



Facteurs génétiques, biogéographiques et temporels : quels effets sur la structuration du microbiote de la lignée évolutive M de l'abeille européenne *Apis mellifera* ?

Iris Eouzan

► To cite this version:

Iris Eouzan. Facteurs génétiques, biogéographiques et temporels : quels effets sur la structuration du microbiote de la lignée évolutive M de l'abeille européenne *Apis mellifera* ?. Ecologie, Environnement. Université Clermont Auvergne [2017-2020], 2018. Français. NNT : 2018CLFAC073 . tel-02128660

HAL Id: tel-02128660

<https://theses.hal.science/tel-02128660>

Submitted on 14 May 2019

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

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

UNIVERSITE CLERMONT AUVERGNE

N° d'ordre :

ECOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE, SANTE, AGRONOMIE,
ENVIRONNEMENT

Thèse :

Présentée à l'Université Clermont-Auvergne
pour l'obtention du grade de DOCTEUR D'UNIVERSITE
Spécialité : Ecologie

Soutenue le 17 décembre 2018

Iris EOUZAN

**Facteurs génétiques, biogéographiques et temporels : quels effets sur
la structuration du microbiote de la lignée évolutive M de l'abeille
européenne *Apis mellifera* ?**

Membres du jury :

Rapporteurs :

Nicolas DEROME
Professeur, Université Laval, Québec, Canada

Catherine ARMENGAUD
Maîtresse de Conférences HDR, Université Paul Sabatier, Toulouse

Joan VAN BAAREN
Professeure, Université de Rennes I, Rennes

Examinatrice :

Karine CHALVET-MONFRAY
Professeure, VetAgro Sup, Lyon

Directeurs de thèse :

David G. BIRON
Chargé de recherche HDR, Université Clermont Auvergne, Clermont-Ferrand

Télesphore SIME-NGANDO
Directeur de recherche, Université Clermont Auvergne, Clermont-Ferrand

Laboratoire « Microorganismes : Génome et Environnement »
UMR CNRS 6023, équipe « Biodiversité microbienne et adaptations fonctionnelles »

Remerciements

Mes remerciements vont en priorité aux rapporteurs, Nicolas DEROME, Catherine ARMENGAUD et Joan VAN BAAREN d'avoir accepté d'être les rapporteurs et Karine CHALVET-MONFRAY l'examinatrice de mon travail.

Je remercie M. Téléphore SIME-NGANDO pour son accueil au sein du laboratoire qu'il dirige, le Laboratoire Microorganismes Génome et Environnement. Je le remercie également pour sa présence en tant que co-directeur de thèse.

Mes remerciements les plus sincères vont à David G. BIRON, qui m'a encadrée durant mes deux stages de master et m'a ensuite donné ma chance pour ce doctorat. Je le remercie tout particulièrement du temps et de l'investissement qu'il m'a consacré tout au long de ce travail et qui m'ont permis de progresser année après année.

Je remercie également l'équipe BioAdapt de m'avoir accueillie et intégrée, ainsi que pour leur disponibilité sans faille. Merci également surtout à Jonathan COLOMBET et Hermine BILLARD pour leur disponibilité lors des analyses de cytométrie.

Merci à l'ensemble des membres du projet BEEHOPE, qui se sont rendus disponibles tout au long de ces trois années. Un merci tout spécial à Noël MALLET, Alice PINTO, Ana Marta MUÑOZ, Arnaud COUGOUL et Lionel GARNERY qui ont été particulièrement sollicités dans cette aventure et ont toujours répondu présent même dans les situations d'urgence.

Mes remerciements vont également aux élites du bureau bleu, Benj, Amélie, Thomas, Tiph (pour son passage éclair qui compte quand même), mais aussi Laurianne, Louis et Florent pour leur bonne humeur et leur accueil, ainsi qu'à l'ensemble des doctorants du laboratoire qui survivent avec le sourire.

