 6 presents the correlation matrix of the initial variables with the first four principal components. The correlation analysis of the variables with the first component CP1 shows that all the variables : length of the tongue (X1), length and width of the anterior wing (X2, X3), length and width of the posterior wing (X4, X5), length of the nervure A (X6) and B (X7), length and width of the metatarsus (X9, X10), length of the femur (X11), length of the tibia (X12), coloration (X13), and length of the sternite 1 and 3 (X14, X15) are positively correlated with the first main component, With the exception of variable (8) which represents the cubital index. The second components CP2 are correlated positively with length of the anterior wing (X2), Width of the posterior wing (X5), Length of the nervure A (X6), Cubital index (8), Length of the metatarsus (X9), Length of the femur (X11), Coloration (X13), Length of the sternite1(X14), Length of the sternite 3 (X15). The third components CP3 are correlated positively with 10 variables: length of the tongue (X1), length and width of the anterior wing (X2, X3), length and width of the posterior wing (X4, X5), length of the nervure A (X6) and B (X7), cubital index (8), width of the metatarsus (X10) length of the tibia (X12).

The study of the correlations of the 15 initial variables relative to axes 1 and 2 of ACP watch that the variable (X7) represents the length of the nervure B is clearly positively correlated according to axis 1, while the variables (X1, X2, X3, X4, X6, X9, X10, X12) corresponding to length of the tongue, length and width of the anterior wing, length of the posterior wing, the length of the nervure A, length and width of the metatarsus length of the tibia get closer to 0.

Finally, the fourth components CP4 correlated positively with length of the tongue (X1), length of the posterior wing (X4), Length of the nervure A (X6) and B (X7), length of the tibia (X12), coloration (X13), and length of the sternite 1 and 3 (X14, X15).

(X7)	0.230	-0.536	0.229	0.093
(X8)	-0.205	0.630	0.088	-0.012
(X9)	0.227	0.225	-0.098	-0.069
(X10)	0.291	-0.032	0.077	-0.133
(X11)	0.282	0.044	-0.139	-0.169
(X12)	0.158	0.003	0.129	0.721
(X13)	0.186	0.161	-0.409	0.159
(X14)	0.197	0.229	-0.319	0.347
(X15)	0.315	0.154	-0.182	0.006

PC : initial components (X) : Morphological characters

The variable (X8) represent cubital index is negatively correlated according to axis 1. On the other hand, the group formed by variables (X5, X11, X13, X14) are positively correlated

according to axis 1 and 2, are respectively width of the posterior wing, length of the femur, coloration, length of the sternite 1 and 3 (Figure 4).

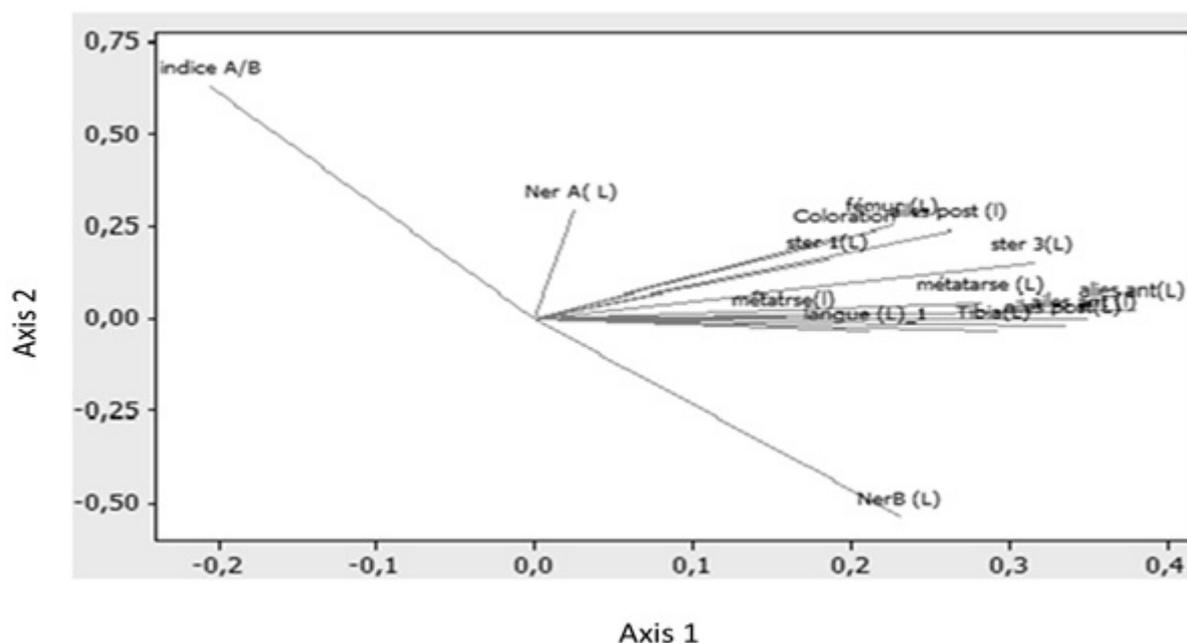


Figure 4 Graphical representation of the correlations of the 15 initial variables on the plan composed of axis 1 and 2 of ACP.

Discussion

The biometric analysis and statistical analysis that we performed on samples of bees North-east Algeria used to define the position of this breed compared to others within the *Apis mellifica* from the point of view morphological

The description of the data by the univariate statistical method revealed that the bee of North-east Algeria is large compared to that of Morocco, Tunisia and the south Algerian [23] for most morphological characters [23,25,32-34].

Our morphometric results obtained compared with those obtained by several study especially, Ruttner, and Cornuet et al. on the Moroccan bees, or Grissa et al. on the Tunisian bees,

finally Achou and Bendjedid and Achou on the Algerian bees [21,23,25,32,33].

