

UNIVERSITE D'ANTANANARIVO
FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT D'ENTOMOLOGIE
B.P. 906 Antananarivo 101

MEMOIRE POUR L'OBTENTION DU DIPLOME D'ETUDES APPROFONDIES
EN SCIENCES DE LA VIE
OPTION : ENTOMOLOGIE

**POLYANDRIE ET DIVERSITE GENETIQUE
DE L'ABEILLE *Apis mellifera unicolor* (Hyménoptères
APIDAE)
DE MADAGASCAR**



Présentée par : RASOLOFOARIVAO Henriette

Soutenu le 04 juillet 2011

Devant le jury composé de :

Président : Pr RAZAFINDRASATA Fidimanana
Professeur Titulaire

Rapporteur : Dr RAVELOSON RAVAOMANARIVO Lala Harivelo
Maître de Conférences

Examineur : Dr RAFARASOA Lala Sahondra
Maître de Conférences

REMERCIEMENTS

En premier lieu, je remercie DIEU de m'avoir aidée à surmonter toutes les difficultés rencontrées.

J'adresse également mes vifs remerciements à :

Professeur RAZAFINDRASATA Fidimanana, Professeur Titulaire, Président de Jury

Docteur RAVELOSON RAVAOMANARIVO Lala Harivelo, Maître de Conférences, Rapporteur

Docteur RAFARASOA Lala Sahondra, Maître de Conférences, Examineur

Le responsable du troisième cycle ainsi que tous les enseignants du département Entomologie Messieurs RAKOTONDRA SOA Tolojanahary, RAZAFINDRAZAKA Dimbiarimanga et RANAIVOSON Andry pour la collecte des matériels biologiques, et de m'avoir fait partager leurs expériences en Apiculture.

A l'issue du stage à l'île de la Réunion, je tiens aussi à remercier le CIRAD pôle protections et pôle élevages :

Madame DELATTE Hélène, mon maître de stage, Chercheur du CIRAD UMR PVBMT, de m'avoir accueillie dans le laboratoire de biologie moléculaire de m'avoir encadrée durant cette étude, surtout bien sur les apports en conseils, en aide, et à la correction de mon rapport de stage.

Madame CLEMENCET Johannah Docteur, enseignante de l'université Saint Denis, île de La Réunion pour sa participation aux corrections de ce rapport et la résolution de certains problèmes sur les analyses des données.

Monsieur Thomas FRANCOIS, pour les sorties sur terrain en apiculture à La Réunion.

Monsieur SIMIAND Christophe de m'avoir initié à la biologie moléculaire, pour son attention, ses conseils et son aide, sans lui la biologie moléculaire surtout le microsatellite serait encore obscur pour moi.

Enfin, je remercie aussi ma famille qui m'a soutenue durant mes études ainsi que tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à la réalisation de ce mémoire.

Sommaire

I. INTRODUCTION	1
REVUE DE LITTERATURE	2
1. Matériels biologiques	2
1.1. Les abeilles : <i>Apis mellifera unicolor</i>	2
a) Classification.....	2
b) Morphologie.....	3
c) <i>Écologie</i>	3
d) Biologie de la reproduction : La polyandrie	3
d-1) Les avantages de la polyandrie :	4
d-2) La diversité génétique.....	4
1.2 Le varroa	5
a) Classification.....	5
b) Biologie.....	5
c) Lutte contre le varroa dans le monde	7
d) Varroa à Madagascar	7
II. MATERIELS ET METHODES	8
1 .Sites et méthodes d'échantillonnage	8
2. Extraction de l'ADN	10
3. Analyses moléculaires de l'ADN: microsatellites et ADN mitochondrial	11
3.1. Marqueurs microsatellites	11
a) Définition d'un microsatellite	11
b) Les amorces microsatellites	13
c) Amplification des séquences microsatellites par PCR (Polymérase Chain Réaction) de nos échantillons	14
e) Vérification sur gel d'agarose	15
f) Révélation de l'ADN au bromure d'ethidium.....	15

g) Géotypage.....	16
h) Analyse des lignées paternelles.....	16
3.2. Amplification par PCR de l'ADN mitochondrial.....	17
a) ADN mitochondrial.....	17
b) Cytochrome oxydase	17
c) Amplification du cytochrome oxydase	18
III.RESULTATS	19
Structure de la colonie.....	19
Analyse phylogénétique	25
IV.DISCUSSION	25
Effet du varroa sur les colonies	26
Polyandrie et la diversité génétique	28
Diversité génétique et la résistance au varroa	29
V.CONCLUSION ET PERSPECTIVES	30

LISTE DES FIGURES

- Figure 1 :** Varroa sur la larve d'abeille (race non précisée)
Page 6
- Figure 2 a et b :** Varroa sur pupes d'abeilles (race non précisée)
Page 7
- Figure 3 :** Varroa sur le dos d'une abeille adulte (race non précisée)
Page 7
- Figure 4 :** Test à l'azote liquide (méthode de Marla Spivak)
Page 8
- Figure 5 :** Carte de Madagascar montrant les zones de collectes.
Page 11
- Figure 6 :** Détail d'un microsatellite à 8 répétitions de trinuécléotides TTA
Page 13
- Figure 7 :** Exemple d'une représentation des tri nucléotides microsatellites (CTT)
et les
Page 14 régions flanquantes. Les positions de l'amorce **PCR (PCR primers)** sont indiquées et 3 longueurs différentes de microsatellites sont montrées ici (**A, B, C**)
- Figure 8 :** Milieu électrophorétique constitué de Gel agarose avant révélation sous rayonnement UV
Page 16
- Figure 9 :** Gel d'agarose montrant les bandes d'ADN. De 5 échantillons (1 puits sur 2)
Page 17 d'une plaque à 96 individus ; échelle de marqueur de poids moléculaire
100pb (ladder) dans les 2 extrémités ; les autres puits sont vides.
- Figure 10 :** Analyse factorielle des correspondances (**AFC**), en 3 dimensions sur
les 32 colonies analysées (logiciel Genetix, (Belkhir et al., 1996-2004)). Les
Page 24 axes montrent 50.5% de la variabilité inter colonies observée.
- Figure 11 :** Arbre phylogénétique (Neighbour Joining) reconstruit à partir des
données des séquences de 472 pb de la région intergénique du cytochrome oxidase
Page 26 **COI** et **COII** de l'ADN mitochondrial, les chiffres représentent les valeurs de bootstraps (sur 1000 répétitions).

LISTE DES TABLEAUX

- Tableau 1 :** Présentation des ruches échantillonnées dans les régions d'Antananarivo (A) avec varroa et Manakara (B) sans varroa.
Page 9
- Tableau 2 :** Amorces microsatellites, avec leurs volumes en μ l utilisés
Page 15
- Tableau 3 :** Nombre d'allèle moyen par locus par site
Page 22
- Tableau 4 :** Abondance de varroa observée dur terrain
Page 23
- Tableau 5 :** Taux de polyandrie
Page 24

LISTE DES ANNEXES

Tampon d'extraction N°1 :

1.1) Produits utilisés

1.2) Produits utilisés et quantités

Tampon d'extraction N°1 :

2. 1) Produits utilisées

2. 2) Produits utilisés et quantités

Tableau des fréquences alléliques par locus (f) avec les probabilités non détectées correspondants (DP).

Nombre d'allèles par locus.

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : Acide Désoxyribonucléique, support de l'information génétique héréditaire

ADNmt : ADN localisé dans les mitochondries, caractérisé par une transmission exclusivement maternelle

ADN nucléaire : ADN localisé au niveau du noyau, hérité pour une moitié de la mère et l'autre moitié du père

COI et COII : cytochrome oxydase de type I et de type II, gènes mitochondriaux codant pour une enzyme servant à la respiration

dNATP : mélange des quatre Désoxyribonucléosides triphosphates (A, T, G, C)

DSV : Direction des Services Vétérinaires

PCR : Polymerase Chain Reaction, technique d'amplification d'ADN à la suite d'une série de cycle de dénaturation, d'hybridation et de synthèse

S.DS : Sodium Dodecyl Sulfate, agent dénaturant chimique des protéines

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : Acide Désoxyribonucléique, support de l'information génétique héréditaire

ADNmt : ADN localisé dans les mitochondries, caractérisé par une transmission exclusivement maternelle

ADN nucléaire : ADN localisé au niveau du noyau, hérité pour une moitié de la mère et l'autre moitié du père

AFC : Analyse Factorielle de Correspondance

COI et COII : cytochrome oxydase de type I et de type II, gènes mitochondriaux codant pour une enzyme servant à la respiration

dNTP : mélange des quatre Désoxyribonucléosides triphosphates (A, T, G, C)

DSV : Direction des Services Vétérinaires

LCD :Locus Sexuel Determination

PCR : Polymerase Chain Reaction, technique d'amplification d'ADN à la suite d'une série de cycle de dénaturation, d'hybridation et de synthèse

UV : Ultras Violet

Rpm : Rotor par minute

S.D.S : Sodium Dodecyl Sulfate, agent dénaturant chimique des protéines

GLOSSAIRE

Acétate de potassium: un sel de l'acide acétique et du potassium qui neutralise le milieu à extraire

Agarose : polymère à base d'agar utilisé pour fabriquer un gel

Allèle : version d'un gène formé par des séquences d'ADN

Amorces : (ou « primers ») une courte chaîne d'oligonucléotides complémentaires des extrémités du fragment à amplifier. Deux amorces ont leur extrémité 3' dirigée l'une vers l'autre encadrant ainsi la séquence à amplifier. Elles sont indispensables à l'accrochage de la polymérase.

Amorce microsatellite : court fragment d'ADN, point de départ de la synthèse d'un microsatellite

Amorce F (forward) : amorce sens qui initie la synthèse de l'ADN depuis l'extrémité 3' vers 5' d'une séquence

Amorce R (reverse) : amorces anti-sens, initie la synthèse d'ADN de l'extrémité 5' vers 3' d'une séquence

Bleu de charge : tampon colorant utilisé pour la visualisation de l'ADN lors d'une électrophorèse

Bromure d'ethidium : agent intercalant d'ADN, sensible aux rayons ultraviolets

Comportement hygiénique : comportement qui peut exister chez les abeilles à nettoyer, à enlever les couvains ou les nymphes infestées par les parasites ou pathogènes

Dénaturation d'ADN : séparation des deux brins d'ADN

dNTP : mélange des quatre désoxyribonucléotides : dATP (désoxy adénine tri-phosphate), dCTP (désoxy cytosine tri-phosphate), dGTP (désoxy guanine tri-phosphate), dTTP (désoxy thymine tri-phosphate). Il est utilisé au cours d'une PCR pour la synthèse de l'ADN

EDTA : acide éthylène diamine tétracétique), un acide diaminotétracarboxylique. Son utilisation est très fréquente dans la purification des acides nucléiques (ADN ou ARN). Il inhibe l'action des enzymes DNase, rend la lyse de la membrane nucléaire facile.

Electrophorèse : technique de migration dans un champ électrique de toute molécule polarisée

Formamide : agent dénaturant d'ADN

Gel d'agarose : support de migration en électrophorèse

Locus microsatellite : un site microsatellite accompagné de ses séquences flanquantes

Marqueur génétique : séquence d'ADN repérable spécifiquement

Marqueur de taille ou Ladder : mélange de plusieurs fragments d'ADN de taille précise connue utilisée pour estimer la taille des fragments inconnus lors l'électrophorèse

Mate soft : programme d'analyse génétique des systèmes d'accouplement

Mega 4 : programme d'analyse des séquences nucléotidiques

MgCl₂ : chlorure de Magnésium, donne un pH et une concentration saline optimales au bon fonctionnement des amorces et de la Taq polymérase. Le rôle de la Taq polymérase ne peut se faire lorsque la salinité du milieu est trop élevée.

Microsatellite: séquence d'ADN sous forme de motifs ou tandems répétés

Monogyne : une colonie d'hyménoptères sociaux composée d'une seule reine

Polyandrie : accouplement multiple de la reine chez les hyménoptères sociaux

Protéinase K : une enzyme de la famille des sérines protéases. Elle est utilisée pour digérer des protéines et enlever des contaminants de la préparation d'acides nucléiques. Elle permet de digérer des cellules et d'extraire des acides nucléiques (ADN ou ARN). Elle inactive les ADNases et ARNases. Son activité est stimulée par des agents dénaturants comme le SDS.

SDS : sodium dodécyl sulfate, un agent dénaturant des protéines et qui peut être utilisé pour aider à la lyse des cellules lors de l'extraction d'ADN

Séquence d'ADN : succession ordonnée des bases qui composent un brin d'ADN

Sodium Chloride : chlorure de sodium (Na Cl), un tampon ; l'ADN est précipité en ajoutant de Na Cl.

Sucrose (saccharose) : tampon qui équilibre la force ionique lors d'une extraction de l'ADN

Tampon Type IT : tampon contenant les réactifs PCR tels que le dNTP, MgCl₂, Taq polymérase.

Taq polymérase : une enzyme issue d'une bactérie thermophile nommée *Thermophilus aquaticus* isolée en 1965 dans les sources chaudes du parc de Yellowstone assurant la duplication de l'ADN dans la réaction de PCR. Elle travaille à partir d'une double hélice en ajoutant des désoxynucléotides à l'extrémité 3' en croissance.

Tris HCl : le Tris est l'abréviation de trishydroxyméthylaminométhane, Il est utilisé comme tampon des acides nucléiques .Une variante commune de tris est le tris-HCl, tampon qui améliore l'efficacité de la protéinase K.

Varroa : acarien ectoparasite de l'abeille

I. INTRODUCTION

Les abeilles tant domestiques que sauvages tiennent un rôle clef dans le maintien de l'équilibre des écosystèmes terrestres. En effet, la majorité des phanérogames ne pourrait accomplir leur reproduction sans l'intervention de pollinisateurs, qui jouent un rôle important et prépondérant dans leur pérennisation (Allen-Wardell *et al.*, 1998, Michener, 2000). A Madagascar, l'abeille *Apis mellifera unicolor* est endémique et est supposé n'avoir été introduite qu'au XVII^{ème} siècle dans les îles Mascareignes (Crane, 1990, Tribe, 1987). Elle participe non seulement à la pollinisation d'une très grande partie de la flore locale endémique de Madagascar mais aussi à celles des grandes cultures vivrières ou d'exportation telle que le litchi.

En 2010, le varroa a été identifié et déclaré pour la première fois à Madagascar dans certaines régions d'Antananarivo (D.S.V, 2010), des effondrements de ruchers et des colonies d'abeille qui dépérissent ont été constatés. De ces faits, les conséquences de l'existence de ce parasite risquent d'être dramatiques que ce soit du point de vue du rôle d'abeille dans la pollinisation de la flore endémique, mais aussi de celle des grandes cultures qui dépendent essentiellement des abeilles. Par exemple, une diminution de la production de litchis risque de se produire en raison de la disparition des abeilles responsables à plus de 90% de la fécondation de cet arbre fruitier (Stern and Gazit, 1996). Cette diminution est à craindre dans un futur proche du fait que le varroa est actuellement en phase de se propager dans les zones de production de litchis notamment dans la région Est (Toamasina), première région productrice de litchi (journal « express de Madagascar », septembre 2010).