Enfin, je remercie ma grande famille pour son soutien à distance tout au long de mon parcours universitaire, et surtout Damien qui a été en première ligne et pourtant d'un soutien chaleureux et indéfectible en toutes circonstances.

Résumé

Comme de nombreuses espèces naturelles, l'abeille européenne (*Apis mellifera*) est confrontée à une pression croissante de facteurs biotiques et abiotiques : environnement, diversité génétique, parasitisme, etc. Chacun de ces facteurs peut potentiellement influencer les communautés de micro-organismes qui constituent le microbiote de l'abeille et évoluent avec elle. L'objectif de cette thèse était de comprendre la dynamique et la structuration du microbiote intestinal de la lignée évolutive M de l'abeille européenne en fonction de facteurs biogéographiques, génétiques et temporels des colonies d'abeilles. Cette analyse a été réalisée dans sept conservatoires de cette lignée évolutive, répartis au Portugal (*A. m. iberiensis*), en Espagne et en France (*A. m. mellifera*), selon un gradient Nord-Sud et Est-Ouest. Dans un premier temps, mon travail a permis de décrire un facteur jusqu'ici mal connu : l'humidité dans les ruches. Celle-ci s'est révélée stable, entre 50 et 60 % d'humidité relative toute l'année, suggérant une hygrorégulation par les colonies d'abeilles, quelle que soit la période de l'année et la dynamique populationnelle au sein des nids (ici, la ruche). Par la suite, nous avons développé un protocole permettant le suivi spatio-temporel de la charge virale des abeilles par cytométrie en flux. Son application sur nos abeilles a montré que le temps influence moins la charge virale que le lieu géographique. Enfin, une analyse métagénomique sur un gène ciblé (ARNr 16s) a confirmé que la localisation géographique et le temps étaient les deux principaux facteurs ayant une influence sur la structuration du microbiote intestinal des abeilles de la lignée évolutive M. Par ailleurs, cette dernière analyse a montré l'importance de prendre en compte l'interaction entre les facteurs, qui peuvent avoir plus d'impact pris ensemble que séparément. Enfin, des perspectives sont envisagées, telles que la réalisation d'un réseau d'inter-actants permettant de comprendre la part de chaque facteur sur les communautés bactériennes mais également les pathogènes.

Mots clés : *Apis mellifera*, microbiote, Virus, hygrorégulation, biogéographie, patrimoine génétique

Abstract

Like many natural species, the European bee (*Apis mellifera*) faces a threat of biotic and abiotic factors: environment, genetic diversity, parasitism, etc. Each of these factors can potentially influence the communities of microorganisms that constitute the bee's microbiota and evolve with it. The aim of this work was to understand the dynamics and structure of the gut microbiota of the M evolutionary line of *A. mellifera* according to biogeographic, genetic and temporal factors of bee colonies. This analysis was carried out in the conservatories of this evolutionary line, located in Portugal (*A. m. iberiensis*), Spain and France (*A. m. mellifera*) along a North-South and East-West gradient. First, my work has described a hitherto barely understood factor: humidity in hives. It appeared to be stable in our beehives, between 50 and 60% relative humidity all year long, which suggests a hygroregulation by honeybee colonies whatever the periode of year and the populational dynamics inside the nest (i.e. the beehive). We developed a protocol allowing spatio-temporal monitoring of the viral load of bees by flow cytometry. After using it on our colonies, we showed that time influences less viral load than geographical location. Finally, a metagenomic analysis on a target gene (16s rRNA) confirmed that both geographical location and time were the two main factors in shaping the gut microbiota structure of honeybees belonging to the M evolutive lineage. In addition, this last analysis has shown the importance to take into account the interaction between factors, which can have a bigger effect when taken together. Finally, perspectives are envisaged, such as the realization of a network of interactants allowing to understand the part of each factor on the bacterial but also pathogens' communities.