The mean length of the anterior wing obtained is 13.56 mm (S1), 12.72 mm (S2) and 13.28 mm (S3). It is clearly very high compared to those found respectively by Ruttner, Achou and Bendjedid and Achou which are of the order of 9.19 mm, 8.58 mm and 7.24 mm [21,23,32].

The mean width of the anterior wing is 4.58 mm (S1), 4.29 mm (S2) and 4.45 (S3). It is greater than those found by Ruttner which is of the order of 3.08 mm, Achou 3.05 mm and by Bendjedid and Achou which is 2.39 mm [21,23,32].

The mean value of the width of the yellow band (length of the nervure A is of 8.10 mm (S1), 8.15 mm (S2) and 8.25 mm (S3). It

is much higher respectively to those made by Cornuet et al. and Grissa et al. which are of the order of 0.544 mm and 0.563 mm, Achou which remain of a same order 0.50 mm and by Bendjedid and Achou who is from 0.41 mm [21,23,25,34].

The mean value of the width of the yellow band length of the nervure B obtained is 4.34 mm (S1) and 3.66 mm (S2, S3). This value is also higher compared to those found by Cornuet et al. or by Grissa et al. which are of the order of 0.222 mm and of 0.249 mm respectively the observed values by Achou is 0.210 mm, but by Bendjedid and Achou is from 0.176 mm [21,23,25,34].

The mean value of the width of the yellow band (Coloration) of the three stations studied equals at 1.37 mm and 1.47 mm. It is higher than that given by Achou and Bendjedid and Achou which are of the order of 0.40 mm and 0.45 mm, Grissa et al. who is from 0.19 mm [21,23,34].

This differentiation of the size is due to the high richness of the vegetation and the moderate climate of North-east Algeria. Thus, this bee has a body more large to browse the long distances in search of its food.

We can assign this differentiation to the existence of a north-south gradient for some morphological characters. In effect, one of the first examples of the North-South gradient has been provided for the bees by a number of Russian authors, as Chochlov, Michailov, Aplatov and Skorikov in Ruttner, who have found that the length of the tongue decreased gradually from north to south [35-38]. In our country, to the north-east, the length of the tongue is of 6.146 mm, it is therefore noted, based on our result and the value of 8.92 mm (S1), 8.16 (S2) and 8.78 (S3), a similarity of the length of the north to the south [19].

This large size in the Length of the tongue of bees, at the levels of sites presented in this study, is an adaptation to several types of flowers on which the bees feed. Indeed, this would lead to admit the existence of a parallel gradient of the average depth of the corollas of species melliferous. The hypothesis, advanced by Ruttner, we seems more likely [39]. It consists to admit that the environmental rules of Bergmann and Allen set for vertebrates to warm-blood apply here on bees [40]. These rules stipulate that the races cold climates tend to be bigger than the races of the same species living in warm climates (rules of Bergmann).

The comparison between the 3 apiaries for each of the 15 characteristics perform with the analysis test of univariate variance reveals that there exist between the three apiaries the differences very highly significant for the average of all the morphometric variables except for the width of the metatarsus shows a significant differentiation and non-significant for the length of the nervure A of the cubital index. These results are confirmed with the analysis of the variance multivariate (MANOVA) which shows that differences was very highly significant between the three apiaries and this for the majority of the 15 characteristics taken in consideration simultaneously.

This variation inter-apiary cannot be attributed to eco-climatic factors only, given that the bees live in the same biotope. We can be attributed to the size of the cells of the brood, because it is at this level that takes place the embryonic development of

bees, consequently, the size of the bees may be affected [19,41-43]. In addition, the parasitism, in particular ectoparasites (for example: *Varroa destructor*) have an effect on the phenotype of bees [39,44,45].

The principal component analysis applied to our bee colonies made it possible to retain the first four components which together account for 66.8% of the total variation. The first component to it only takes into account 38.6% of variability. These four component or synthetic indices summarize the better the information brought by the 15 variables biometrics.

According to our results, we find that the values obtained are closer to the giant bee (*Apis dorsata*) and this is declared by Ruttner and that goes back to the importation of the species by the beekeeper, but we have not yet confirmed, because we are trained to do molecular biology [39].

Conclusion

In conclusion, our results indicate that morphometry study of the Algerian bees in three different sites can be used as a modern program for selection and determination of the different breeds. As results, the most studied characteristics revealed similar in the three tested sites.

Competing Interests

The authors declare that they have no competing interests.

Acknowledgements

This work is part of a doctoral thesis by Houda Bouzeraa. We would like to thank the « the Ministry of High Education and Scientific Research of Algeria » for their financial support.

Reference

1. Breeze TD, Bailey AP, Balcombe KG, Potts SG (2011) Pollination services in the UK: How important are honeybees? *Agric Ecosyst Environ* 142:137-143.
2. Ollerton J, Winfree R, Tarrant S (2011) How many flowering plants are pollinated by animals? *Oikos* 120: 321-326.
3. Michener CD (2000) *The bees of the world*. John Hopkins Univ. Press, Baltimore, Maryland, USA p: 913.
4. Le Conte Y, Navajas M (2008) Climate change: impact on honey bee populations and disease. In: *Climate change impact on the epidemiology and control of animal diseases*. *Rev sci tech off int Epiz* 27: 499-510.
5. Crane E (1999) *The world history of beekeeping and honey hunting*. Taylor & Francis.
6. Danforth BN, Sipes S, Fang J, Brady SG (2006) The history of early bee diversification based on five genes plus morphology. *PNAS* 103: 15118-15123.
7. Michener CD (1974) *The social behavior of the bees: a comparative study*. Cambridge Mass: Harvard University Press.
8. Michener CD, Greenberg L (1980) Ctenoplectridae and the origin of longtonged bees. *Zool J Linn Soc* 69: 183-203.
9. Malyshev SI (1968) *Genesis of the Hymenoptera*. London Methuen.