Outre leur rôle pollinisateur, les abeilles sont des insectes sociaux généralement monogynes, et aussi polyandres, c'est-à-dire que lors du vol nuptial d'une seule reine, elle peut s'accoupler plusieurs fois. Plusieurs études ont démontré qu'en moyenne 8 à 27 mâles seraient impliqués (Palmer and Oldroyd, 2000). De nombreuses hypothèses ont été suggérées à la base de ce comportement appuyant le bénéfice potentiel de la polyandrie (Arnqvist and Nilsson, 2000, Jennions and Petrie, 2000). Toutefois, de toutes les hypothèses émises, celle de l'augmentation de la « diversité génétique » semble être la plus plausible expliquant les multiples accouplements chez les abeilles, et aussi chez d'autres Hyménoptères sociaux (Crozier and Page, 1985, Palmer and Oldroyd, 2000). De plus, la diversité génétique pourrait avoir un rôle dans la réduction de la prévalence des parasites et des pathogènes chez les membres de colonies (Baer and Schmid-Hempel, 1999, Hamilton, 1987, Schmid-Hempel, 1995, Schmid-Hempel, 1998, Sherman *et al.*, 1988, Shykoff and Schmid-Hempel, 1991, Shykoff and Schmid-Hempel, 1991). La résistance à la varroase est possible grâce à un

comportement dit « hygiénique ». Cependant, seules quelques lignées en sont dotées (Arechavaleta-Velasco and Guzmán-Novoa, 2001, Corrêa-Marques *et al.*, 2000). Dans ces conditions, une plus forte diversité au sein des colonies augmenterait ainsi les chances d'avoir des lignées ayant la capacité à nettoyer les couvains ou les nymphes infestées et donc de résister à la maladie.

Dans cette étude, nous nous proposons d'étudier le taux de polyandrie chez *Apis mellifera unicolor*, et aussi de comparer la diversité génétique dans des colonies infestées par le varroa à celles indemnes. Pour cela, deux types de marqueurs moléculaires ont été utilisés, les microsatellites et l'ADN mitochondrial (ADN mt). Les analyses microsatellites nous ont permis d'évaluer la diversité intra/inter colonies et le taux de la polyandrie dans les colonies infestées par la varroase (ruches d'Antananarivo) et celles indemnes (ruches de Manakara). L'analyse de l'ADN mitochondrial nous a permis d'évaluer la diversité inter sites, de déterminer l'origine maternelle des colonies, et de réaliser une comparaison de nos souches à celles connues dans le monde.

REVUE DE LITTERATURE

1. Matériels biologiques

1.1. Les abeilles : *Apis mellifera unicolor*

a) Classification

Règne :	ANIMAL
Super Embranchement:	INVERTEBRES
Embranchement :	ARTHROPODES
Sous Embranchement :	EUARTHROPODES
Super Classe :	MANDIBULATES, ANTENNATES
Classe :	INSECTES, HEXAPODES
Sous Classe :	PTERYGOTES
Super Ordre:	HYMENOPTEROIDES
Ordre:	HYMENOPTERES
Sous Ordre:	APOCRITES
Super Famille:	APOIDEA
Famille:	APIDAE
Sous Famille:	APINAE
Genre :	<i>Apis</i>
Espèce :	<i>mellifera</i>
Variété :	<i>unicolor</i>

b) Morphologie

Les abeilles sont des insectes sociaux, elles ne peuvent avoir une existence isolée et ont besoin de vivre en colonie. Une colonie compte entre 20000 et 80000 abeilles et s'organise autour de trois castes distinctes : une reine, des mâles ou faux bourdons, des femelles ou ouvrières. Ce sont les ouvrières néonates qui sont utilisées en étude systématique. Elles sont de petite taille (10mm), tout leur corps a une couleur foncée uniforme et présente une faible pilosité (Ruttner, 1975). Les faux bourdons sont beaucoup plus gros que les ouvrières et mesurent 16mm. Leur corps est entièrement noir brunâtre. La reine a la taille plus longue et plus lourde qu'une ouvrière (18mm). La couleur de leur thorax est noir brunâtre, mais les pattes sont bruns rougeâtres et l'abdomen a un reflet bleuté.

c) Écologie

La race d'abeille *unicolor de Madagascar* présente deux écotypes : un écotype d'altitude c'est à dire des hauts plateaux, peu agressif et un autre écotype des régions côtières de basses altitudes, à comportement plus agressif. Selon l'abondance en ressources nectarifères et pollenifères du milieu, le premier type forme des *essaïms sédentaires* alors que le second forme des colonies plus petites, très facilement migratrices. Par ailleurs, ce dernier accumule des réserves en quantité moindre (Ralalaharisoa-Ramamonjisoa, 1992).

d) Biologie de la reproduction : La polyandrie

Le mode de reproduction des abeilles est du type haplodiploïde. La reine pond des œufs qui peuvent être ou non fécondés. Les œufs non fécondés se développent obligatoirement en mâles haploïdes tandis que les œufs fécondés, diploïdes évoluent soient en femelles s'ils sont hétérozygotes au niveau du locus du CSD (Complementary Sex Determination) soient en mâles s'ils sont homozygotes au niveau du même locus mais généralement ces derniers n'arrivent pas à maturité (Woyke, 1963).

Lors du vol nuptial, la reine peut être inséminée par de nombreux mâles. Palmer et Oldroyd ont démontré en 2000 qu'une reine d'abeille peut s'accoupler avec 8 à 27 mâles en moyenne selon leur sous espèces ou races. Par exemple, pour *Apis mellifera ligustica* (l'abeille italienne), une reine a été estimée ayant été fécondée par 5 à 20 mâles (Adams *et al.*, 1977, Estoup *et al.*, 1994, Haberl and Moritz, 1994, Peer, 1956, Taber, 1954, Taber, 1958, Woyke, 1962). Le nombre de mâles fécondants est fonction des variations saisonnières du climat et de la maturité des mâles disponibles (Lensky and Demter, 1985, Neumann *et al.*, 1999).

d-1) Les avantages de la polyandrie :

Provision de spermatozoïde pour une longue ponte de la reine (Cole, 1983) : Pour *Apis mellifera ligustica*, durant l'accouplement, 2.2 µl de sperme pour chacun des mâles est déposé dans l'oviducte latéral de la reine, 10 à 20 heures après l'accouplement, 0.78 µl de toute la totalité de spermatozoïdes est activement et passivement transféré dans la spermathèque et il y est stocké durant la vie de la reine pour la fertilisation de ses œufs (Ruttner and Koeniger, 1971, Woyke, 1955, Woyke, 1962).

Bénéfice pour la reine : la polyandrie augmente la fitness de la reine en raison de la variabilité génétique de la colonie (Boomsma and Ratnieks, 1996).

Réduction du conflit entre la reine et les ouvrières sur un sexe ratio préféré et sur le sexe allocation (Trivers and Hare, 1976).

Limite le risque d'accouplement avec des mâles stériles (Walker, 1980).

Réduction de la charge génétique de la colonie (Crozier and Page, 1985).

Réduction de la variance de la production de mâles diploïdes (homozygote au locus sexuel) (Crozier and Page, 1985, Page, 1980, Pamilo *et al.*, 1994, Ratnieks, 1990).

La diversité génétique (Crozier and Page, 1985, Palmer and Oldroyd, 2000).

d-2) La diversité génétique

La diversité génétique augmente la diversité comportementale des tâches des ouvrières (Fuchs and Moritz, 1999, Fuchs and Schade, 1994, Oldroyd *et al.*, 1994, Oster and Wilson, 1979)

Les ouvrières accomplissent différentes tâches en fonction de leurs âges (polythéisme d'âge), cette distribution des différentes tâches à l'intérieur des groupes d'âge se fait aussi en fonction de la prédisposition génétique que peuvent avoir les abeilles.

Ainsi, des variations d'origine génétique dans l'âge auquel des abeilles débutent leur activité de butinage et dans la fréquence à laquelle elles effectuent les différentes tâches à l'intérieur du nid ont été démontrées par Calderone et Page (1988).

Robinson et Page (1988) ont montré une différence dans la distribution des génotypes entre les abeilles gardant l'entrée de la ruche, celles ayant un comportement hygiénique (nettoyage des cellules de couvain) et l'ensemble des ouvrières.

Calderone et al. (1989) ont démontré qu'il existe une différence génétique, en terme de proportions des diverses fratries, entre les butineuses qui récoltent préférentiellement le pollen et celles qui préfèrent le nectar.

Frumhoff et Baker (1988) ont mis en évidence le déterminisme génétique du comportement de soin et de nourrissage des congénères en utilisant des colonies avec deux lignées paternelles ayant une coloration différente.

La diversité génétique réduit la prévalence des parasites et des pathogènes : chez les membres de la colonie, la défense de l'abeille contre les pathogènes se traduit par un certain nombre de comportements comme l'épouillage, le caractère hygiénique qui lui permet de se défendre contre les loques et même contre le varroa (Baer and Schmid-Hempel, 1999, Hamilton, 1987, Schmid-Hempel, 1995, Schmid-Hempel, 1998, Sherman et al., 1988, Shykoff and Schmid-Hempel, 1991, Shykoff and Schmid-Hempel, 1991).

Une large variance génétique augmente la tolérance coloniale au changement spatial et temporel de l'environnement (Crozier and Page, 1985, Oldroyd *et al.*, 1992).

1.2 Le varroa

a) Classification

Règne : ANIMAL
Embranchement : ARTHROPODES
Super Classe : CHELICERATES
Classe : ARACHNIDES
Sous Classe : ACARIENS
Super Ordre : PARASITIFORMES
Ordre : MESOSTIGMATA
Sous Ordre : MONOGYNASPIDA
Super Famille : DERMANYSSOIDEA
Famille : VARROIDEA
Genre : *Varroa*
Espèce :

b) Biologie

Le varroa est un ectoparasite hématophage des abeilles (Vidal-Naquet, 2008). Il est parasite de tous les stades post embryonnaires de l'abeille *Apis mellifera*, des adultes, des larves et des nymphes (fig.1; fig.2 a, b ; fig.3) (Colin *et al.*, 1997). À l'origine, cet acarien est un parasite de l'abeille asiatique *Apis cerana* mais il a attaqué aussi certaines races d'*Apis mellifera* (Vidal-Naquet, 2008) et a commencé à s'adapter à son cycle de vie ; Celle-ci a pu également développer des mécanismes de résistance. *Apis mellifera scutellata* (l'abeille africaine), ne

semble par exemple pas du tout incommodée par le varroa, car elle a développé un comportement hygiénique lui permettant de s'en débarrasser (Jacobsen, 2009).

Le varroa est transporté de ruche en ruche par la reine, les ouvrières et mâles infestés. Le varroa suce l'hémolymphe de l'abeille et lui transmet, par le fait même, plusieurs maladies, tel que le virus des ailes déformées (Vidal-Naquet, 2009).



Figure 1 : Varroa sur la larve d'abeille (race non précisée)
Source: ([http:// commons.wikimedia.org](http://commons.wikimedia.org))

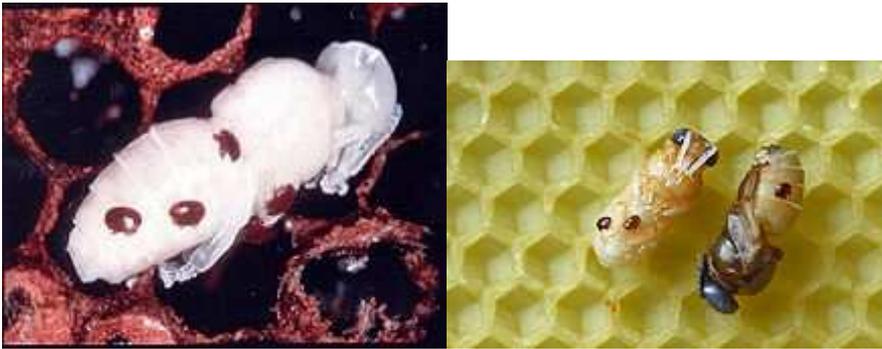


Figure 2 a et b: Varroa sur pupes d'abeilles (race non précisée)
Source: ([http:// commons.wikimedia.org](http://commons.wikimedia.org))



Figure 3 : Varroa sur le dos d'une abeille adulte (race non précisée)
Source: ([http:// commons.wikimedia.org](http://commons.wikimedia.org))

c) Lutte contre le varroa dans le monde

Traitement chimique

En Europe, seuls deux produits sont homologués pour le traitement de la varroase : l'acide formique et le fluvalinate. Néanmoins utilisés seuls et de façon répétée, les colonies de *Varroa* montrent au bout de quelques générations des résistances (Currie and Gatién, 2006).

Développement du comportement hygiénique

Les colonies dites hygiéniques ayant un comportement de nettoyage et d'élimination sélective des larves parasitées résistent mieux à la varroase (Arechavaleta-Velasco and Guzmán-Novoa, 2001, Corrêa-Marques and De Jong, 1998, Corrêa-Marques et al., 2000). Indirectement, ce comportement favorise le développement de la résistance à la varroase.

Il est connu aussi que les abeilles dites « S.M.R. » (Suppressed Mite Reproduction) sont capables de détecter et enlever les nymphes infestées par les varroas (Harbo and Harris, 2005, Ibrahim and Spivak, 2004, Ibrahim and Spivak, 2005).

Avec le test de congélation de cadre de couvain à l'azote liquide et remplacement du cadre directement dans la ruche après 48 heures, les colonies hygiéniques sont capables de nettoyer 95 % des cellules abimées (Spivak and Gilliam, 1998).

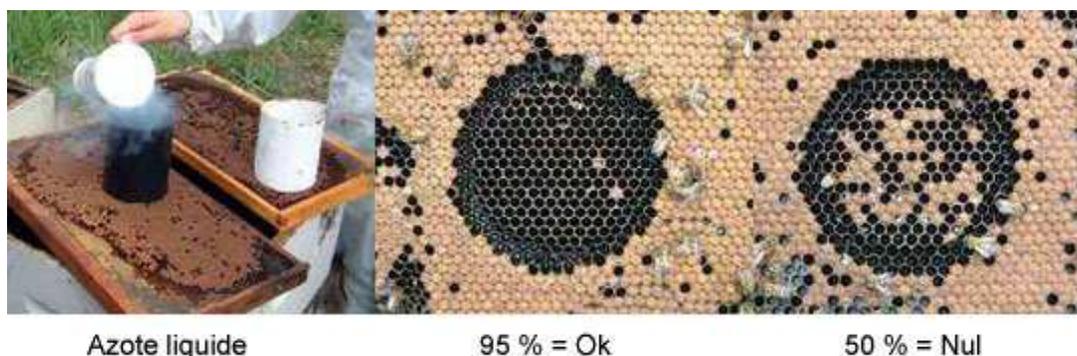


Figure 4 : Test à l'azote liquide (méthode de Marla Spivak)
(source : <http://home.euphony.net.be/abeille/elv/nettoyage.html>)

d) Varroa à Madagascar

Depuis 2010, la filière apiculture malgache est sous la menace de la varroase à cause de l'apparition de varroas parasites d'abeilles. Le varroa destructeur a été détecté dans différents districts tels qu'Ambohidratrimo, Manjakandriana et Analamanga (D.S.V, 2010). Ultérieurement, ce parasite a aussi été détecté dans la région Est de Madagascar (Toamasina).