Key words: *Apis mellifera*, microbiota, Virus, hygroregulation, biogeography, genetic background

Sommaire

Introduction générale.....	1
Chapitre I : Synthèse bibliographique	5
1. Abeilles domestiques et déclin	6
1.1. Introduction.....	7
1.2. L'abeille domestique et son histoire évolutive	8
1.3. Des populations d' <i>A. mellifera</i> en déclin.....	11
1.4. Les causes probables du déclin	12
1.4.1.Les pesticides	12
1.4.2.Les pathogènes.....	13
1.4.3.Les autres facteurs du déclin.....	16
1.5. Un nouveau paradigme.....	16
1.6. Les pratiques apicoles et le déclin des populations d' <i>A. mellifera</i>	19
1.7. Conclusion	20
2. Les conservatoires, un réseau en plein développement.....	21
2.1. Les conservatoires en France	21
2.2. Le projet BioDIVERSA ERANET « BEEHOPE »	22
2.2.1.Naissance du projet	22
2.2.2.Principe	22
3. Problématiques.....	23
Chapitre II : Matériel et méthode	25
1. Sur le terrain	26
1.1. Organisation des conservatoires de BEEHOPE.....	26
1.2. Collecte des données	27
1.2.1.Température et humidité.....	28
1.2.2.Prélèvement d'abeilles.....	28
2. Au laboratoire	29
2.1. Approches exploratoires	29
2.1.1.Cytométrie en flux.....	29
2.1.2.Métagénomique (ARNr 16S).....	30
2.2. Approches ciblées	31
2.2.1.PCR et RT-PCR	31
2.2.2.Bilan des analyses en laboratoire	32
2.3. Analyses génétiques de l'ADN mitochondrial (lignée évolutive des colonies)	33
2.3.1.Analyse de l'ADN mitochondrial	34
2.3.2.Analyse de l'ADN nucléaire.....	35
Chapitre III : Régulation de l'humidité dans la ruche	37
1. Abstract.....	39
2. Introduction.....	40
3. Materials and Methods	41
3.1. Ethics statement	41
3.2. European study sites	41
3.3. Experimental design to monitor the relative humidity in hives	42

3.4. Statistical Analysis	42
4. Results	44
4.1. Daily hygoregulation.....	44
4.2. Seasonal and annual hygoregulation.....	46
5. Discussion.....	50
6. Conclusion.....	53
7. Supporting information	54
Chapitre IV : La charge virale des abeilles est-elle influencée par le temps ou par l'environnement ?	67
1. Abstract.....	69
2. Introduction.....	69
3. Material and Methods.....	70
4. Results and Discussion	71
5. Supplementary data	74
Chapitre V : Biogéographie, génétique et temps : quel impact sur la structuration du microbiote des abeilles ?	77
1. Abstract.....	79
2. Introduction.....	80
3. Material and methods	81
3.1. Sampling	81
3.2. Environment.....	82
3.3. Genetic analysis	82
3.4. Metagenomic 16s RNA analysis	83
3.4.1.DNA extraction	83
3.4.2.Pyrosequencing of the 16S rRNA gene and sequence processing.....	84
3.4.3.Data analysis	84
4. Results	85
4.1. Genetic analysis	85
4.2. Composition of the honeybee gut microbiota.....	86
4.3. Alpha and beta diversity	87
4.4. Comparison of the effects of biogeography and genetic	88
5. Discussion.....	90
6. Conclusion.....	91
Discussion et perspectives	95
1. Bilan de l'ensemble des chapitres de cette thèse	95
2. Perspectives à court terme suite aux travaux de ma thèse.....	99
2.1. Température dans les ruches	99
2.2. Virus à ARN et autres pathogènes	100
Conclusion générale	103
Références.....	105
Annexes	119