10. Michener CD (1969) Comparative social behavior of bees. *Ann Rev Entomol* 14: 299-342.
11. Crane E (1976) The world's beekeeping - past and present. Dadant and Sons (ed.), *The Hive and the Honey Bee*. Dadant and Sons, Inc, Hamilton, Illinois, USA pp: 1-38.
12. Crane E (1990) *Bees and Beekeeping: Science, Practice and World Resources*. Comstock Publishing Associates (Cornell University Press), Ithaca, New York.
13. Buttel-Reepen H von (1906) *Apistica Contributions to the systematics, biology, as well as to the historical and geographic distribution of the honey bee (Apis mellifica L.), its varieties and the libigen Apis species*. Zoological Museum in Berlin 3: 121-196.
14. Ruttner F (1968) Les races d'abeilles. In: *Traité de Biologie de l'Abeille*. Chauvin R (Ed.), Masson et Cie, Paris, France pp: 27-44.
15. Frère A (1955) A search of the best bee lines (Second Voyage). *Belgium Beekeeping* 19: 72-80.
16. Baldensperger PJ (1932) Bee varieties in North Africa, *Proceedings of the 5th International Congress on Entomology, Paris, France* pp: 829-839.
17. Haccour P (1960) Research on the Saharan bee in Morocco. *Comptes Rendus, Society of Natural and Physical Sciences of Morocco* 6: 96-98.
18. Loucif W (1993) *Biometric study of populations Of bees from east Algeria Apis Mellifica intermissa*. Thesis of magisterium; Ecology and animal physiology. ISN. Annaba University.
19. Achou M, Soltani N (1997) Impact of *Varroa jacobsoni* Oud. on the morphometry and biochemical composition of hermolymph in honeybees *Apis mellifera intermissa* L. *Parasitica* 53:127-134.
20. Doumandji H (2006) *Biometric study of populations Of bees from Northern Algeria Apis Mellifica intermissa*. Thèse de magistère ; Science animale. El-Harrach-Alger National Agricultural Institute.
21. Achou M (2007) *Morphometric, biochemical and molecular Populations of honeybees in eastern Algeria-Physiopathological effects of its major parasite Varroa destructor*. Doctoral thesis in animal biology. University of Annaba, Algeria p: 136.
22. Barour C (2012) *Analyse De La Biodiversité Des Populations D'abeilles Mellifères Apis Mellifera Intermissa (Buttel-Reepen, 1906) (Hymenoptera: Apoidea) Dans Le Nord Algérien: Morphométrie Moderne Basée Sur la Configuration des Points-Repères (Landmark)*. Thèse de Doctorat en biologie animale. Université de Annaba, Algérie.
23. Bendjedid H, Achou M (2014) Etude de la diversité morphométrique de deux populations d'abeilles domestiques (*Apis mellifera intermissa* et *Apis mellifera sahariensis*) du sud Algérien. *Rev Sci Technol Synthèse* 28: 84-95.
24. Greininger O (1982) L'apiculture en Algérie, *Gazette Apicola* 888: 131-141.
25. Cornuet JM, Daoudi A, Mohssine EH, Fresnaye J (1988) Etude biométrique de populations d'abeilles Marocaines. *Apidologie* 19: 355-366.
26. Leporati M, Valli M, Cavcchi S (1984) Biometric study of the geographical variability of *Apis mellifera* populations in northern Italy. *Apidologie* 15: 285-302.
27. El Banby MA, Aboukorah M (1976) The inheritance of certain quantitative characters. In: *ligusticaxfaciata Honeybee Hybrid, The Libyan Journal of Agriculture* 5: 131-137.
28. Hassanein MH, El Banby MA (1956) Studies on the biometrics of Egyptian honey bee, *Apis mellifera fasciata* Latr. (Hymenoptera: Apoidea). *Bulletin de la Société Entomologique d'Egypte* 42: 127-130.
29. Dagnelie P (1986) *Multivariate statistical analysis*. Gembloux Presses agronomiques p: 362.
30. Dagnelie P (1999) *Theoretical and applied statistics*. Tome 2 Bruxelles, De Boeck et Larcier p: 659.
31. Huberty CJ (1994) *Applied discriminated analysis*. New York Wiley p: 466.
32. Ruttner F (1975) African races of honey bees. *Proceedings XXV International Apiculture Congress, Grenoble* pp: 325-344.
33. Cornuet JM, Fresnaye J, Tassencourt (1975) Discrimination and classification of bees from biometric characters. *Apidologie* 9: 145-187.
34. Grissa K, Cornuet JM, Msadda K, Fresnaye J (1990) Biometric study of populations of Tunisian bees. *Apidologie* 21: 303-310.
35. Chochlov BA (1916) *Investigations on the length of the bee tongue (In Russian)*. Ministry of Agriculture, Petrograd pp: 17-41.
36. Michailov AS (1926) *On the increasing variability of the honey bee from north to south (In Russian)*. *Opytnaja Paseca* 12: 13-14.
37. Alpatov WW (1925) *On the reduction of the length of the honey bees from the south to the north*. *Zoologische Anzeiger* 65: 103-111.
38. Ruttner F, Pourasghar D, Kauhausen D (1985) Die honigbienen des Iran. 2. *Apis mellifera meda Skorikow, die Persische Biene*. *Apidologie* 16: 241-264.
39. Ruttner F (1988) *Biogeography and Taxonomy of honeybees*. Springer-Verlag, Berlin, Germany p: 284.
40. Mayr E (1963) *Animal Species and evolution*. Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, Mass, USA.
41. Abdellatif MA, Abou-E-Naga AM, Ali MH, Shakir PM, Al-Jaltli MK (1977) Biometrical studies on Iraq honeybees. *J Apicult Res* 16: 143-144.
42. Alpatov WW (1929) Biometrical studies on variation and races of the honey bee *Apis mellifera* L. *Q Rev Biol* 4: 1-58.
43. Goetz B, Koeniger N (1992) Structural features trigger capping of brood cells in honey bees. *Apidologie* 23: 211-216.
44. Daly HV (1985) *Insect morphometric*. *Annu Rev Entomol* 30: 415-438
45. Radloff SE, Hepburn HR (2000) Population structure and morphometric variance of the *Apis mellifera scutellata* group of honeybees in Africa. *Genet Mol Biol* 23: 305-316.