II. MATERIELS ET METHODES

1 .Sites et méthodes d'échantillonnage

Sites de collectes :

Les échantillonnages ont été menés de novembre 2010 à janvier 2011. Cinq sites infestés par le varroa ont été choisis dans la région d'Antananarivo et les collectes ont permis de rassembler 960 ouvrières issues de 32 ruches d'abeilles. A Manakara, deux sites indemnes de varroa ont été sélectionnés comme sites de collecte (Tableau 1). Les ruches d'Antananarivo échantillonnées sont a priori soumis aux mêmes conduites apicoles puisque gérées par un même apiculteur. Par contre celles de Manakara ont des propriétaires différents mais tous deux encadrés par l'association des apiculteurs de la région.

Prélèvements des abeilles:

Les abeilles dites « naissantes » reconnaissables à leur couleur plus claire ont été prélevées à l'aide d'une pince fine dans chaque ruche et ont été placées dans des tubes numérotés contenant de l'alcool 96°. Cette précaution minimise l'échantillonnage d'ouvrières étrangères à la ruche.

Afin de pouvoir identifier les différentes colonies, une feuille d'échantillonnage portant des informations spécifiques concernant chaque colonie a été établie (Tableau 1). Ainsi, la localisation exacte des lieux de prélèvements avec les coordonnées GPS, l'origine de la reine, le type de rucher sédentaire ou transhumant, le type de ruche Langstroth ou Dadant ou autre ont été notés. Le degré d'infestation des colonies par le varroa et le nombre de varroa par tube ont été évalués (tableau 5).

Tableau 1 : Présentation des ruches échantillonnées dans les régions d'Antananarivo (A) avec varroa et Manakara (B) sans varroa.

A

Rucher	sites	latitude Longitude Altitude (m)	Date de collecte	Origine de la reine	Abondance de varroa	Informations supplémentaires
5	Betoaha(Anerinerina) 34 Km	S : 18° 49'	27/11/2010	Mantaso	inconnu	agressive
6		11.4''		Ambohidratrimo		
7		E : 047° 43'		Mataso (par essaim)		
8				Mantaso		
9	04.1''	Mantaso	(1486)			
10	Ambohimalaza 14,5 Km	S : 18° 53'	07/01/2011	Ambohitrolomahitsy	forte	
11		33.2''		Ambohitrolomahitsy		
12				Mantaso		
13		14		E : 047° 37'		
14	19.1''	(1339)				
15	Amby (District Manjakandriana commune Ankazondandy) 49 Km	S : 18° 40'	18/01/2011	Ambohidratrimo an'ala	forte	Population moyenne 2 reines cohabitées agressive
16		55.8''	10/2010			
17		E : 047° 44'				
18		51.7''				
19	(1418)					
20	Cité de prof Ankatso	S : 18° 54'	17 / 01 / 11	Ambohidratrimo an'ala	inconnu	
21		41.5''				
22						
23		57.5''				
26	Masakalina 109 Km	S : 18° 20'	18/01/2011	Masakalina (Forêt environnante)	peu	
27		06.9''				
28		E : 047° 53'				
29		01.3''				

B

colonie	site	latitude Longitude	Date de collecte
1	Valavahy	47°55'14.3''	
2	valavahy	22°11'40.5''	
3	valavahy		
4	valavahy		
5	valavahy		
31	Mamotrataka		06/01/2011
32	Mamotrataka		06/01/2011

Les sites de prélèvement, les dates de collecte, le nombre d'abeilles échantillonnées et nombre de varroa retrouvés sur les abeilles collectées sont notifiés.

Toutes les ruches prélevées d'Antananarivo étaient de type sédentaire et Langstroth, de dimension : 50 cm x 42 cm x 20 cm. Les ruches de Manakara sont de type sédentaire et Dadant, de dimension 49cm x 34cm x30cm

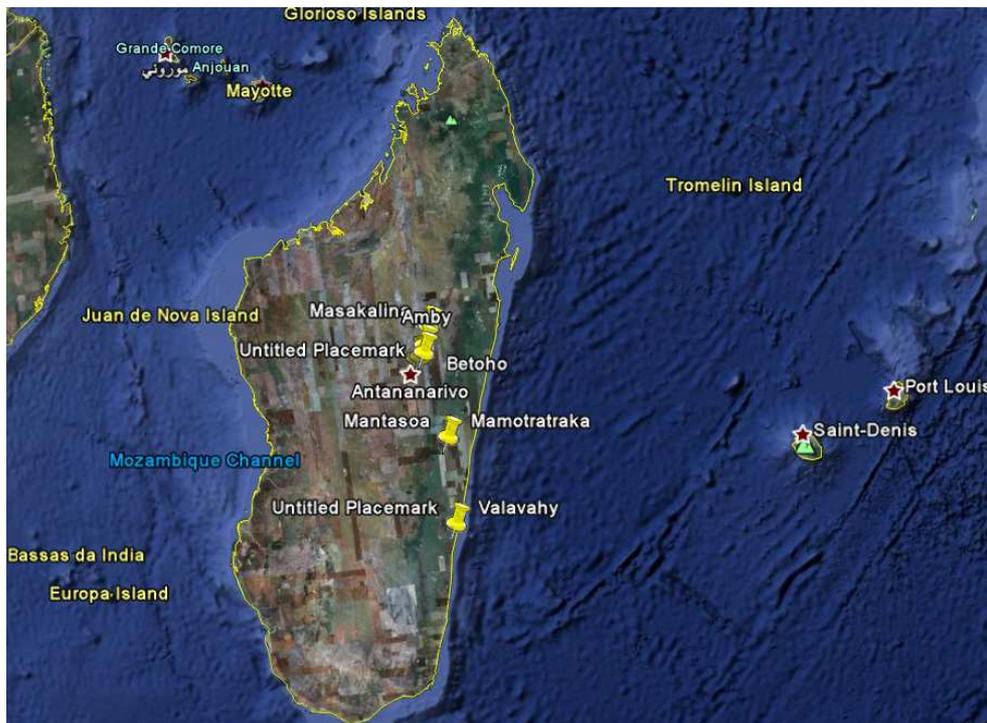


Figure 5 : carte de Madagascar montrant les zones de collectes.
Source : Google Earth

2. Extraction de l'ADN

Pour chaque abeille prélevée issue des différentes zones d'échantillonnage et de chaque colonie, les trois paires de pattes (pattes prothoraciques, mésothoraciques et métathoraciques) ont été prélevées et l'ADN total a été extrait.

Pour ce faire, les 6 pattes d'une abeille ont été arrachées ensuite placées dans un puits d'une plaque pour extraction à 96 puits. Dans le puits a été ensuite ajouté 400 µl de tampon 1 contenant de la protéinase K, enzyme pouvant digérer les protéines des membranes cellulaires facilitant la désintégration membranaire (cf. annexe 1). Cette méthode a permis la libération des acides nucléiques (ADN et ARN) contenus dans les noyaux. L'activité de l'enzyme a été stimulée par les agents dénaturants SDS et Tween du tampon 1.

Après brève centrifugation de 5 mn, l'addition de 50 µl d'acétate de potassium (tampon 2) (annexe 2) a permis à la fois de neutraliser le milieu réactionnel de chaque puits mais aussi de précipiter le SDS ainsi que les protéines libérées sous forme de complexes protéines-SDS-

Potassium. Ces agrégats ont formés des culots après une centrifugation de 30 minutes à 4700 rpm et l'ADN présent dans le surnageant sera ensuite prélevé.

400 µl de surnageant ont été ainsi prélevés et concentrés par précipitation avec 1ml d'éthanol absolu suivi d'une seconde centrifugation d'une heure à 4700 rpm. Après avoir enlevé l'éthanol, l'ADN a été remis en suspension dans un tampon d'élution (annexe 2).

L'ADN ainsi extrait a été stocké au congélateur (-20°C) dans le tampon d'élution avant analyse par PCR.

3. Analyses moléculaires de l'ADN: microsatellites et ADN mitochondrial

3.1. Marqueurs microsatellites

a) Définition d'un microsatellite

Un **microsatellite** ou une **séquence microsatellite** est une séquence d'ADN de chromosome constituée par la répétition en tandem d'un motif de 1 à 5 paires de bases (pb) (Estoup and Solignac, 1995). La longueur de ces séquences, c'est-à-dire le nombre de répétitions, est variable selon les espèces, les individus d'une même espèce et les allèles d'un même individu. Les régions flanquantes situées de part et d'autre d'un microsatellite, permettent de le repérer ; ce sont sur ces régions flanquantes que les amorces spécifiques de chaque microsatellite sont dessinées.

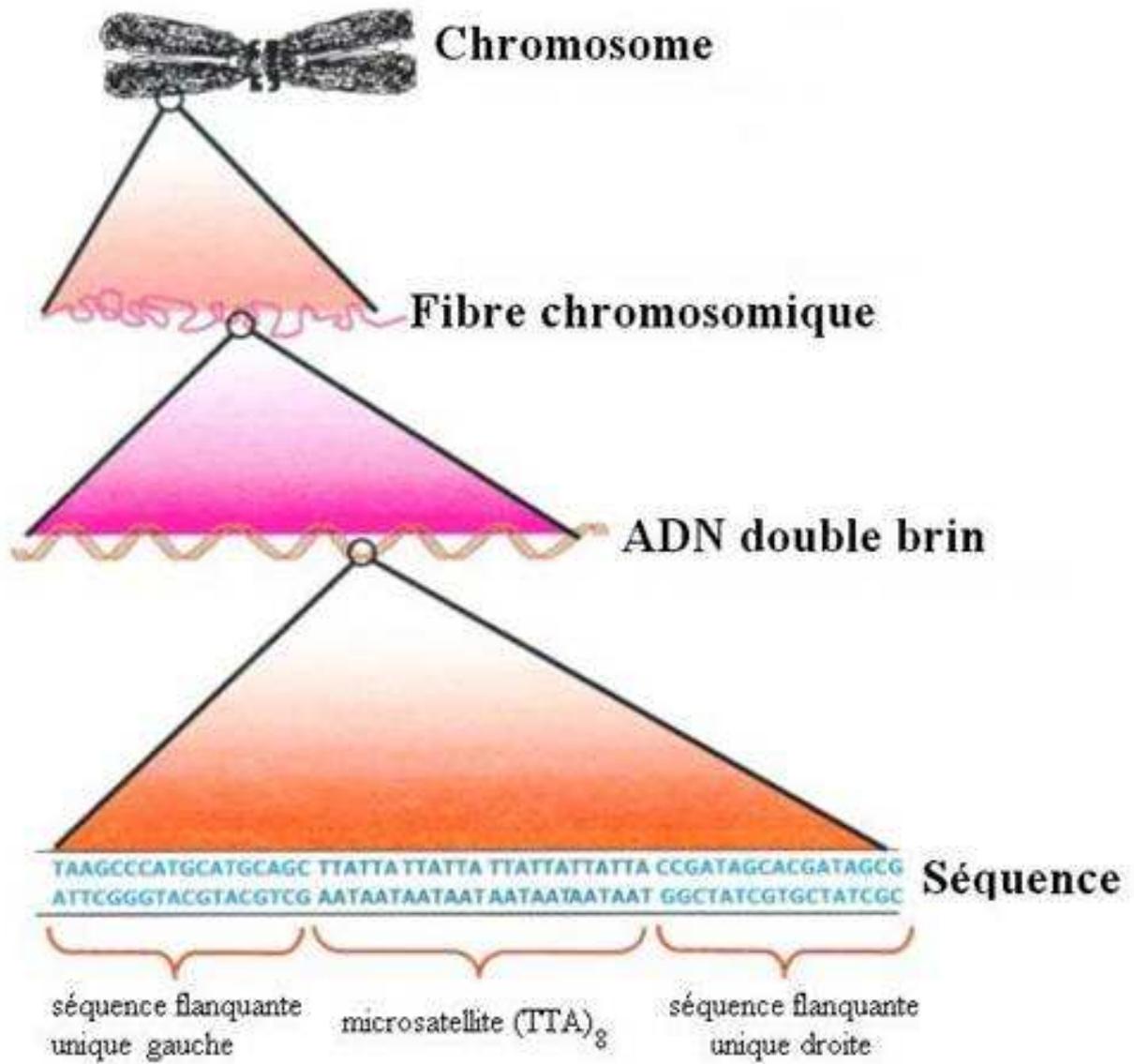


Figure 6 : Détail d'un microsatellite à 8 répétitions de trinucleotides TTA

(Source : http://www.edu.upmc.fr/sdv/masselot_05001/polymorphisme/microsatellites.html)

Tableau 2 : Amorces microsatellites, avec leurs volumes en μl utilisés

Nom des amorces	Volume (μl) utilisé	Séquence des amorces	No	T($^{\circ}\text{C}$)
AP55-1-F	0.2	GAT CAC TTC GTT TCA ACC GT	3	55
AP55-2-R	0.2	CAT TCG GTA TGG TAC GAC CT		
A7-F	0.2	GTT AGT GCC CTC CTC TTG C	3	
A7-R	0.2	CCC TTC CTC TTT CAT CTT CC		
A113-F	0.2	CTC GAA TCG TGG CGT CC	6	
A113-R	0.2	CCT GTA TTT TGC AAC CTC GC		
AP81-1-F	0.2	GCA TCG TCG AGG CGT TGA	3	
AP81-2-R	0.2	GAA AAG TAT TCC GCC GAG CA		
AC306-a-F	0.2	GAA TAT GCC GCT GCC ACC	4	
AC306-b-R	0.2	TTT CGT TGC ATC CGA GCG		
A24-F	0.2	CAC AAG TTC CAA CAA TGC	4	
A24-R	0.2	CAC ATT GAG GAT GAG CG		

F : amorce sens (Forward) ; R : amorce anti-sens(Reverse) ; les séquences complémentaires de chaque région flanquante sont indiquées, T° : Température d'hybridation utilisée pour les amorces (en degrés Celsius) ; No : nombre d'allèles par locus.

c) Amplification des séquences microsatellites par PCR (Polymérase Chain Réaction) de nos échantillons

L'ADN extrait a été utilisé pour l'analyse par marqueurs microsatellites. Tous les spécimens d'abeilles ont été analysés pour 6 loci microsatellites; Les marqueurs microsatellites utilisés pour caractériser les fratries sont les loci AC306, Ap55, Ap81, A7, A24, A113, développés par Solignac et al. (2003) (Tableau 2).