Liste des figures

Figure I-1 : Histoire évolutive de l'abeille domestique	9
Figure I-2 : Répartition géographique actuelle des sous-espèces d' <i>A. mellifera</i>	10
Figure I-3 : Interactions entre les facteurs responsables de la mortalité d' <i>A. mellifera</i>	17
Figure I-4 : Interactions simplifiées entre certains pesticides et parasites	18
Figure II-1 : Répartition des six conservatoires de BEEHOPE	26
Figure II-2 : Présentation des thermo-hygro-boutons	28
Figure II-3 : Bilan des conditions utilisées pour les analyses en laboratoire	33
Figure III-1 : Linear modeling in summer	44
Figure III-2 : RH ratio (RHi-RHe)/RHe) in the central brood frame in summer.....	45
Figure III-3 : RH levels over a complete year	47
Figure III-4 : Dendrogram of the hierarchical clustering for RH levels.....	48
Figure III-5 : MDS graph resulting of the analysis done with the matrix of dissimilarities	48
Figure III-6 : Mandel's graphs for the complete year.....	49
Figure III-S1 : RH measured by the external iButton in the four conservation centers	58
Figure III-S2 : Linear modeling in winter	59
Figure III-S3 : RH ratio (RHi-RHe)/RHe) in the central brood frame in winter	60
Figure III-S4 : RH levels during autumn 2015 : boxplots.....	61
Figure III-S5 : RH levels during winter 2016 : boxplots	62
Figure III-S6 : RH levels during spring 2016 : boxplots.....	63
Figure III-S7 : RH levels during summer 2016 : boxplots	64
Figure III-S8 : Mandel's graphs for autumn 2015	65
Figure III-S9 : Mandel's graphs for winter 2016.....	65
Figure III-S10 : Mandel's graphsfor spring 2016	66
Figure III-S11 : Mandel's graphsfor summer 2016	66
Figure IV-1 : Protocol to estimate the virus load in the guts and heads of the honeybees.....	70
Figure IV-2 : Virus load in the honeybee's guts (A) and heads (B) : Boxplots.....	72
Figure IV-S1 : Sampling locations across France, Spain and Portugal.....	74
Figure IV-S2 : Example of a cytogram.....	74
Figure IV-S3 : Hierarchical clustering analysis for the guts (A) and the heads (B) : dendrogram	75
Figure IV-S4 : Guts (A) and the heads (B) DNA virus loads : MDS graph	75
Figure V-1 : Sampling locations across France, Spain and Portugal.....	82
Figure V-2 : Classification phyla-wise (A) and genera-wise (B) of the bacteria	86
Figure V-3 : Boxplots for the Shannon and Chao1 indexes	87
Figure V-4 : NMDS projection of the Bray-Curtis matrix.....	88
Figure A1 : Comparaison de la température et de l'humidité relative sur une année	121
Figure A2 : Prévalence des sept virus recherchés par RT-PCR.....	123

Liste des tableaux

Tableau II-1 : Description des pathogènes recherchés par RT-PCR et PCR.....	32
Table III-S1 : Linear equation, r and R^2 for each RH model in summer	54
Table III-S2 : Linear equation, r and R^2 for each RH model in winter	55
Table III-S3 : Boxplot values for yearly RH levels	56
Table III-S4 : Boxplot values for seasonal RH levels.....	57
Table V-1 : Information used for the statistical analysis	85
Table V-2 : NPMANOVA results for unifactorial and multifactorial analysis.....	89