Genetic diversity of the Honeybee *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera Apidae) from Jijel (Northeast Algeria)

Houda Bouzeraa¹, Hanen Sellami^{2,3,*}, Radhouane Gdoura², Mohamed Achou¹ & Noureddine Soltani¹

¹Laboratory of Applied Animal Biology, Faculty of Science, Badji Mokhtar University, Annaba, Algeria

²Research Laboratory of Environmental Toxicology-Microbiology and Health (LR17ES06), Faculty of Sciences, University of Sfax-Tunisia, Sfax, Tunisia

³Laboratory of Treatment and Valorization of Water Rejects (LTVRH), Water Researches and Technologies Center (CERTe), University of Carthage, Tourist route Soliman, BP 273-8020, Nabeul, Tunisia

*Corresponding author, email: sellami_hanen@yahoo.fr

ABSTRACT

Traditionally, subspecific classification and phylogeographic inferences in *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera Apidae) were first classified according to their morphological and behavioral traits along with their geographical distributions. Morphometrical analyses conducted on large datasets have established different evolutionary lineages of honeybees. In the last two decades of honeybee genetic analysis and conservation, subsequent studies based on variations in mitochondrial DNA largely confirmed Ruttner's phylogeographic structure of *Apis mellifera*. However, very little is known about Algerian honeybee diversity. Therefore, this study assessed the genetic diversity of honeybees (*Apis mellifera*) in Northeastern Algerian, in North Africa, using the mitochondrial DNA marker (mtDNA) COI-COII (Cytochrome Oxidase I and II). In total, thirty honeybee workers were sampled from three sites of Jijel province. A PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism) analysis of the mtDNA samples distinguished the honeybee evolutionary lineages from this region. Our study revealed that studied honeybee populations have A (African lineages) evolutionary group features. Notably, the northern Algerian honeybee populations had elevated diversity compared to the southern populations.

KEY WORDS

Algerian honeybee populations; *Apis mellifera*; COI-COII intergenic region; Evolutionary lineage, Mitochondrial DNA marker.

Received 08.08.2019; accepted 17.12.2019; published online 30.01.2020

INTRODUCTION

Among insects, Apidae Linnaeus, 1758 (Hymenoptera) are the most important group of pollinators (Bénédicte, 2013) and *Apis mellifera* Linnaeus 1758 is the world's most widely distributed and well-known pollinator. It has naturally spread in Africa, Europe and Western Asia (Miguel et al., 2011), before they were spread around the world by many factors: natural migrations, adaptation to local conditions and some apicultural prac-

tices; such that the imports of queens, introduction of subspecies of foreign bees and the transhumance of colonies. These practices are therefore opposed to the forces exerted by natural selection that differentiates populations (Garnery et al., 1998a, b; Jensen et al., 2005). Based on morphometric characteristics, behavioral and biogeographical studies, 29 different honeybee subspecies have been identified (Ruttner et al., 1978; Ruttner, 1988; Sheppard et al., 1997; Sheppard & Meixner, 2003; Engel, 2004; Meixner et al., 2013) and are classified into

five evolutionary lineages: (M) from Northern Europe and Northern Africa, (A) from South and Central Africa, (C) from the Northern Mediterranean region and Eastern Europe, (O) from the Eastern Mediterranean and the Near and Middle East regions, and (Y) from the eastern African country of Ethiopia. Subsequent studies based on variation in mitochondrial DNA (mtDNA) have largely confirmed this classification (Hall & Smith, 1991; Garnery et al., 1993; Arias & Sheppard, 1996; Franck et al., 2000; Cánovas et al., 2008; Kekecoglu et al., 2009; Alburaki et al., 2011; Papachristoforou et al., 2013; Loucif-Ayad et al., 2014; Achou et al., 2015).

Mitochondrial DNA markers have been widely used to address population and evolutionary questions in the honeybee *A. mellifera*. The characterization of the mtDNA genome has been very useful for analyzing the genetic structure of *A. mellifera* subspecies, as it contains regions with variable evolutionary rates and it is, generally, maternally inherited without recombination (Meusel & Moritz, 1993). Therefore, molecular markers have facilitated more robust assessments of honeybee diversity, such as the reclassification of North African subspecies, *A. mellifera intermissa* (Buttel-Reepen, 1906) and *A. mellifera sahariensis* (Baldensperger, 1932), into the African branch instead of the West European branch (Garnery et al., 1992).

The honeybee subspecies that are native to North Africa belong to the African lineage A (Ruttner, 1988; Garnery et al., 1995; Franck et al., 2001). In Algeria, two honeybee subspecies have been identified: *A. mellifera intermissa*, described

by Buttel-Reepen (1906), is a breed of North Africa, found in Tunisia, Algeria and Morocco along the Mediterranean coast (Cornuet et al., 1988; Grissa et al., 1990); *A. mellifera sahariensis*, described by Baldensperger (1932; see also Haccour, 1960) ranges from Djebel Amour and Ain Sefra in Algeria through the oases of the Sahara south of the Atlas Mountains to Figuig in the west of Morocco (Ruttner, 1968; De la Rúa et al., 2007).