Pour chaque échantillon, 0.5 μl d'ADN dilué à 1/10ième et 9.5 μl d'un mélange réactionnel pour PCR (Tableau annexe 2) comprenant les amorces microsatellites, la taq polymérase, les dNTP et un tampon a été préparé. Le mélange est ensuite placé dans un thermocycleur programmé pour un cycle à 94 $^{\circ}\text{C}$ (5 min), puis à 94 $^{\circ}\text{C}$ (30secondes) pour 35 cycles ensuite à 55 $^{\circ}\text{C}$ (30secondes),et à 72 $^{\circ}\text{C}$ (30secondes) et enfin une étape finale à 72 $^{\circ}\text{C}$ (10 min).

d) L'électrophorèse des fragments d'ADN:

L'électrophorèse sur gel d'agarose est utilisée pour la séparation des fragments de l'ADN en fonction de leurs poids moléculaires dans un champ électrique . Les molécules de petite taille

se déplacent plus rapidement et migreront plus loin par rapport aux molécules de grande taille.

e) Vérification sur gel d'agarose

Gel d'agarose

L'agarose est un polymère à base d'agar purifié. Un tampon TAE (Tris Acétate EDTA) a été utilisé pour dissoudre l'agarose.



Figure 8 : Milieu électrophorétique constitué de Gel agarose avant révélation sous rayonnement UV.

Migration sur gel d'agarose de l'ADN amplifiée par PCR

Avant migration sur gel des fragments/ aliquotes, 1 μ l de « Bleu de charge » a été ajouté dans 5 μ l de chaque échantillon pour pouvoir visualiser un front de migration. Pour la vérification d'une bonne amplification en PCR, un gel d'agarose (4%) a été déposé avec 5 μ l de l'amplification PCR de 5 échantillons de chaque plaque contenant 90 individus et on laisse migrer le gel pendant 35 minutes à 100 volts.

f) Révélation de l'ADN au bromure d'ethidium

Après la migration d'électrophorèse, les fragments l'ADN ont été révélés par bromure d'ethidium dilué (agent intercalant sensible aux UV utilisé comme marqueur d'ADN) (bain de bromure d'éthidium dilué).

Le gel a ensuite été soumis à un éclairage avec une lampe à UV dans une chambre noire afin d'observer les bandes d'ADN fluorescentes et les photographier.

L'estimation de la taille des fragments s'est faite grâce à la comparaison avec l'échelle du marqueur de taille moléculaire (ladder 100 paires de base (pb)) utilisée simultanément dans deux puits aux extrémités du gel lors de la migration.

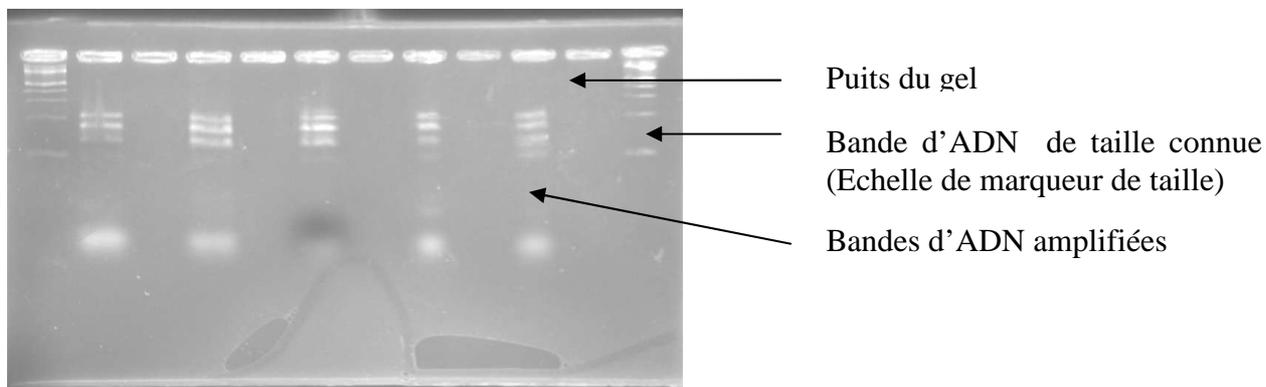


Figure 9 : Gel d'agarose montrant les bandes d'ADN. de 5 échantillons (1 puits sur 2) d'une plaque à 96 individus ; échelle de marqueur de poids moléculaire 100pb (ladder) dans les 2 extrémités ; les autres puits sont vides.

g) Génotypage

Après amplification, les produits de PCR ont été par la suite dilués au 1/40ème. 1 µl du produit de PCR de chaque individu a été mélangé à 10.7 µl de formamide (un agent dénaturant) (Formamide) contenant 0.3 µl du marqueur de taille Gens Can 500 Liz Size Standard. (La dénaturation complète de tous les ADN bicaténaires est assurée en redénaturant l'ADN durant 5 minutes à 95°C). Ce mélange est ensuite passé dans un génotypeur à électrophorèse capillaire pour la séparation des allèles amplifiés de différents marqueurs. Les profils d'électrophorèse sont capturés par le logiciel AB applied biosystem 3130 xL Data Collection.

La lecture des données issues du séquenceur (taille des différents allèles amplifiés) a été réalisée à l'aide du logiciel GeneMapper et nous a permis de caractériser chaque ADN extrait. En effet, chaque ouvrière, diploïde, possède deux allèles (2 pics) pour chaque locus, un provenant de la mère et un provenant du père. Les allèles peuvent être soit différents (l'abeille est alors qualifiée d'hétérozygote à ce locus), soit identiques (dans ce cas elle est homozygote à ce locus).

h) Analyse des lignées paternelles

Les génotypes des reines de chaque colonie (des 32) ont été déduits à partir des fréquences alléliques des 926 ouvrières génotypés avec succès puis analysées en utilisant le logiciel « mate soft version 1.0b » (Moilanen et al. 2004). Ce programme permet l'analyse du système d'accouplement haplodiploïde basé sur l'expression des marqueurs génétiques tels que les microsatellites.

La prise en compte des allèles paternels permet de distinguer les ouvrières issues de pères différents afin d'évaluer le taux de la polyandrie.

La fréquence d'accouplement des reines et les génotypes paternels sont déduits à partir génotypes des descendants analysés.

Des erreurs qui peuvent être détectées en raison de génotypes identiques des pères ou des allèles paternelles identiques à ceux de mère hétérozygote ont été prises en compte en calculant la probabilité de non détection D_p (annexe 3-5), dont la formule est :

$$DP = (\text{fréquence allélique par locus par colonie})^2$$

Après ces corrections, l'estimation de la fréquence d'accouplement de la reine (m_e) est calculée par :

$$m_e = \frac{1}{P_i}$$

P_i : erreur de facteur de taille par groupe

P_i est déduit par mate soft selon la formule :

$$P_i = \frac{1 - D_{obs}}{1 + D_{obs}(\prod_{k=1}^L f_{d.i.g.k} - 1)(H_{exp})^{-1}}$$

D_{obs} : Proportion observée de double accouplement de la reine dans l'échantillon

$f_{d.i.g.k}$: Erreur non détectée des génotypes identiques par locus (k) par group (i)

H_{exp} : Hétérozygotie impartiale calculée de Nei

3.2. Amplification par PCR de l'ADN mitochondrial

a) ADN mitochondrial

Deux types d'ADN peuvent être individualisés dans la cellule : l'ADN nucléaire et l'ADN mitochondrial: l'**ADN mitochondrial** est l'ADN localisé dans la mitochondrie des cellules eucaryotes y compris les insectes. Il est caractérisé par une transmission exclusivement maternelle, et est transmis aux enfants par leur mère. Tous les individus de la même mère ont le même ADN mitochondrial, il est donc utilisé pour l'identification de l'origine maternelle de l'abeille et donc des différentes lignées maternelles.

b) Cytochrome oxydase

Le cytochrome oxydase est un gène mitochondrial codant pour une enzyme servant à la respiration, responsable des oxydations cellulaires chez les êtres vivants.

c) Amplification du cytochrome oxydase

C'est la région intergénique du cytochrome oxydase COI et COII de l'ADN mitochondrial que nous avons choisi comme marqueur selon Garnery et al, (1993), il a été amplifié par PCR, suivant le programme : 74°(5 min), puis (35 cycles) de 94°(30 secondes), 55°(45 secondes), 72°(30 secondes), puis une élongation finale à 72°(10 min).

Un individu pour chaque colonie (32 au total) a été séquencé pour ce marqueur mitochondrial (cf annexe 2).

Les produits PCR ont été analysés par le logiciel Mega 4 pour voir l'origine maternelle de l'abeille en comparant avec les sous espèces d'*Apis mellifera* connues, de plus un arbre phylogénétique a été reconstruit à partir des séquences obtenues.

III.RESULTATS

Structure de la colonie

- Origine des reines

Deux types d'origine de reines ont été observés sur le terrain, les premières provenant d'élevages reconduits par un apiculteur professionnel et les secondes issues d'une lignée provenant d'un essaim sauvage.

Ainsi, sur le terrain, il a été noté que certaines colonies avaient la même origine maternelle (tableau 1A) : les reines pouvaient être des sœurs (ayant les mêmes père et mère) ou demi-sœurs, c'est-à-dire de pères différents. En effet, les reines des colonies n° 5, 7, 8, 9 de Betoho et 12, 13, 14 d'Ambohimalaza proviennent d'une même origine géographique et génétique (Mantaso). De même, la colonie n°6 de Betoho et toutes les colonies d'Amby (n°16, 17, 18, 19, 20) et du site cité des profs (n°21, 22, 23, 24, 25) ont les mêmes origines géographique et génétique (Ambohitrarimo). Toutefois à Ambohimalaza, les reines des 2 autres colonies testées (n° 10 et n°11) sont d'origine d'Ambohitrolomaity.

Les reines des 5 colonies de Masakalina sont issues d'un essaim sauvage récolté en 2008 dans les forêts environnantes.

Les colonies n° 17 d'Amby présentent deux reines cohabitées et se partagent la même ruche.

Les reines de Mamotrataka Manakara proviennent d'essaim sauvage alors que celles de Valohy proviennent du CRAM Cercle de Réflexion des Apiculteurs de Manakara.

- Arrivée du varroa

Toutes les reines ont été introduites dans les ruches entre 2008 et 2009 avant l'arrivée du varroa. Les 4 sites d'Antananarivo (Amby, Ambohimalaza, Betoho, Cité de profs) ont été attaqués par le varroa entre les mois de mai et juin 2010 (observation apiculteur).

Une gradation du taux d'attaque par le varroa a été observée sur les différents sites. En effet, Ambohimalaza et Amby ont montré un niveau élevé de varroa (nombres de cadres attaqués important, chiffres non rapportés). De même pour les comptages réalisés directement dans les tubes de prélèvements d'abeilles, on a observé, en moyenne par abeilles, de 0.03 à 1.06 varroas (tableau 5). Par exemple, dans le rucher d'Amby 23 varroas ont été comptés pour 36 abeilles et pour Ambohimalaza, on a trouvé 22 varroas pour 34 abeilles (Tableau 5). Deux prélèvements ont été réalisés sur le rucher d'Amby, l'un au début de l'arrivée du varroa (septembre 2010, colonie n°20), l'autre en janvier 2011 où une forte attaque a été observée. En septembre 2010, des varroas étaient rencontrés dans la colonie mais encore faiblement et

voire même absents dans certaines ruches. En effet, après comptage pour 42 individus capturés de la colonie n°20, aucun varroa n'a été observé (Tableau 5). Après 4 mois, le 18 janvier 2011 (date du second prélèvement), presque toutes les colonies étaient parasitées et des ouvrières ont été retrouvées mortes autour des ruches et une diminution importante des effectifs des colonies a été remarqué (communication personnelle apiculteur). Ainsi, pour les colonies observées après la dispersion dans le rucher du varroa (n°16-19) il y avait en moyenne 23 varroas/36 abeilles (Tableau 5).

De plus, sur le terrain il a été observé (communication personnelle apiculteur) que les colonies n°9 et n°18 étaient agressives avant l'arrivée du varroa, alors qu'après l'arrivée du parasite, les abeilles étaient moins agressives (Tableau 5).

Analyse de la diversité génétique et polyandrie

A l'aide de ces marqueurs microsatellites, il a été analysé 926 ouvrières provenant de 32 colonies (tableau 5). En moyenne le nombre d'allèles observé pour tous les loci et l'ensemble des colonies varie de 2.4 à 2.70, avec une moyenne de 2.54 allèles tous loci confondus. Dans les sites indemnes de varroa, en moyenne le nombre d'allèles observés pour tous les loci est de 2.56, de même pour ceux infestés, il est de 2.53 (tableau 3, annexe 6).

Tableau 3 : nombre d'allèle moyen par locus par site

Sites	varroa	A24	AP81	AC306	A113	A7	AP55	m
valovahy	sans	2	2	3.2	2.8	2.2	2.2	2.4
Mamotratraka	sans	2.5	2	3	3	3	2.5	2.67
Masakalina	sans	2.2	1.6	3.2	3	2.4	2.6	2.5
Amby	forte	2	2.5	2.75	3	1.75	2.5	2.42
Amby indemne	sans	2	3	3	3	2	3	2.67
Ambohimalaza	forte	2.4	2.2	2.6	3	2.6	2.4	2.53
Betoho	inconnu	2.4	2.6	3.8	2.8	2.4	2.2	2.7
cité de prof	inconnu	2	1.8	3.4	3	2	2.8	2.5

m : nombre d'allèles moyen pour tous les 6 loci

Lors des analyses de génotypes maternels/paternels des incohérences ont été trouvées, en effet de nouveaux génotypes de lignées maternelles très différents ont été observés dans certaines colonies. En effet, 2 abeilles par colonie pour les colonies n° 7 et n° 16 (avec varroa), ont été dénombrées, ces nouveaux génotypes d'abeilles sont sûrement dus à des erreurs d'échantillonnages car selon leurs génotypes, elles correspondraient à des abeilles infidèles. Ces quelques abeilles ont été retirées des calculs des génotypes maternels et paternels.

Ainsi, on a pu observer que le taux de polyandrie varie beaucoup au sein des colonies analysées (de 7 à 17 mâles/reine selon la colonie observée, tableau 5). Une polyandrie moyenne de 11.71 a été observée pour les ruchers de Manakara indemnes de varroa et de 11.33 pour ceux des Hauts plateaux, infestés par le varroa.

($k_{\text{moyen sans varroa}} = 12.06$; $k_{\text{moyen avec varroa}} = 11.05$ et $m_{\text{moyen sans varroa}} = 11.66$; $m_{\text{moyen avec varroa}} = 9.86$).

Tableau 4 : abondance de varroa observée sur terrain

sites	nombre de ruches	varroa	K'	nombre d'abeilles/tube	nombre varroas/tube
Valovahy	5	sans	11.2	32.4	0
Mamotratraka	2	sans	13	29	0
Masakalina	5	sans	12	35.6	0
Amby	3	forte	10.5	36.6	23.75
Amby indemne	1	sans	15	42	0
Ambohimalaza	5	forte	9.4	34.4	22
Betoho	5	inconnu	12.8	38.4	28.2
 cité de prof	5	inconnu	11.5	35	4.8

k' : nombre moyen de mâle par colonie par site ;

Le plus fort taux de polyandrie avec 13 mâles en moyenne a été observé pour les colonies de Mamotratraka indemnes de varroa et le plus faible taux a été observé pour Ambohimalaza (en moyenne 9.4), infesté par le varroa. Pour les autres, qu'elles soient infestées ou indemnes du varroa, il n'y a pas de différences très importantes.