The used genetic marker in these studies was variation in the intergenic region between the cytochrome C oxidase I “COI” and II “COII” gene in mtDNA. It is unique to the genus *Apis* Latreille, 1802 (Cornuet & Garnery, 1991) as determined by restriction analysis “*DraI* restriction enzyme” (Garnery et al., 1993; Franck et al., 1998). This test has been widely used to analyze the evolutionary lineages of *A. mellifera* subspecies (Garnery et al., 1993; 1995; 1998 a, b; De la Rúa et al., 1998; Rortais et al., 2011). Using this method, different haplotypes can be distinguished and grouped into one of the five primary lineages described by Ruttner (1988) and reviewed by De la Rúa et al. (2009).

Studies were realized on the genetic biodiversity of *A. mellifera* in certain regions in Algeria (Chahbar et al., 2012; Loucif-Ayad et al., 2014; Achou et al., 2015; Hu et al., 2016).

The aim of this research was to analysis the genetic diversity of Algerian honeybee populations from three regions in the northeast (Jijel province) of the country. We used the COI-COII mtDNA marker (widely used in studies of honeybees) to identify the evolutionary lineages in our samples.

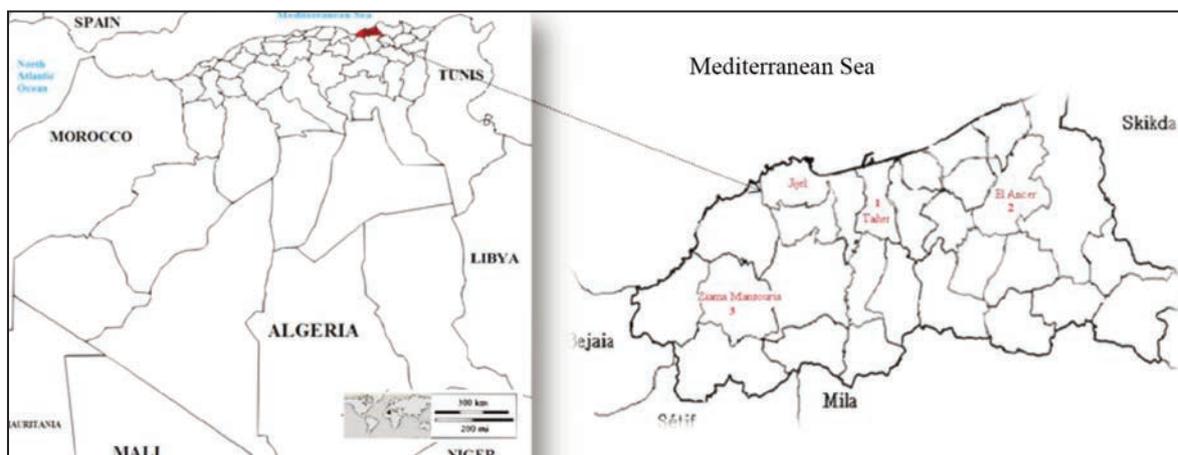


Figure 1. Sampling sites in the Jijel area (Algeria).

This work characterizes the mitochondrial genetic structure of the country's honeybee populations in Algeria.

MATERIAL AND METHODS

Honeybee samples

Thirty adult honeybees were sampled during autumn (October 2016) from three sites across Northeast Algeria (Jijel province). The geographical location and number of individuals sampled from each sites are shown in figure 1 and Table 1. This region spreading over an area of 2398,69 km², characterized by a Mediterranean climate (wet temperate) and per diverse vegetation (Greininger, 1982). Ten worker bees were sampled per site; preserved in absolute ethanol (90%) and stored at 4°C until DNA extraction.

DNA extraction

Genomic DNA was extracted from each bee's head according to the manufacturer's protocol (ZR Tissue & Insect DNA MiniPrep™Kit; Zymo Research, U.S.A). The head of the bees was crushed individually using mechanical homogenizer in a microcentrifuge tube then transferred to a ZR Bashing Bead™ Lysis Tubes. For optimal performance, β-mercaptoethanol supplemented the Genomic Lysis Buffer to a final dilution 0.5% (v/v). A Lysis Solution of 750 µl is added; with shaking by the vortex (10 min.); Lysis Tubes were centrifuged in a microcentrifuge (10000 x g/1min.). We transferred up to 400 µl supernatant to a Zymo-Spin™ IV Spin Filter in a Collection Tube and centrifuged (7000 x g/1 min.); we added 1,200 µl of Genomic Lysis Buffer to the filtrate in the Collection Tube from the previous step and mixed; Then, 800 µl of the mixture from the previous step are transferred to a Zymo-Spin™ IIC Column in a Collection Tube and centrifuge (10000 x g/1min.); the flow through from the Collection Tube was discarded and the previous step is repeated. We added 200µl DNA Pre-Wash Buffer to the Zymo-Spin™ IIC Column in a new Collection Tube and centrifuge it (10000 xg/1 min.), then 500 µl g-DNA Wash Buffer are added to the Zymo-Spin™ IIC Column and centrifuged

(10000 x g/1 min.). Finally, the Zymo-Spin™ IIC Column are transferred to a clean 1.5 ml microcentrifuge tube and we added 30 µl DNA Elution Buffer directly to the column matrix; then the tubes were centrifuged (10000 x g/30s) to elute the DNA.

DNA quality and concentration were measured using a spectrophotometer (NanoPhotometer™-Pearl, Implen GmbH, Schatzbogen, Germany); DNA isolated from each honeybee sample was subsequently stored at -20 °C for further genetic analysis.

Mitochondrial DNA analysis

In this study, we amplified the mtDNA COI-COII intergenic region located between the tRNA^{Leu} gene and the second subunit of the cytochrome oxidase gene II (COII) using the primer pair (Table 2) (Hall & Smith, 1991; Garnery et al., 1991; Smith et al., 1991; Garnery et al., 1993; Alburaki et al., 2011; Meixner et al., 2013).