Tableau 5 : taux de polyandrie

Colonies	Nombre d'abeille/tube	Nombre de Varroa/tube	Nombre de varroa /abeille	n	k	pi	me	Sites
1	36	0	0	26	9	0.1082	9.25	Valovahy
2	34	0	0	25	8	0.1941	5.15	Valovahy
3	29	0	0	24	10	0.1031	9.70	Valovahy
4	31	0	0	26	17	0.0461	21.68	Valovahy
5	32	0	0	29	12	0.1392	7.18	Valovahy
6	35	14	0.4	28	8	0.1847	5.41	Betoho
7	46	37	0.8	26	15	0.0546	18.31	Betoho
8	34	15	0.44	29	15	0.0802	12.47	Betoho
9	38	38	1	32	12	0.0806	12.40	Betoho
10	39	37	0.95	30	14	0.0631	15.85	Betoho
11	32	8	0.25	30	8	0.2230	4.48	Ambohimalaza
12	37	9	0.24	29	14	0.0617	16.20	Ambohimalaza
13	33	26	0.79	30	11	0.1154	8.67	Ambohimalaza
14	34	29	0.85	30	7	0.3221	3.10	Ambohimalaza
15	36	38	1.06	30	7	0.3735	2.68	Ambohimalaza
16	35	21	0.6	30	9	0.1126	8.88	Amby
17	35	32	0.91	30	12	0.1079	9.27	Amby
18	36	12	0.33	30	11	0.1087	9.20	Amby
19	35	30	0.86			0.0000		Amby
20	42	0	0	30	15	0.0728	13.73	Amby
21	36	5	0.14	30	10	0.1218	8.21	cité de prof
22	35	6	0.17	31	10	0.1265	7.91	cité de prof
23	35	1	0.03	29	14	0.0561	17.82	cité de prof
24	35	6	0.17	30	12	0.1483	6.74	cité de prof
25	34	6	0.18	30	11	0.1019	9.81	cité de prof
26	34	0	0	29	11	0.1158	8.64	Masakalina
27	36	0	0	29	10	0.0947	10.56	Masakalina
28	35	0	0	30	14	0.0626	15.96	Masakalina
29	37	0	0	30	13	0.0833	12.00	Masakalina
30	36	0	0	21	9	0.1156	8.65	Masakalina
31	28	0	0	29	14	0.0595	16.82	Mamotratraka
32	30	0	0	22	12	0.0812	12.32	Mamotratraka

n : nombre des ouvrières succès g notyp es ;

k : nombre de lignées paternelles ;

me : fréquence d'accouplement de la reine.

Les résultats de l'AFC montrent que les 32 colonies analysées ne semblent pas être structurées génétiquement (Fig. 9).

La contribution paternelle aux différentes lignées (« paternity skew ») n'est significativement pas différente (test de student, $P >> 0.05$) entre celles infestées par le varroa et celles indemnes.

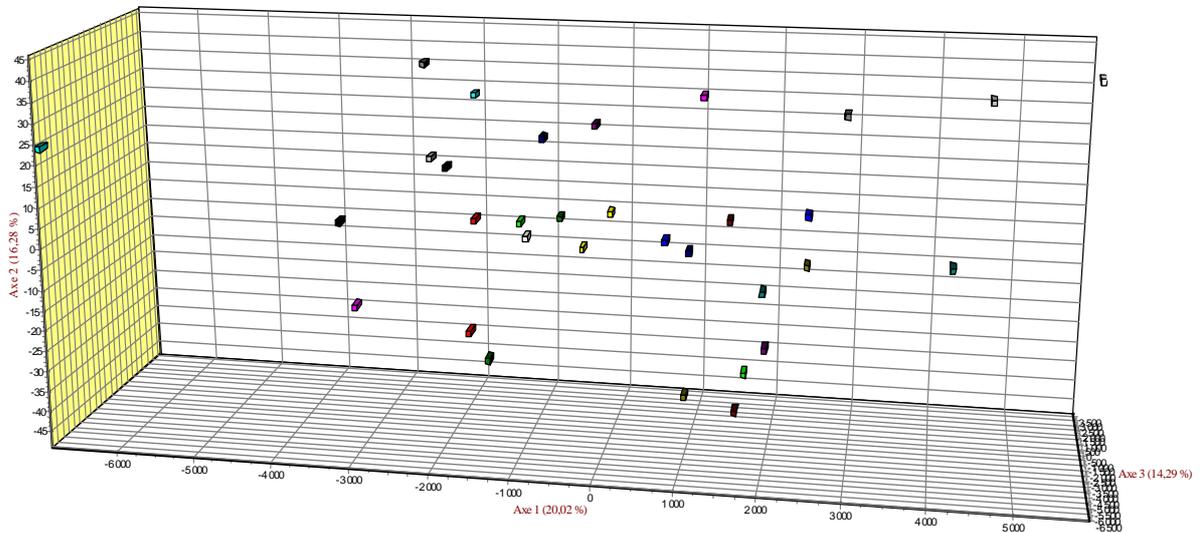


Figure 10 : Analyse factorielle des correspondances (AFC), en 3 dimensions sur les 32 colonies analysées (logiciel Genetix, (Belkhir *et al.*, 1996-2004)). Les axes montrent 50.5% de la variabilité inter colonies observée

Analyse phylogénétique

Pour les 32 individus (1 ouvrière/colonie analysé) séquencés pour la région intergénique COI-II de la mitochondrie, nous n'avons obtenu que 2 haplotypes, l'un majoritaire et l'autre minoritaire (retrouvé 1 seule fois pour la colonie H3E2 : colonie 21, Fig 10). Les individus séquencés forment un groupe à part, le groupe le plus proche est celui de *Apis mellifera littorea* (abeille présente en Afrique subsaharienne).



Figure 11 :

arbre phylogénétique (Neighbour Joining) reconstruit à partir des données des séquences de 472 pb de la région intergénique du cytochrome oxydase COI et COII de l'ADN mitochondrial, les chiffres représentent les valeurs de bootstraps (sur 1000 répétitions).

IV.DISCUSSION

Effet du varroa sur les colonies

Grâce à l'analyse par marqueurs microsatellite des ouvrières de 32 colonies de la race *Apis mellifera unicolor*, il a été noté que chaque reine d'une colonie s'accouplait avec plusieurs mâles (de 7 à 17), ce comportement d'accouplement multiple d'une reine, ou polyandrie, a été décrit chez plusieurs taxons d'insectes sociaux dont les abeilles (Page, 1986). Ce nombre d'accouplement observé est concordant avec ce qui a pu être observé chez d'autres races d'abeilles comme pour *Apis mellifera monticola* (abeille africaine à l'Est de l'Afrique) ou *Apis scutellata* (abeille africaine mais existe en Amérique du Sud et en Amérique du Nord) (Franck *et al.*, 2000, Palmer and Oldroyd, 2000) qui s'accoupleraient avec de 5 à 19 et 10 à 25 mâles, respectivement.

Le varroa est connu pour entraîner certains effets sur l'accouplement du fait que les faux bourdons parasités qui fécondent la reine au cours d'un vol nuptial pourraient avoir de moindre capacité à voler, et que le parasitisme direct par *Varroa destructor* a des effets négatifs sur le succès reproductif des faux bourdons (Buchler, 2003) ou par des anomalies dans le comportement de vol (Kralj and Fuchs, 2003). De plus une des conséquences de ces vols nuptiaux et de la multiple fécondation de la reine est que le varroa peut ainsi se propager via certains mâles infectés. Toutefois les résultats obtenus dans cette étude montre que le nombre de mâle qui s'accouple avec la reine varie de 7 à 17, et aucune différence significative n'a été observée entre les ruchers contaminés et ceux indemnes de cette même race. Néanmoins, il a été observé sur le site de Mamotrataka, indemne de varroa, un nombre de mâle élevé par rapport aux autres sites (13 mâles en moyenne) mais ces observations n'ont pu être faites que sur 2 colonies ; ainsi du fait du faible échantillonnage, il ne peut être conclu que l'absence de varroa sur ce site a une influence sur la polyandrie.

Ainsi, la présence de varroa sur les sites étudiés ne montre aucun effet marqué sur la polyandrie des colonies infestées en comparant avec de celles indemnes ; ce phénomène pourrait être expliqué par une arrivée encore récente du varroa dans les sites. De plus une autre hypothèse pourrait être que le varroa n'aurait pas affecté les mâles du fait de la non permanence des mâles dans les ruches ou encore par la préférence de varroa pour certaines castes d'ouvrières. Ainsi, certains auteurs indiquaient que chez les abeilles adultes, le *Varroa* parasiterait davantage les ouvrières nourricières (Le Conte and Arnold, 1987), en effet la préférence de cet acarien pour les abeilles nourricières aurait pour effet direct d'optimiser la probabilité des *Varroas* femelles de rencontrer une cellule hôte pour s'y reproduire (Le Conte and Arnold, 1987).

Malgré le fait qu'aucun effet notable sur la polyandrie ou un biais sur certaines lignées parentales dans les ruchers infectés n'aient été notés, des mortalités d'ouvrières et l'effondrement de ruchers sur les sites prélevés, infestés par le varroa, ont été observés. Ces dommages pourraient être liés d'une part à l'action spoliatrice du varroa. En effet, le varroa est un ectoparasite hématophage de l'abeille (Vidal-Naquet, 2008) se nourrissant de l'hémolymphe de l'abeille ce qui l'affaiblit, et diminue son activité, provoquant sa mort précoce, et ainsi réduisant la longévité de la colonie (Le Conte, 1990). D'autre part, une action directe sur les adultes, comme les ouvrières ou encore le couvain a aussi été notée (Colin *et al.*, 1997).

Outre la spoliation, le varroa se présente comme un vecteur de différents virus (Vidal-Naquet, 2009). En effet, lors de la spoliation, *Varroa* est connu pour être un vecteur de virus, en particulier le virus des ailes déformées, responsable de la déformation au niveau des ailes (Bowen-Walker *et al.*, 1999). A Madagascar, bien qu'aucune analyse virale n'ait été encore entreprise, le varroa est soupçonné être le vecteur de ce virus (sur symptômes visuels) qui s'attaque et tue les colonies d'abeilles entières y compris les reines (AFSSA) 2010). En effet, la chute rapide de l'effectif des colonies et certains effondrements très rapides observés pourraient être dus directement à l'infestation par l'acarien, ou plutôt aux infections virales transmises au varroa.

Auparavant, nous avons précisé que le varroa pouvait être transmis de ruches en ruches par le biais des mâles lors des vols nuptiaux, mais un autre moyen de propagation de ce parasite peut être lié à la présence d'abeilles infidèles. En effet par phénomène de trophallaxie de multiples contacts existent entre les ouvrières d'une ruche, ainsi par ce biais le passage de cet ectoparasite d'une abeille à l'autre au cours des contacts des abeilles à l'intérieur de la ruche, se fait des individus infidèles provenant d'une colonie fortement attaqués à une colonie saine.

Lors des prélèvements réalisés pour cette étude, le site de Masakalina est encore indemne, or la provenance de la reine de ces ruchers est de ce même site Masakalina, contrairement à presque tous les ruchers d'Antanarivo, de notre étude. Cette conduite de ruchers et transport de reines, potentiellement infectés sont des comportements à risque, propagateurs de maladies et facteurs qui propagent le varroa.

Nous avons pu noter la perte d'agressivité, ainsi que la cohabitation des 2 reines (2 cas observés sur le terrain) dans une même ruche sans aucune rivalité observée. Cette perte

d'agressivité d'une colonie peut être expliquée aussi par l'attaque de varroa indiquant la faiblesse de la reine et des colonies.

Polyandrie et la diversité génétique

L'accouplement multiple vise notamment à augmenter la variabilité génétique intra-coloniale et inter-coloniale. L'avantage des colonies renfermant plusieurs lignées paternelles pourrait provenir d'une plus grande variabilité des ouvrières conduisant à une répartition des tâches plus efficace (Robinson and Page, 1988, Sherman et al., 1988) ; comme par exemple la défense de la ruche contre l'intrus fait l'objet d'une division du travail. Cela pourrait être observé pour les colonies n°9 et n°18 qui avaient un comportement de défense agressif avant l'arrivée du varroa.

Selon l'analyse génétique de cette étude, tant sur marqueurs nucléaires (6 marqueurs microsatellites) sur 926 individus de 32 colonies que mitochondriale (région intergénique COI-COII) sur 1 individu de chaque colonie il a pu être montré que les colonies étudiées avaient une faible diversité allélique (le nombre moyen d'allèles par locus: 2.19 pour A24, 2.21 pour AP81, 3.1 pour AC306, 2.95 pour A113, 2.29 pour A7, 2.52 pour AP55) et diversité haplotypique. Ainsi, une unique mutation par délétion pour une seule colonie a été détectée (colonie 21). Ces résultats, peuvent être expliqués par une forte consanguinité non seulement au sein des colonies mais aussi entre les colonies échantillonnées. L'accouplement d'une reine avec des mâles (capturés pendant l'essaimage) engendre des reines filles et des mâles, le croisement d'une reine fille avec leurs frères entraîne une hausse de la consanguinité dans la colonie puisque la probabilité de s'apparier à un individu apparenté augmente. Etant donné que certaines colonies sont issues d'une même origine maternelle, obtenues par élevage artificiel de reines fécondées sur un même site, la consanguinité est très probable parce que les générations obtenues (reines filles) sont toutes des sœurs, ou demi-sœurs. Il existe donc une parenté étroite entre les reines filles distribuées dans chaque ruche et peuvent partager ainsi deux allèles identiques pour un locus ce qui expliquerait la faible diversité allélique inter-coloniale obtenue. Ainsi une conduite de ruchers plus rigoureuse permettant de maintenir et augmenter la diversité génétique devrait être promue afin de maximiser les chances d'obtenir un maximum de lignées génétiques différentes et promouvoir la pérennisation de cette diversité.

L'une des conséquences directe de la faible diversité allélique dans une colonie est la possibilité d'accouplements consanguins de la reine avec ses descendants qui auraient les mêmes allèles et ainsi l'accouplement pourrait engendrer la fixation de certains allèles par

dérive génétique et induire une perte de diversité allélique (Keller and Waller, 2002). Cette perte de diversité allélique chez la reine conduit aussi à l'augmentation de la proportion d'homozygotes mâles dans la population (c'est-à-dire la production de mâles diploïdes généralement stériles) ce qui peut conduire à diminuer la fitness de la reine et indirectement celle de la colonie (Frankham, 2005).