PCR amplification of the COI-COII intergenic region was performed in a volume of 25 µl via a Thermal cycler C1000™ “CFX96 Real-Detection System, Bio-Rad, U.S.A”. Thermal cycling was as follows: 3 min. initial denaturing at 92 °C, 30 cycles of denaturation at 92 °C for 1 min., annealing at 48°C for 1 min., and extension at 62 °C for 2 min., and a final extension step at 62 °C for 7 min.

Honeybee evolutionary lineage

In order to identify the evolutionary lineage of each individual, 2 µl of each PCR product was loaded into 1.4% agarose gel and electrophoresed along with the M7123-100bp DNA ladder marker (Biomatik, Germany). The gel was then stained for 10 min with ethidium bromide (EtBrat 0.5µg/ml) and finally observed under UV illumination. The length of the amplified mtDNA COI-COII intergenic region was measured for each sample, using the M7123-100bp DNA ladder marker (Biomatik, Germany).

Haplotype identification

The remaining 23 µl volume of each PCR product was digested with four units of the *DraI* restriction enzyme (Takara, Japan) at 37°C for 48 hours.

DNA patterns of each sample were observed under UV illumination and the images were saved in jpeg format for storage.

RESULTS

Restriction enzyme digestion of the mitochondrial fragment containing the intergenic region with *DraI* resulted in two different patterns assignable to

the A mitochondrial lineages (African evolutionary lineage) as described by Cornuet & Garnery, (1991).

In *A. mellifera*, the COI-COII intergenic region varies from 192 to 832bp according on the sub-species. This variability depends on presence or absence of the P or P₀ patterns and number of the repetition of the Q pattern (Table 3). Compared to the marker we used (M7123-100bp DNA ladder), the short pattern P₀Q or PQ (among 500-600 bp) is dominant and represents 99% of our samples (site

	Locations	Geographical position		Number of worker bees sampled
		Latitude	Longitude	
	Jijel province	36° 49' 00" N	5° 46' 00" E	
1	El-Taher	36° 46' 19" N	5° 53' 54" E	10
2	El-Ancer	36° 48' 00" N	6° 09' 25" E	10
3	Ziama mansouriah	36° 40' 25" N	5° 28' 52" E	10
Total	3 sites			30

Table 1. Location and number of honeybees sampled (ten worker bees/site) for Jijel province studied in Algeria.

Primer sequence (5'-3')	
Forward	Reverse
E2 : 5'-GGCAGAATAAGTGCATTG-3'	H2 : 5'-CAATATCATTGATGACC-3'

Table 2. Primers used for Molecular characterization of COI-COII intergenic region from honeybees sampled.

Variant type	Interpretation	Lineages evolutionary
Ultra short	Q	C
Short	PQ or P ₀ Q	M ou A
medium	PQQ or P ₀ QQ	M ou A
Long	PQQQ or P ₀ QQQ	M ou A

Table 3. Structural organization of COI-COII mitochondrial region from honeybees samples.



Figure 2. Visualization of different sizes of the COI-COII fragment on the agarose gel (M: M7123-100bp DNA ladder marker), lane Tah1-Tah10: Site 1 (El-Taher); lane Anc1-Anc10: Site 2 (El-Ancer); lane Zia1-Zia10: Site 3 (Ziama mansouriah); (A): Before digestion with *DraI* restriction enzyme; (B): After digestion with *DraI* restriction enzyme.

1 and 2), the samples from Ziama mansouriah were characterized by medium pattern P0QQ or PQQ, having a low percentage 1%, which coexists with the short pattern P0Q or PQ (Fig. 2).

DISCUSSION

Our study was based mainly on the COI-COII mtDNA marker in order to characterize the genetic variability of the Algerian honeybee populations on a large geographical scale. The COI-COII intergenic mtDNA region had different lengths in the studied populations. Among our samples, the size range was detected between 500bp and 800bp on agarose gel (1.4%) (Fig. 2) compared to the marker we used (M7123-100bp DNA ladder).

As expected from previous results (Cornuet et al., 1991; Garnery et al., 1993, 1995; Franck et al., 2001), this study has shown that Algerian honeybee populations correspond to the African evolutionary lineage. A comparison of the genetic variability between the Algerian populations and Tunisian honeybee populations (Chouchaine, 2010) revealed the presence of three types of restriction fragment P0Q or PQ, P0QQ or PQQ and Q. But, P0Q or PQ variant is a majority and represents about 94.66% of all variants of the Tunisian bees, identification of this profiles by *DraI* restriction enzyme revealed exis-

tence of four African haplotypes A1, A4, A8 and A9; based on this polymorphism, Tunisian honey bees belong to African lineages.

Previous studies have demonstrated similar results in Algerian honeybee populations (Chahbar et al., 2012) in which African haplotypes were strongly dominant despite past importations of European honeybees. These results are highly consistent with those based on prior microsatellite analysis of the honeybee samples (Loucif-Ayad et al., 2014); the data of Achou et al. (2015) revealed the presence of three different honeybee lineages among the studied populations, comprising the African (A) lineages, North Mediterranean (C) and West Mediterranean (M) whose eight different mtDNA haplotypes (A1, A2, A8, A9, A10, A13, C7 and M4).

CONCLUSIONS

In conclusion, our data demonstrated that Algerian honeybee populations belong to the African (A) lineage. According to our research, there is no introgressions (importation of foreign honeybees) among these populations were recorded, which can cause an impact on the genetic diversity of local honey bees. Expanding the sampling to the Algerian honeybee populations is of major importance, as it

will allow a better understanding of the diversity. From a conservation point of view, limiting foreign queen importations to preserve the local genetic diversity of the Algerian honeybee populations is needed.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Algerian beekeepers for their contribution to sampling. We are especially grateful to Mr. Abed El-khalak for his intensive collaboration in honeybee sampling. This work was supported by the Ministry of High Education and Scientific Research of Algeria to Pr. Nouredine Soltani (Laboratory of Applied Animal Biology).