Diversité génétique et la résistance au varroa

La polyandrie augmente la variabilité génétique au sein des colonies, ce qui réduit la prévalence des parasites ou pathogènes (Hamilton, 1987). Les mortalités importantes et l'abondance de varroa (23 varroas pour 36 abeilles à AMBY, 28 pour 38 à Betoho) observées dans les colonies étudiées montrent que cette race serait sensible à cet ectoparasite et à aux virus associés. En effet, dans la littérature certaines races d'abeilles sont plus tolérantes au varroa et peu d'effet est noté sur la fitness de la colonie (Jacobsen, 2009). Ainsi, le varroa et *Apis mellifera unicolor* ne présentent pas un équilibre hôte parasite comme l'abeille *Apis cerana* qui est capable de cohabiter avec le varroa (Jacobsen, 2009, Vidal-Naquet, 2008).

Il a été montré qu'une faible diversité génétique réduit la répartition des tâches chez les abeilles en particulier le comportement hygiénique et l'épouillage des ouvrières (Baer and Schmid Hempel, 2001, Hamilton, 1987, Schmid-Hempel, 1995, Schmid-Hempel, 1998, Sherman et al., 1988, Shykoff and Schmid-Hempel, 1991, Shykoff and Schmid-Hempel, 1991), ainsi la faible diversité observée dans nos colonies pourrait avoir un effet sur l'activité de nettoyage entraînant une sensibilité accrue aux maladies.

V.CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Le taux de polyandrie des colonies échantillonnées obtenu par l'analyse microsatellite de 32 colonies d'abeilles (926 individus au total) varie d'un site à un autre, d'une colonie à une autre, il se situe entre 7 à 17 mâles. Ce résultat est similaire à celui rapporté par certains auteurs sur le nombre de mâles accouplés avec la reine durant le vol nuptial chez l'espèce *Apis mellifera* (Franck et al., 2000, Palmer and Oldroyd, 2000).

Malgré le fait que le varroa soit l'un des responsables de l'affaiblissement et du dépérissement de l'abeille, son infestation dans cette étude ne montre pas un effet marqué sur la polyandrie. Or, la polyandrie est connue pour être l'une des bases de survie des insectes sociaux polyandres par son effet direct sur le maintien de la diversité génétique dans la colonie.

Une faible diversité génétique (nucléaire et mitochondriale) a été constatée dans les colonies échantillonnées, ce phénomène pourrait montrer l'absence des lignées prépondérantes à comportement hygiénique dans la colonie d'où la sensibilité et le déclin rapide de la population vis-à-vis de l'infestation parasitaire comme le varroa, les virus qui y sont associés, ou d'autres maladies telles la maladie « noire », la nosémose.

Vue l'importance de l'abeille, du point de vue économique et écologique, la propagation de manière progressive et l'incidence de l'attaque de varroa sur les abeilles, l'absence de lutte durable mise en place à Madagascar (du fait de la récente arrivée du varroa sur l'île), il serait important de proposer des moyens efficaces pour faire face à cette menace.

Notant que l'utilisation des pesticides dans les ruches représente un risque de contamination pour le miel et les autres produits des ruches et le développement rapide d'une résistance de varroa est probable (Currie and Gatién, 2006), un programme de sélection génétique de la résistance de l'abeille au varroa pourrait être envisagé. Ce type de lutte a été prouvé par la capacité de l'abeille européenne à résister au varroa (Büchler *et al.*, 2010). La diversité génétique dans une colonie est un moyen de défense naturelle de l'abeille surtout sur le maintien d'une diversification des tâches à l'intérieur de la ruche en particulier le comportement hygiénique. En effet comme cité précédemment, les abeilles hygiéniques sont capables de limiter l'infestation par le parasite ou l'agent pathogène par l'enlèvement de couvain ou des nymphes infestés. Afin de réaliser de tels objectifs, il serait important dans un premier temps d'étudier la diversité génétique dans toutes les régions de Madagascar tout en notant leur résistance face au varroa. Puis enfin utiliser ces informations afin de sélectionner les lignées résistances pour de futurs croisements dans le but d'avoir des lignées de reines résistantes.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ADAMS, J., ROTHMAN, E. D., KERR, W. E. and PAULINO, Z. L. (1977). Estimation of the number of sex alleles and queen matings from diploid male frequencies in a population of *Apis mellifera*. *Genetics* **86**, 583.

ALLEN-WARDELL, G., MEFFE, G. K. and AND 16 OTHERS (1998). The potential consequences of pollinator declines on the conservation of biodiversity and stability of food crop yields. *Conservation Biology* **12**, 8-17.

ARECHA VALETA-VELASCO, M. E. and GUZMÁN-NOVOA, E. (2001). Relative effect of four characteristics that restrain the population growth of the mite *Varroa destructor* in honey bee (*Apis mellifera*) colonies. *Apidologie* **32**, 157-174.

ARNQVIST, G. and NILSSON, T. (2000). The evolution of polyandry: multiple mating and female fitness in insects. *Animal Behaviour* **60**, 145-164.

BAER, B. and SCHMID-HEMPEL, P. (1999). Experimental variation in polyandry affects parasite loads and fitness in a bumble-bee. *Nature* **397**, 151-154.

BAER, B. and SCHMID HEMPEL, P. (2001). Unexpected consequences of polyandry for parasitism and fitness in the bumblebee, *Bombus terrestris*. *Evolution* **55**, 1639-1643.

BELKHIR, K., BORSA, P., CHIKHI, L., RAUFASTE, N. and BONHOMME, F. (1996-2004). GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5171, Université de Montpellier II, Montpellier (France).

BOOMSMA, J. J. and RATNIEKS, F. L. W. (1996). Paternity in eusocial Hymenoptera. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* **351**, 947.

BOWEN-WALKER, P., MARTIN, S. and GUNN, A. (1999). The Transmission of Deformed Wing Virus between Honeybees (*Apis mellifera* L.) by the Ectoparasitic Mite *Varroa jacobsoni*. *Journal of invertebrate Pathology* **73**, 101-106.

BUCHLER, R. (2003). The effect of *Varroa destructor* parasitism on the mating success of honeybee drones. *Proceeding Apimondia. XXXVIIIth. Slovenia, p. 624*.

- BÜCHLER, R., BERG, S. and LE CONTE, Y. (2010). Breeding for resistance to Varroa destructor in Europe. *Apidologie* **41**, 393-408.
- CALDERONE, N. W. and PAGE, R. E. (1988). Genotypic variability in age polyethism and task specialization in the honey bee, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Behaviour Ecology and Sociobiology* **22**, 17-25.
- CALDERONE, N. W., ROBINSON, G. E. and PAGE, R. E. (1989). Genetic structure and division of labor in honeybee societies. *Cellular and Molecular Life Sciences* **45**, 765-767.
- COLE, B. J. (1983). Multiple mating and the evolution of social behavior in the Hymenoptera. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **12**, 191-201.
- COLIN, M. E., FERNANDEZ, G. P. and BEN HAMIDA, T. (1997). Varroasis. *Options Méditerranéennes, Série B* **25**, 121- 142.
- CORREA-MARQUES, M. H. and DE JONG, D. (1998). Uncapping of worker bee brood, a component of the hygienic behaviour of Africanized honey bees against the mite *Varroa jacobsoni* Oudemans. *Apidologie* **29**, 283-289.
- CORREA-MARQUES, M. H., ISSA, M. R. C. and JONG, D. (2000). Classification and quantification of damaged *Varroa jacobsoni* found in the debris of honey bee colonies as criteria for selection? *American Bee Journal* **140**, 820-824.
- CRANE, E. (1990). *Bees and beekeeping: science, practice and world resources*. Heinemann Newnes.
- CROZIER, R. H. and PAGE, R. E. (1985). On being the right size: male contributions and multiple mating in social Hymenoptera. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **18**, 105-115.
- CURRIE, R. and GATIEN, P. (2006). Timing acaricide treatments to prevent Varroa destructor (Acari: Varroidae) from causing economic damage to honey bee colonies. *Canadian Entomologist* **138**, 238–252.
- ESTOUP, A. and SOLIGNAC, M. (1995). Apport des marqueurs microsatellites pour l'étude de la variabilité génétique chez deux insectes sociaux, l'abeille domestique (*Apis mellifera* L.) et le bourdon (*Bombus terrestris* Latreille): de la colonie à l'espèce= Microsatellite markers for the study of the genetic variability in two social insects, the honey bee (*Apis mellifera* L.) and the bumble bee (*Bombus terrestris* Latreille): from the colony to the species. *Thèse de doctorat*, 270 p.

ESTOUP, A., SOLIGNAC, M. and CORNUET, J. M. (1994). Precise assessment of the number of patriline and of genetic relatedness in honeybee colonies. *Proceedings: Biological Sciences* **258**, 1-7.

FRANCK, P., KOENIGER, N., LAHNER, G., CREWE, R. M. and SOLIGNAC, M. (2000). Evolution of extreme polyandry: an estimate of mating frequency in two African honeybee subspecies, *Apis mellifera monticola* and *A.m. scutellata*. *Insectes Sociaux* **47**, 364-370.

FRANKHAM, R. (2005). Genetics and extinction. *Biological Conservation* **126**, 131-140.

FRUMHOFF, P. C. and BAKER, J. (1988). A genetic component to division of labour within honey bee colonies. *Nature* **333**, 358-361.

FUCHS, S. and MORITZ, R. F. A. (1999). Evolution of extreme polyandry in the honeybee *Apis mellifera* L. *Behaviour Ecology and Sociobiology* **45**, 269-275.

FUCHS, S. and SCHADE, V. (1994). Lower performance in honeybee colonies of uniform paternity= Verringerte Leistungsfähigkeit von Bienenvölkern mit einfachgepaarten Königinnen. *Apidologie* **25**, 155-168.

GARNERY, L., SOLIGNAC, M., CELEBRANO, G. and CORNUET, J. M. (1993). A simple test using restricted PCR-amplified mitochondrial DNA to study the genetic structure of *Apis mellifera*, 1016–1021.

HABERL, M. and MORITZ, R. F. A. (1994). Estimation of intracolony worker relationship in a honey bee colony (*Apis mellifera* L.) using DNA fingerprinting. *Insectes Sociaux* **41**, 263-272.

HAMILTON, W. D. (1987). Kinship, recognition, disease, and intelligence: constraints of social evolution. *Animal societies: theories and facts*, 81-102.

HARBO, J. R. and HARRIS, J. W. (2005). Suppressed mite reproduction explained by the behaviour of adult bees. *Journal of Apiculture Research* **44**, 21-23.

IBRAHIM, A. and SPIVAK, M. (2004). The relationship between suppression of mite reproduction (SMR) and hygienic behavior. *American Bee Journal* **144**, 406.

IBRAHIM, A. and SPIVAK, M. (2005). The relationship between hygienic behavior and suppression of mite reproduction as honey bee (*Apis mellifera*) mechanisms of resistance to *Varroa destructor*. *Apidologie* **37**, 31-40.

- JACOBSEN, R. (2009). Fruitless fall: The collapse of the honey bee and the coming agricultural crisis. *Bloomsbury USA*, 288 p.
- JENNIONS, M. D. and PETRIE, M. (2000). Why do females mate multiply? A review of the genetic benefits. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* **75**, 21-64.
- KELLER, L. F. and WALLER, D. M. (2002). Inbreeding effects in wild populations. *Trends in Ecology & Evolution* **17**, 230-241.
- KRALJ, J. and FUCHS, S. (2003). Influence of Varroa destructor on flight behaviour of infested bees. . *Proceeding Apimondia XXXVIIIth, Slovenia, p. 480*.
- LE CONTE, Y. (1990). Contribution à l'étude des relations abeille-Varroa: approches Comportementales, chimiques et génétiques. *Thèse de doctorat, Paris Sud, France, , 199 p*.
- LE CONTE, Y. and ARNOLD, G. (1987). Influence de l'âge des abeilles (*Apis mellifica* L) et de la chaleur sur le comportement de *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie* **18**, 305-320.
- LENSKY, Y. and DEMTER, M. (1985). Mating flights of the queen honeybee (*Apis mellifera*) in a subtropical climate. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* **81**, 229-241.
- MICHENER, C. D. (2000). The bees of the world. *Johns Hopkins Univ Pr.*, 913.
- NEUMANN, P., MORITZ, R. F. A. and VAN PRAAGH, J. (1999). Queen mating frequency in different types of honey bee mating apiaries. *Journal of apicultural research* **38**, 11-18.
- OLDROYD, B. P., RINDERER, T. E., HARBO, J. R. and BUCO, S. M. (1992). Effects of intracolony genetic diversity on honey bee (Hymenoptera: Apidae) colony performance. *Annals of the Entomological Society of America* **85**, 335-343.
- OLDROYD, B. P., RINDERER, T. E., SCHWENKE, J. R. and BUCO, S. M. (1994). Subfamily recognition and task specialisation in honey bees (*Apis mellifera* L.)(Hymenoptera: Apidae). *Behavioral Ecology and Sociobiology* **34**, 169-173.
- OSTER, G. F. and WILSON, E. O. (1979). Caste and ecology in the social insects. *Princeton Univ Pr*, 355 p.
- PAGE JR, R. E. (1986). Sperm utilization in social insects. *Annual Review of Entomology* **31**, 297-320.

- PAGE, R. E. (1980). The evolution of multiple mating behavior by honey bee queens (*Apis mellifera* L.). *Genetics* **96**, 263.
- PALMER, K. A. and OLDROYD, B. P. (2000). Evolution of multiple mating in the genus *Apis*. *Apidologie* **31**, 235-248.
- PAMILO, P., SUNDSTRÖM, L., FORTELIUS, W. and ROSENGREN, R. (1994). Diploid males and colony-level selection in *Formica* ants. *Ethology ecology & evolution* **6**, 221-235.
- PEER, D. F. (1956). Multiple Mating of Queen Honey Bees. *Journal of economic entomology* **49**, 741-743.
- RALALAHARISOA-RAMAMONJISOA, Z. (1992). Etude du comportement de butinage de l'abeille *Apis mellifera* var. *unicolor* d'après les analyses polliniques dans la région des hauts plateaux (Madagascar). *Département de palinologie*. Madagascar.: Université d'Antananarivo, pp. 152 p.
- RATNIEKS, F. L. W. (1990). The evolution of polyandry by queens in social Hymenoptera: the significance of the timing of removal of diploid males. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **26**, 343-348.
- ROBINSON, G. E. and PAGE, R. E. (1988). Genetic determination of guarding and undertaking in honey-bee colonies. *Nature* **333**, 356-358.
- RUTTNER, F. (1975). Races of bees. *The Hive and the Honey Bee*, 19-38.
- RUTTNER, F. (1988). Biogeography and taxonomy of honeybees. *Ed. Springer-Verlag*, 284.
- RUTTNER, F. and KOENIGER, G. (1971). Die Füllung der Spermatheka der Bienenkönigin. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology* **72**, 411-422.
- SCHMID-HEMPEL, P. (1995). Parasites and social insects. *Apidologie* **26**, 245-245.
- SCHMID-HEMPEL, P. (1998). Parasites in social insects. *Princeton Univ Pr*, 413 p.
- SHERMAN, P. W., SEELEY, T. D. and REEVE, H. K. (1988). Parasites, pathogens, and polyandry in social Hymenoptera. *The American Naturalist* **131**, 602-610.

SHYKOFF, J. A. and SCHMID-HEMPEL, P. (1991). Genetic relatedness and eusociality: parasite-mediated selection on the genetic composition of groups. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **28**, 371-376.

SHYKOFF, J. A. and SCHMID-HEMPEL, P. (1991). Parasites and the advantage of genetic variability within social insect colonies. *Proceedings: Biological Sciences* **243**, 55-58.

SOLIGNAC, M., VAUTRIN, D., LOISEAU, A., MOUGEL, F., BAUDRY, E., ESTOUP, A., GARNERY, L., HABERL, M. and CORNUET, J. M. (2003). Five hundred and fifty microsatellite markers for the study of the honeybee (*Apis mellifera* L.) genome. *Molecular Ecology Notes* **3**, 307-311.

SPIVAK, M. and GILLIAM, M. (1998). Hygienic behaviour of honey bees and its application for control of brood diseases and varroa. Part I. . *Bee World* **79**, 124-134.

STERN, R. A. and GAZIT, S. (1996). Lychee pollination by the honeybee. *American Society for Horticultural Science*.

TABER, III (1954). The frequency of multiple mating of queen honey bees. *Journal of economic entomology* **47**, 995-998.

TABER, S. (1958). Concerning the Number of Times Queen Bees Mate¹. *Journal of economic entomology* **51**, 786-789.

TRIBE, G. D. (1987). *Apis mellifera unicolor* : the honey-bee of Madagascar. *South African Bee Journal* **59**, 50-52.

TRIVERS, R. L. and HARE, H. (1976). Haploidploidy and the evolution of the social insect. *Science* **191**, 249.

VIDAL-NAQUET, N. (2008). Varroa destructor : le cycle. *Apivet*.

VIDAL-NAQUET, N. (2009). Les effets pathogènes de varroa destructor sur l'abeille et sur la colonie d'abeille. <http://www.apivet.en/>.

WALKER, W. F. (1980). Sperm utilization strategies in nonsocial insects. *The American Naturalist* **115**, 780-799.

WOYKE, J. (1955). Multiple mating of the honeybee queen (*Apis mellifica* L.) in one nuptial flight. *Bulletin of the Academy of Poland Sci. Cl. II* **3**, 175–180.

WOYKE, J. (1962). Natural and artificial insemination of queen honey bees. *Bee World* **43**, 21-25.

WOYKE, J. (1963). What happens to diploid drone larvae in a honeybee colony. *Journal of Apiculture Research* **2**, 75.

ANNEXES

Tampon d'extraction N°1

1.1) Produits utilisés

Réactifs, (solutions mères)	Formule	Produit commercial	Formulation	Fournisseur
Tris HCl 1M	C ₄ H ₁₁ NO ₃	Trizma base	Poudre	SIGMA - ALDRICH
EDTA 0,5M	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈	EDTA	Poudre	SIGMA - ALDRICH
Sodium Chloride	Na Cl	Sodium Chloride	Poudre	SIGMA - ALDRICH
Sucrose (solution 1M) = Saccharose	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	Sucrose	Poudre	SIGMA - ALDRICH
Protéinase K		Protéinase K from Tritirachium album	Poudre	SIGMA - ALDRICH
0,5% SDS = Sodium Dodecyl Sulfate	C ₁₂ H ₂₅ O ₄ SNa	Sodium Dodecyl Sulfate	Poudre	SIGMA - ALDRICH

1.2) Produits utilisés et quantités

Réactifs (solutions mères)	Concentration finale	Dose pour 1 L
Tris HCl 1M, ph 8,0	100 mM	15,76g
EDTA 0,5M, ph 8,0	80 mM	23,38g
Na Cl	100 mM	5,81 g
Sucrose (solution 1M)	200 mM	68,46g
ddH ₂ O (eau distillée)		
Protéinase K	100 µg/ml	0,1 g/litre
0,5% SDS	2%	20 g

↑
Autoclavé
↓

Tampon d'extraction N°2

2.1) Produits utilisés

Réactifs (solutions mères)	Formule	Produit commercial	Formulation	Fournisseur
Acétate de potassium	C ₁₂ H ₃ O ₂ K	Potassium Acétate	Poudre	SIGMA ALDRICH

2.2) Produits utilisés et quantités

Réactifs. (solutions mères)	Volume	Concentration finale
Acétate de potassium	78.5 g	8M
ddH ₂ O (eau distillée)	100 ml	

Tampon d'élution:

Solution à base du sel

L'AND est stable de nombreuses semaines si conserve à 4°C dans le tampon d'élution. Pour une durée plus longue, il est recommandé de le conserver à - 20°C

Les réactifs PCR pour l'amplification des microsatellites

	Volume X1 (µl)
H ₂ O	2.1
Type -IT	5
Pool d'amorces	2.4
total	9.5

Les réactifs PCR pour l'amplification de l'ADN mitochondrial

Réactifs PCR	Volume (µl)
H ₂ O	16.5
Tampon 10x	2.5
Mg cl ₂	2
DNTP	0.5
Amorces Apis COII-F	0.5
Amorces Apis COII-R	0.5
Taq polymérase	0.5
ADN dilué au 20 ème	0.5

Réactifs PCR	Volume (µl)
Tampon 10x	13.5
Mgcl ₂	2.5
DNTP	1
Amorce E2	1.5
Amorce F2	2
Taq polymerase	2
ADN dilué au 20 ème	0.5
	2

Tableau des fréquences alléliques par locus (f) avec les probabilités non détectées correspondants (DP)

N°	L-A24	f	DP	L-AP81	f	DP	L-AC306	f	DP	f	A113	f	DP	A7	f	DP	Ap55	f	DP
1	93	0	0	125	0.923	0.85207	164	0	0	210	0.48077	0.23114	126	0	0	175	0.0217	0.00047	
	97	0.04167	0.0017	131	0	0	170	0.46154	0.213017	212	0.44231	0.19564	130	0	0	181	0.9783	0.95699	
	103	0.95833	0.9184	133	0.077	0.00592	172	0	0	214	0.07692	0.00592	132	0.025	0.000625	183	0	0	
							174	0.53846	0.289941					138	0.975	0.950625			
						178	0	0											
						180	0	0											
total			1 0.9201	389		1 0.85799		1 0.502959	636		1 0.43269	526	1 0.95125	539		1 0.95747			
2	93	0	0	125	0.824	0.6782	164	0	0	210	0.04348	0.00189	126	0	0	175	0.0625	0.00391	
	97	0.28	0.0784	131	0.176	0.03114	170	0.06	0.0036	212	0.54348	0.29537	130	0	0	181	0.9375	0.87891	
	103	0.72	0.5184	133	0	0	172	0	0	214	0.41304	0.1706	132	0.28947	0.083795	183	0	0	
							174	0.94	0.8836					138	0.71053	0.504847			
						178	0	0											
						180	0	0											
total			1 0.5968	389		1 0.70934		1 0.8872	636		1 0.46786	526	1 0.588642	539		1 0.88281			
3	93	0	0	125	0.889	0.79012	164	0	0	210	0.75	0.5625	126	0	0	175	0.0417	0.00174	
	97	0.22917	0.0525	131	0	0	170	0.26087	0.068053	212	0.10417	0.01085	130	0	0	181	0.9583	0.9184	
	103	0.77083	0.5942	133	0.111	0.01235	172	0.02174	0.000473	214	0.14583	0.02127	132	0.26191	0.068594	183	0	0	
							174	0.69565	0.483932					138	0.7381	0.544784			
						178	0.02174	0.000473											
						180	0	0											
total			1 0.6467	389		1 0.80247		1 0.55293	636		1 0.59462	526	1 0.613378	539		1 0.92014			
4	93	0	0	125	0.958	0.9184	164	0.01923	0.00037	210	0.77083	0.59418	126	0	0	175	0.3077	0.09467	
	97	0.17308	0.03	131	0	0	170	0.13462	0.018121	212	0.22917	0.05252	130	0	0	181	0.6538	0.42751	
	103	0.82692	0.6838	133	0.042	0.00174	172	0.07692	0.005917	214	0	0	132	0.24	0.0576	183	0.0385	0.00148	
							174	0.76923	0.591716					138	0.76	0.5776			
						178	0	0											
						180	0	0											
total			1 0.7138	389		1 0.92014		1 0.616125	636		1 0.6467	526	1 0.6352	539		1 0.52367			
5	93	0	0	125	0.579	0.33518	164	0	0	210	0.7931	0.62901	126	0	0	175	0.2759	0.0761	
	97	0.10345	0.0107	131	0	0	170	0.39655	0.157253	212	0.15517	0.02408	130	0.05172	0.002675	181	0.7241	0.52438	
	103	0.89655	0.8038	133	0.421	0.17729	172	0.03448	0.001189	214	0.05172	0.00268	132	0.12069	0.014566	183	0	0	
							174	0.55172	0.304399					138	0.82759	0.684899			
						178	0.01724	0.000297											
						180	0	0											
total			1 0.8145	389		1 0.51247		1 0.463139	636		1 0.65577	526	1 0.70214	539		1 0.60048			
6	93	0	0	125	0.75	0.5625	164	0	0	210	0.57143	0.32653	126	0	0	175	0.3214	0.10332	
	97	0.01786	0.0003	131	0	0	170	0.05357	0.00287	212	0.42857	0.18367	130	0.01786	0.000319	181	0.5893	0.34726	
	103	0.98214	0.9646	133	0.25	0.0625	172	0	0	214	0	0	132	0.03571	0.001276	183	0.0893	0.00797	
							174	0.67857	0.460459					138	0.94643	0.895728			
						178	0.26786	0.071747											
						180	0	0											
total			1 0.9649	389		1 0.625		1 0.535076	636		1 0.5102	526	1 0.897322	539		1 0.45855			
7	93	0.01923	0.0004	125	0.972	0.94522	164	0	0	210	0.35185	0.1238	126	0	0	175	0.037	0.00137	
	97	0.17308	0.03	131	0	0	170	0.05556	0.003086	212	0.42593	0.18141	130	0	0	181	0.963	0.9273	
	103	0.80769	0.6524	133	0.028	0.00077	172	0.03704	0.001372	214	0.22222	0.04938	132	0.21429	0.045918	183	0	0	
							174	0.62963	0.396434					138	0.78571	0.617346			
						178	0.14815	0.021948											
						180	0.12963	0.016804											
total			1 0.6827	389		1 0.94599		1 0.439644	636		1 0.3546	526	1 0.663265	539		1 0.92867			
8	93	0	0	125	0.714	0.5102	164	0	0	210	0.65517	0.42925	126	0	0	175	0.0345	0.00119	
	97	0.18519	0.0343	131	0.036	0.00128	170	0.22414	0.050238	212	0.2069	0.04281	130	0	0	181	0.9138	0.83502	
	103	0.81482	0.6639	133	0.25	0.0625	172	0.37931	0.143876	214	0.13793	0.01902	132	0.25862	0.066885	183	0.0517	0.00268	
							174	0.37931	0.143876					138	0.74138	0.549643			
						178	0.01724	0.000297											
						180	0	0											
total			1 0.6982	389		1 0.57398		1 0.338287	636		1 0.49108	526	1 0.616528	539		1 0.83888			
9	93	0	0	125	0.796	0.63409	164	0.01667	0.000278	210	0.62903	0.39568	126	0	0	175	0.1	0.01	
	97	0.35	0.1225	131	0.167	0.02778	170	0.01667	0.000278	212	0.33871	0.11472	130	0	0	181	0.9	0.81	
	103	0.65	0.4225	133	0.037	0.00137	172	0	0	214	0.03226	0.00104	132	0.37097	0.137617	183	0	0	
							174	0.86667	0.751112					138	0.62903	0.395681			
						178	0.03333	0.001111											
						180	0.06667	0.004444											
total			1 0.545	389		1 0.66324		1 0.757223	636		1 0.51145	526	1 0.533299	539		1 0.82			
10	93	0.01667	0.0003	125	0.86	0.7396	164	0	0	210	0.46552	0.21671	126	0.01667	0.000278	175	0.1	0.01	
	97	0.23333	0.0544	131	0.12	0.0144	170	0.15	0.0225	212	0.48276	0.23306	130	0	0	181	0.8333	0.69444	
	103	0.75	0.5625	133	0.02	0.0004	172	0	0	214	0.05172	0.00268	132	0.23333	0.054444	183	0.0667	0.00444	
							174	0.85	0.7225					138	0.75	0.5625			
						178	0	0											
						180	0	0											
total			1 0.6172	389		1 0.7544		1 0.745	636		1 0.45244	526	1 0.617222	539		1 0.70889			
11	93	0.01667	0.0003	125	0.42	0.1764	164	0	0	210	0.43333	0.18778	126	0.01667	0.000278	175	0.3	0.09	