REFERENCES

- Achou M., Loucif-Ayad W., Legout H., Hmidan H., Alburaki M. & Garnery L., 2015. An Insightful Molecular Analysis Reveals Foreign Honeybees Among Algerian Honeybee Populations (*Apis mellifera* L.). *Journal of Data Mining Genomics & Proteomics*, 6: 166. <https://doi.org/10.4172/2153-0602.1000166>.
- Alburaki M., Moulin S., Legout H., Alburaki A. & Garnery L., 2011. Mitochondrial structure of Eastern honeybee populations from Syria, Lebanon and Iraq. *Apidologie*, 42: 628–641. <https://doi.org/10.1007/s13592-011-0062-4>.
- Arias M.C. & Sheppard W.S., 1996. Molecular phylogenetics of honey bee subspecies (*Apis mellifera* L.) inferred from mitochondrial DNA sequence. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 5: 557–566. <https://doi.org/10.1006/mpev.1996.0050>.
- Baldensperger P.J., 1932. Bee varieties in North Africa, *Proceedings of the 5th International Congress on Entomology*. Paris, France,
- Bénédicté B., 2013. Analyse de la diversité moléculaire de populations d'abeilles de la lignée Ouest-Méditerranéenne (*Apis mellifera mellifera*): dans le but de la conservation. Thèse de Doctorat. France: Université Paris Sud XI.
- Buttel-Reepen H.V., 1906. *Apistica Contributions to the systematics biology as well as to the historical and geographic distribution of the honey bee (Apis mellifera L.), its varieties and the albigen Apis species*. Zoological Museum in Berlin, 3: 121–196.
- Cánovas F., De la Rúa P., Serrano J. & Galián J., 2008. Geographical patterns of mitochondrial DNA variation in *Apis mellifera iberiensis* (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 46: 24–30. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0469.2007.00435.x>.
- Chahbar N., Muñoz I., Dall'Olio R., De la Rúa P., Serrano J. & Doumandji S., 2012. Population structure of North African honey bees is influenced by both biological and anthropogenic Factors. *Journal of Insect Conservation*, 17: <https://doi.org/10.1007/s10841-012-9520-1>.
- Chouchène M., 2010. Contribution in the study of biodiversity of Apoidea in Tunisia: Morphometric, molecular and eco-physiologic study of Tunisian bee: *Apis mellifera intermissa* (Hymenoptera: Apidae). *Tunisian Journal of Plant Protection*, 5: 205.
- Cornuet J.M., Daoudi A., Mohssine E.H. & Fresnaye J., 1988. Etude biométrique de populations d'abeilles marocaines. *Apidologie*, 19: 355–366. <https://doi.org/10.1051/apido:19880403>
- Cornuet J.M. & Garnery L., 1991. Mitochondrial DNA variability in honeybees and its phylogeographic implications. *Apidologie*, 22: 627–642. <https://doi.org/10.1051/apido:19910606>.
- Cornuet J.M., Garnery L. & Solignac M., 1991. Putative origin and function of the intergenic region between COI and COII of *Apis mellifera* L. mitochondrial DNA. *Genetics*, 128: 393–403.
- De la Rúa P., Jaffé R., Dall'Olio R., Muñoz I. & Serrano J., 2009. Biodiversity, conservation and current threats to European honeybees. *Apidologie*, 40: 263–284. <https://doi.org/10.1051/apido/2009027>.
- De la Rúa P., Radloff S., Hepburn R. & Serrano J., 2007. Do molecular markers support morphometric and pheromone analyses? A preliminary case study in *Apis mellifera* populations of Morocco. *Archivos Zootecnia*, 56: 33–42.
- De la Rúa P., Serrano J. & Galián J., 1998. Mitochondrial DNA variability in the Canary Islands honeybees (*Apis mellifera* L.). *Molecular Ecology*, 7: 1543–1547. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.1998.00468.x>.
- Engel M.S., 2004. Geological history of the bees (Hymenoptera: Apoidea). *Revista de Tecnologia e Ambiente*, 10: 9–33.
- Franck P., Garnery L., Oldroyd B.P., Hepburn H.R., Solignac M. & Cornuet J.M., 2001. Genetic diversity of the honeybee in Africa: microsatellite and mitochondrial data. *Heredity*, 86: 420–430. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2540.2001.00842.x>.
- Franck P., Garnery L., Solignac M. & Cornuet J.M., 1998. The origin of west European subspecies of honeybees (*Apis mellifera*): New insights from microsatellite and mitochondrial data. *Evolution*, 52: 1119–1134. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1998.tb01839.x>.
- Franck P., Garnery L., Solignac M. & Cornuet J.M., 2000. Molecular confirmation of a fourth lineage in