14	210	0.857	0.7347	93	0	0	0	125	0.96	0.9216	164	0	0	126	0	0	0	175	0.3	0.09	0
	212	0.054	0.0029	97	0.017	0.00028	0	131	0	0	170	0.01667	0.00028	130	0	0	0	179	0	0	0
	214	0.089	0.008	103	0.983	0.96694	0	133	0.04	0.0016	172	0	0	132	0.01667	0.000278	0	181	0.5167	0.26694	0
											174	0.7	0.49	138	0.98333	0.966944	0	183	0.1833	0.03361	0
											178	0.28333	0.08028	0	0	0	0				
											180	0	0	0	0	0	0				
total	1.000	0.746				0.967				0.923		1.000	0.571	1.000	0.967			1.000	0.391		
15	210	0.700	0.49	93	0	0	0	125	0.86	0.7396	164	0	0	126	0	0	0	175	0.5167	0.26694	0
	212	0.283	0.0803	97	0.155	0.02408	0	131	0	0	170	0	0	130	0	0	0	179	0	0	0
	214	0.017	0.0003	103	0.845	0.71373	0	133	0.14	0.0196	172	0	0	132	0.13333	0.017778	0	181	0.4833	0.23361	0
											174	0	1	138	0.86667	0.751111	0	183	0	0	0
											178	0	0	0	0	0	0				
											180	0	0	0	0	0	0				
total	1.000	0.571				0.738				0.759		1.000	1.000	1.000	0.769			1.000	0.501		
16	210	0.21667	0.0469	93	0	0	0	125	0.96667	0.934445	164	0	0	126	0	0	0	175	0.1	0.01	0
	212	0.58333	0.3403	97	0.083	0.00694	0	131	0	0	170	0.06667	0.00444	130	0	0	0	179	0	0	0
	214	0.2	0.04	103	0.917	0.84028	0	133	0.03333	0.001111	172	0	0	132	0.03333	0.001111	0	181	0.9	0.81	0
											174	0.93333	0.87111	138	0.96667	0.934445	0	183	0	0	0
											178	0	0	0	0	0	0				
											180	0	0	0	0	0	0				
total	1.000	0.4272				1.084722				1.0935556		1.087555	1.087555	1.0935556				1.082			
17	93	0	0	125	0.75	0.5625	0	164	0	0	210	0.56897	0.32372	126	0	0	0	175	0	0	0
	97	0.05	0.0025	131	0	0	0	170	0.05	0.0025	212	0.25862	0.06688	130	0	0	0	181	0.7069	0.4997	0
	103	0.95	0.9025	133	0.25	0.0625	0	172	0	0	214	0.17241	0.02973	132	0	0	0	183	0.2931	0.08591	0
											174	0.66667	0.444445	138	1	1	1				
											178	0.28333	0.080278	0	0	0	0				
											180	0	0	0	0	0	0				
total	1.000	0.905	389	1.0625		1.0527222	636			1.042033	526	1	1	539	1.058661						
18	93	0	0	125	0.167	0.02778	0	164	0.01667	0.000278	210	0.39655	0.15725	126	0	0	0	175	0.0172	0.0003	0
	97	0.18966	0.036	131	0.021	0.00043	0	170	0	0	212	0.58621	0.34364	130	0	0	0	181	0.6897	0.47562	0
	103	0.81035	0.6567	133	0.813	0.66016	0	172	0	0	214	0.01724	0.0003	132	0.16667	0.027778	0	183	0.2931	0.08591	0
											174	0.53333	0.284444	138	0.83333	0.694444	0				
											178	0.43333	0.187777	0	0	0	0				
											180	0.01667	0.000278	0	0	0	0				
total	1.000	0.6926				1.068837	0.01667	0.000278		1.050119	0.16667	0.027778						1.056183			
19	93	0	0	125	0.28	0.0784	0	164	0	0	210	0.18333	0.03361	126	0	0	0	175	0.069	0.00476	0
	97	0.15	0.0225	131	0.08	0.0064	0	170	0	0	212	0.61667	0.38028	130	0	0	0	181	0.9138	0.83502	0
	103	0.85	0.7225	133	0.64	0.4096	0	172	0	0	214	0.2	0.04	132	0.06667	0.004444	0	183	0.0172	0.0003	0
											174	0.93333	0.87111	138	0.93333	0.87111	0				
											178	0.06667	0.004444	0	0	0	0				
											180	0	0	0	0	0	0				
total	1.000	0.745	389	1.04944		1.0875555	636			1.045389	526	1.0875555	539	1.084007							
20	93	0	0	125	0.375	0.14063	0	164	0	0	210	0.33333	0.11111	126	0	0	0	175	0.05	0.0025	0
	97	0.18519	0.0343	131	0.025	0.00063	0	170	0.01667	0.000278	212	0.28333	0.08028	130	0	0	0	181	0.9	0.81	0
	103	0.81482	0.6639	133	0.6	0.36	0	172	0	0	214	0.38333	0.14694	132	0.21667	0.046945	0	183	0.05	0.0025	0
											174	0.9	0.81	138	0.78333	0.613611	0				
											178	0.08333	0.006944	0	0	0	0				
											180	0	0	0	0	0	0				
total	1.000	0.6982	389	1.050125		1.0817222	636			1.033833	526	1.0660555	539	1.0815							
21	93	0	0	125	0.983	0.96694	0	164	0	0	210	0.13333	0.01778	126	0	0	0	175	0.0667	0.00444	0
	97	0.11667	0.0136	131	0	0	0	170	0	0	212	0.66667	0.44444	130	0	0	0	181	0.9	0.81	0
	103	0.88333	0.7803	133	0.017	0.00028	0	172	0.06667	0.004444	214	0.2	0.04	132	0.05	0.0025	0	183	0.0333	0.00111	0
											174	0.93333	0.87111	138	0.95	0.9025	0				
											178	0	0	0	0	0	0				
											180	0	0	0	0	0	0				
total	1.000	0.7939	389	1.096722	1038	1.0875555	636			1.050222	526	1.0905	539	1.081556							
22	93	0	0	125	1	1	0	164	0.01613	0.00026	210	0.29032	0.08429	126	0	0	0	175	0.0161	0.00026	0
	97	0.01613	0.0003	131	0	0	0	170	0.03226	0.001041	212	0.40323	0.16259	130	0	0	0	181	0.9677	0.93652	0
	103	0.98387	0.968	133	0	0	0	172	0	0	214	0.30645	0.09391	132	0.01613	0.00026	0	183	0.0161	0.00026	0
											174	0.70968	0.503641	138	0.98387	0.968002	0				
											178	0.22581	0.050988	0	0	0	0				
											180	0.01613	0.00026	0	0	0	0				
total	1.000	0.9683	389	1	1	1.0556191	636			1.034079	526	1.0968262	539	1.093704							
23	93	0	0	125	0.75	0.5625	0	164	0	0	210	0.48276	0.23306	126	0	0	0	175	0.1034	0.0107	0
	97	0.08929	0.008	131	0	0	0	170	0.10345	0.010701	212	0.39655	0.15725	130	0	0	0	181	0.8793	0.77319	0
	103	0.91071	0.8294	133	0.25	0.0625	0	172	0	0	214	0.12069	0.01457	132	0.03448	0.001189	0	183	0.0172	0.0003	0

26	93	0	0	125	1	1	164	0	0	210	0.2069	0.04281	126	0	0	175	0.0517	0.00268
	97	0.06897	0.0048	131	0	0	170	0	0	212	0.74138	0.54964	130	0	0	181	0.8448	0.71373
	103	0.93104	0.8668	133	0	0	172	0	0	214	0.05172	0.00268	132	0.08621	0.007432	183	0.1034	0.0107
							174	0.7931	0.629012				138	0.91379	0.835018			
							178	0.2069	0.042806									
							180	0	0									
total								1 0.671819	636		1 0.59512	526	1 0.842449	539	1 0.72711			
27	93	0	0	125	1	1	164	0	0	210	0.75862	0.57551	126	0	0	175	0	0
	97	0.32759	0.1073	131	0	0	170	0	0	212	0.10345	0.0107	130	0	0	181	1	1
	103	0.67241	0.4521	133	0	0	172	0	0	214	0.13793	0.01902	132	0.13793	0.019025	183	0	0
							174	0.63793	0.406956				138	0.86207	0.743163			
							178	0.36207	0.131094									
							180	0	0									
total								1 0.53805	636		1 0.60523	526	1 0.762188	539	1	1		
28	93	0.02	0.0004	125	0.875	0.76563	164	0	0	210	0.23333	0.05444	126	0.11667	0.013611	175	0.3276	0.10731
	97	0.06	0.0036	131	0.125	0.01563	170	0.03333	0.001111	212	0.65	0.4225	130	0	0	181	0.4828	0.23306
	103	0.92	0.8464	133	0	0	172	0	0	214	0.11667	0.01361	132	0.11667	0.013611	183	0.1897	0.03597
							174	0.81667	0.666945				138	0.88333	0.780277			
							178	0.13333	0.017778									
							180	0.01667	0.000278									
total								1 0.686112	636		1 0.49056	526	1.11667	0.8075	539	1 0.37634		
29	93	0	0	125	0.826	0.68242	164	0.01667	0.000278	210	0.35	0.1225	126	0	0	175	0.0172	0.0003
	97	0.27586	0.0761	131	0.174	0.03025	170	0.01667	0.000278	212	0.43333	0.18778	130	0.01667	0.000278	181	0.8276	0.6849
	103	0.72414	0.5244	133	0	0	172	0	0	214	0.21667	0.04694	132	0.3	0.09	183	0.1552	0.02408
							174	0.66667	0.444445				138	0.68333	0.466944			
							178	0.3	0.09									
							180	0	0									
total								1 0.535	636		1 0.35722	526	1 0.557222	539	1 0.70927			
30	93	0	0	125	0.5	0.25	164	0.02778	0.000772	210	0.40476	0.16383	126	0	0	175	0.0625	0.00391
	97	0.125	0.0156	131	0	0	170	0	0	212	0.52381	0.27438	130	0	0	181	0.5938	0.35254
	103	0.875	0.7656	133	0.5	0.25	172	0	0	214	0.07143	0.0051	132	0.19444	0.037808	183	0.3438	0.11816
							174	0.63889	0.408179				138	0.80556	0.64892			
							178	0.30556	0.093364									
							180	0.02778	0.000772									
total								1 0.503087	636		1 0.44331	526	1 0.686729	539	1 0.47461			
31	93	0.01724	0.0003	125	0.767	0.58778	164	0	0	210	0.41071	0.16869	126	0.01786	0.000319	175	0.3448	0.11891
	97	0.10345	0.0107	131	0.1	0.01	170	0.03448	0.001189	212	0.46429	0.21556	130	0	0	181	0.569	0.32372
	103	0.87931	0.7732	133	0.133	0.01778	172	0	0	214	0.125	0.01563	132	0.10714	0.01148	183	0.0862	0.00743
							174	0.93104	0.866826				138	0.875	0.765625			
							178	0.03448	0.001189									
							180	0	0									
total								1 0.869204	636		1 0.39987	526	1 0.777423	539	1 0.45006			
32	93	0	0	125	1	1	164	0	0	210	0.40909	0.16736	126	0	0	175	0	0
	97	0.34091	0.1162	131	0	0	170	0.02273	0.000517	212	0.43182	0.18647	130	0.025	0.000625	181	0.8636	0.74587
	103	0.65909	0.4344	133	0	0	172	0	0	214	0.15909	0.02531	132	0.3	0.09	183	0.1364	0.0186
							174	0.88636	0.785641				138	0.675	0.455625			
							178	0.09091	0.008264									
							180	0	0									
total								1 0.794422	636		1 0.37913	526	1 0.54625	539	1 0.76446			

<i>colonies</i>	nombre d' allèles par locus					
	A24	AP81	AC306	A 113	A7	AP55
1	2	2	2	3	2	2
2	2	2	2	3	2	2
3	2	2	4	3	2	2
4	2	2	4	2	2	3
5	2	2	4	3	3	2
6	2	2	3	2	3	3
7	3	2	5	3	2	2
8	2	3	4	3	2	3
9	2	3	5	3	2	2
10	3	3	2	3	3	3
11	3	3	2	3	4	3
12	2	2	5	3	2	2
13	3	2	2	3	3	2
14	2	2	3	3	2	3
15	2	2	1	3	2	2
16	2	2	2	3	2	2
17	2	2	3	3	1	2
18	2	3	4	3	2	3
19	2	3	2	3	2	3
20	2	3	3	3	2	3
21	2	2	2	3	2	3
22	2	1	5	3	2	3
23	2	2	4	3	2	3
24	2	1	4	3	2	3
25	2	3	2	3	2	2
26	2	1	2	3	2	3
27	2	1	2	3	2	1
28	3	2	4	3	3	3
29	2	2	4	3	3	3
30	2	2	4	3	2	3
31	3	3	3	3	3	3
32	2	1	3	3	3	2

Nombre d'allèles par locus par colonie

« Polyandrie et diversité génétique de l'abeille *Apis mellifera unicolor* de Madagascar »

RESUME

L'abeille *Apis mellifera unicolor* est endémique à Madagascar, elle participe à la pollinisation de la flore locale endémique y compris les cultures vivrières et les cultures d'exportation telle que le litchi. En 2010, l'arrivée du varroa, acarien ectoparasite des abeilles a été détectée et déclarée pour la première fois dans quelques régions des hauts plateaux. Notre objectif est d'étudier le taux de polyandrie, et de comparer la diversité intra/inter colonie dans des colonies infestées par le varroa à celles indemnes de cette race. Ces informations nous permettront de voir les Impacts de la varroase dans le comportement reproductif et dans la résistance via les différences génétiques. Six marqueurs microsatellites (A7, A24, AP55, AP81, A113, AC306) ont été utilisés pour analyser 926 individus de 32 colonies d'abeille. L'ADN mitochondrial au niveau de la région intergénique du cytochrome oxydase COI et COII d'un individu pour chaque colonie a été séquencé. Les marqueurs microsatellites utilisés ont montré qu'il n'existait aucune différence significative sur le taux de polyandrie entre les colonies collectées dans les 5 sites infestées par le varroa d'Antananarivo avec celles des 2 sites indemnes de Manakara. L'analyse de la diversité a montré qu'il y a peu de diversité allélique inter-coloniale entre les ruchers exploités et échantillonnés. Le séquençage de l'ADN mitochondrial a montré que la diversité haplotypique des individus testés était très faible. Aucune structuration des populations n'a pu être détectée. Le nombre de mâles féconds par reine par colonie observé (de 7 à 17 mâles) est voisin de celui d'autres races d'*Apis mellifera* : ainsi, le varroa ne semblerait pas encore avoir d'effet sur la polyandrie des ruchers observés. Ceci pourrait s'expliquer soit par l'arrivée encore récente du varroa soit par la préférence trophique du varroa qui pourrait attaquer préférentiellement les ouvrières que les mâles. La faible diversité génétique observée, pourrait être considérée comme la conséquence d'une « mauvaise » conduite des ruchers, liée à des croisements consanguins issus de même origine parentale ou au moins maternelle. Outre la bonne conduite apicole, la sélection des lignées résistantes afin d'obtenir des reines ayant des gènes de la résistante au Varroa est une alternative dans la lutte contre ce dernier en combinaison ou non avec d'autres méthodes.

Mots Clés : Polyandrie/diversité génétique/microsatellite/ADN mitochondrial/*Apis mellifera unicolor*/Madagascar

Polyandrie and genetic diversity of the honey bee *Apis mellifera unicolor* of Madagascar

ABSTRACT

The honey bee *Apis mellifera unicolor* is endemic to Madagascar; it contributes to the pollinisation of endemic flora such food crop, exportation culture, for example lychee. In 2010, the arrival of the mite Varroa, an ectoparasite of *Apis mellifera* was confirmed. It was detected for the first time in some highland areas. The aim of this study is to determine polyandrious rate and to compare the diversity in and between varroa infested and varroaless colony. Six microsatellite markers (A7,A24,AP55,AP81,A113,AC306.) were used to analyse 926 honey bees from 32 colonies. Intergenic area cytochrome oxydase I- II in DNA mitochondrial was sequenced. The microsatellite markers showed that there is no significant difference in the polyandrious rate between the colony collected in the 5 sites varroa-infested in Antananarivo and the 2 sites varroaless in Manakara. The analysis of diversity showed that there is no much allelic diversity in the colony between the exploited and sampled hive bees. The sequenced mitochondrial DNA showed that the haplotypic diversity of tested individual was very low. No structuration of population was detected.

The number of male observed per colony (7 to 17 males) is close to that of other strains of *Apis mellifera* studied by other authors indicating that there is no varroa effect yet in the observed polyandrious hives. This can be explained either by the recent arrival of varroa or to the trophic preference of varroa which preferentially affects the offsprings than the males. The low genetic diversity observed in the result may be due to the bad beekeeping in relation to a consanguineous crossbreeding from parental or maternal origin. Besides the good beekeeping, the selection of the resistant strain to obtain queen with a varroa resistant gene is one alternative method to be combined or not with other techniques to control varroa.

Key words: genetic diversity /microsatellite/DNA mitochondrial/*Apis mellifera unicolor*/Madagascar