- honeybees from the Near East. *Apidologie*, 31: 167–180. <https://doi.org/10.1051/apido:2000114>.
- Garnery L., Cornuet J.M. & Solignac M., 1992. Evolutionary history of the honey bee *Apis mellifera* inferred from mitochondrial DNA analysis. *Molecular Ecology*, 1: 145–154. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.1992.tb00170.x>.
- Garnery L., Franck P., Baudry E., Vautrin D., Cornuet J.M. & Solignac M., 1998a. Genetic diversity of the West European honey bee (*Apis mellifera mellifera* and *A. m. iberica*) I: Mitochondrial DNA. *Genetics Selection Evolution*, 30: S31–S47. <https://doi.org/10.1186/1297-9686-30-S1-S31>.
- Garnery L., Franck P., Baudry E., Vautrin D., Cornuet J.M. & Solignac M., 1998b. Genetic diversity of the West European honey bee (*Apis mellifera mellifera* and *A. m. iberica*) II. Microsatellite loci. *Genetics Selection Evolution*, 30: S49–S74. <https://doi.org/10.1186/1297-9686-30-S1-S49>.
- Garnery L., Mosshine E. H., Oldroyd B. P. & Cornuet J.M., 1995. Mitochondrial DNA variation in Moroccan and Spanish honey bee populations. *Molecular Ecology*, 4: 465–472. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.1995.tb00240.x>.
- Garnery L., Solignac M., Celebrano G. & Cornuet J.M., 1993. A Simple Test Using Restricted PCR-Amplified Mitochondrial-DNA to Study the Genetic-Structure of *Apis mellifera* L. *Experientia*, 49: 1016–1021. <https://doi.org/10.1007/BF02125651>.
- Garnery L., Vautrin D., Cornuet J.M. & Solignac M., 1991. Phylogenetic Relationships in the Genus *Apis* Inferred from Mitochondrial DNA Sequence Data. *Apidologie*, 22: 87–92. <https://doi.org/10.1051/apido:19910111>.
- Greninger O., 1982. L'apiculture en Algérie. *Gazette Apicola*, 888: 131–141.
- Grissa K., Cornuet J.M., Msadda K. & Fresney J., 1990. Etude biométrique des populations d'abeilles Tunisiennes. *Apidologie*, 21: 303–310. <https://doi.org/https://doi.org/10.1051/apido:1990045>
- Haccour P., 1960. Research on the Saharan bee in Morocco. *Comptes Rendus Society of Natural and Physical Sciences of Morocco*, 6: 96–98.
- Hall H.G. & Smith D.R., 1991. Distinguishing African and European honeybee matrilineages using amplified mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 88: 4548–4552. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.10.4548>.
- Hu P., Lu Z.X., Haddad N., Noureddine A., Loucif-Ayad W., Wang Y.Z., Zhao R.B., Zhang A.L., Guan X., Zhang H.X. & Niu H., 2016. Complete mitochondrial genome of the Algerian honeybee, *Apis mellifera intermissa* (Hymenoptera: Apidae). *Mitochondrial DNA Part A*, 27: 1791–1792. <https://doi.org/10.3109/19401736.2014.963815>.
- Jensen A.B., Palmer K.A., Chaline N., Raine N.E., Tofilski A., Martin S.J., Pedersen B.V., Boomsma J.J. & Ratnieks F.L.W., 2005. Quantifying honey bee mating range and isolation in semi-isolated valleys by DNA microsatellite paternity analysis. *Conservation Genetics*, 6: 527–537. <https://doi.org/10.1007/s10592-005-9007-7>.
- Kekecoglu M., Bouga M., Soysal M.I. & Harizan P., 2009. Genetic divergence and phylogenetic relationships of Honey Bee populations from Turkey using PCR-RFLP's analysis of two mtDNA segments. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 15: 589–597.
- Loucif-Ayad W., Achou M., Legout H., Alburaki M. & Garnery L., 2014. Genetic assessment of Algerian honeybee populations by microsatellite markers. *Apidologie*, 46: 392–402. <https://doi.org/10.1007/s13592-014-0331-0>.
- 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: 1–28. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.52.4.05>.
- Meusel M.S. & Moritz R.F.A., 1993. Transfer of paternal mitochondrial DNA during fertilization of honeybees (*Apis mellifera* L.) eggs. *Current Genetics*, 24: 539–543. <https://doi.org/10.1007/BF00351719>
- Miguel I., Baylac M., Iriondo M., Manzano C., Garnery L. & Esteban A., 2011. Both geometric morphometric and microsatellite data consistently support the differentiation of the *Apis mellifera* M evolutionary branch. *Apidologie*, 42: 150–161. <https://doi.org/10.1051/apido/2010048>.
- Papachristoforou A., Rortais A., Bouga M., Arnold G. & Garnery L., 2013. Genetic characterization of the Cyprian honey bee (*Apis mellifera cypria*) based on microsatellites and mitochondrial DNA polymorphisms. *Journal of Apicultural Science*, 57: 127–134. <https://doi.org/10.2478/jas-2013-0023>.
- Rortais A., Arnold G., Alburaki M., Legout H. & Garnery L., 2011. Review of the DraI COI COII test for the conservation of the black honeybee (*Apis mellifera mellifera*). *Conservation Genetic Resources*, 3: 383–391. <https://doi.org/10.1007/s12686-010-9351-x>.
- Ruttner F., 1968. Les races d'abeilles. In: *Traité de Biologie de l'Abeille* R. Chauvin (Edition), Masson et Cie. Paris, France, 1: 27–44.
- Ruttner F., 1988. Biogeography and taxonomy of honeybees. Springer Verlag, Heidelberg Berlin, New York, 284 pp.
- Ruttner F., Tassencourt L. & Louveaux J., 1978. Biometrical-statistical analysis of the geographic variability of *Apis mellifera*. *Apidologie*, 9: 363–381. <https://doi.org/10.1051/apido:19780408>.
- Sheppard W.S., Arias M.C., Grech A. & Meixner M.D., 1997. *Apis mellifera ruttneri*, a new honeybee sub-

- species from Malta. *Apidologie*, 28: 287–293. <https://doi.org/10.1051/apido:19970505>.
- Sheppard W.S. & Meixner M.D., 2003. *Apis mellifera pomonella*, a new honeybee subspecies from Central Asia. *Apidologie*, 34: 367–375 <https://doi.org/10.1051/apido:2003037>.
- Smith D.R., Palopoli M.F., Taylor B.R., Garnery L., Cornuet J.M., Solignac M. & Brown W.M., 1991. Geographical overlap of two mitochondrial genomes in Spanish honeybees (*Apis mellifera iberica*). *Journal of Heredity*, 82: 96–100. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a111062>.