Liste des abréviations

ABPV :	Acute Bee Paralysis Virus
ADN :	Acide DésoxyriboNucléique
ADNmt :	Acide DésoxyriboNucléique mitochondrial
ADNn :	Acide DésoxyriboNucléique nucléaire
ANSES :	Agence Nationale de Sécurité Sanitaire
ARN :	Acide RiboNucléique
ARNr :	Acide RiboNucléique ribosomal
BQCV :	Black Queen Cell Virus
CANIF :	Conservatoire de l'Abeille Noire d'Île de France
CANEC :	Conservatoire de l'Abeille Noire En Combrailles
CBPV :	Chronic Bee Paralysis Virus
DWV :	Deformed Wing Virus
EDTA :	Acide Éthylène-Diamine-Tétra-Acétique
EGCE :	Laboratoire Evolution Génome Comportement et Ecologie
IAPV :	Israeli Acute Paralysis Virus
KBV :	Kashmir Bee Virus
LMGE :	Laboratoire Micro-organismes: Génome et Environnement
OTU :	Operational Taxonomic Unit
PCR :	Polymerase Chain Reaction
PFA :	Paraformaldéhyde
RH (ou HR):	Relative Humidity (ou Humidité Relative)
RT-PCR :	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
SBV :	SacBrood Virus

Introduction générale

Comme de nombreuses espèces naturelles, les sous-espèces et les populations de l'abeille européenne, abeille ou mouche à miel, *Apis mellifera* (Linnaeus, 1758), sont confrontées dans les agroécosystèmes ainsi que dans les écosystèmes naturels à la pression croissante de facteurs biotiques et abiotiques : (i) stress environnementaux (ex. : malnutrition, exposition aux molécules toxiques et aux résidus issus de l'activité agricole et industrielle, mauvaise gestion apicole, changement climatique, perte et fragmentation d'habitats) ; (ii) diversité génétique (ex. : hybridations entre populations autochtones et introduites) ; (iii) parasitisme (ex. : importation de pathogènes). L'abeille européenne étant une espèce d'intérêt agronomique, la structuration naturelle de ses sous-espèces et de ses populations dans son aire de répartition naturelle a été perturbée. En France notamment, l'introduction délibérée de reines et d'essaims issus de sous-espèces et d'hybrides non indigènes au territoire tend à homogénéiser la diversité génétique naturelle et par conséquent mettre en danger de nombreuses sous-espèces d'*A. mellifera*.

La répartition naturelle des sous-espèces d'*A. mellifera* (≈25 sous-espèces réparties dans 4 lignées évolutives (A (Africaine), C (Carnica), M (Mellifera), O (Orientale)) et la pureté des sous-espèces pur-sang utilisées par les apiculteurs professionnels ont probablement été perturbées et affectées depuis plusieurs décennies (i) par les techniques usuelles d'apiculture, (ii) par le commerce international des abeilles (ex.: colonies, reines, faux-bourdons) et (iii) par les produits et stratégies utilisés pour tenter de freiner le déclin de l'abeille européenne (Cánovas et al., 2011; Han et al., 2012). Par exemple, l'apiculture a favorisé la répartition de sous-espèces avec des traits spécifiques apicoles à l'extérieur de leur aire de répartition naturelle, généralement au détriment des autres sous-espèces. Cela a causé une baisse de la diversité génétique nécessaire pour faire face à des parasites indigènes ou invasifs introduits par les colonies d'abeilles commercialisées. Ce phénomène est d'autant plus problématique dans le contexte actuel de déclin des abeilles mellifères à l'échelle mondiale, où l'adaptation locale à un habitat est essentielle pour permettre aux abeilles de faire face à des stress causés par des facteurs biotiques et abiotiques seuls ou en combinaison.

Ma thèse s'inscrit dans un projet européen Biodiversa ERANET (acronyme : BEEHOPE) qui a débuté en janvier 2015. Le projet BEEHOPE vise à favoriser le développement d'une apiculture

durable par l'utilisation et la préservation de deux sous-espèces d'*A. mellifera* endémiques d'Europe de l'ouest et appartenant à la lignée évolutive M : « l'abeille noire » (*A. mellifera mellifera*) avec une aire de répartition s'étalant de l'ouest de la Russie jusqu'au nord de l'Europe et jusqu'à la péninsule ibérique ; et « l'abeille espagnole ou ibérique » (*A. mellifera iberiensis*) peuplant la péninsule ibérique. Ce projet européen (acronyme : BEEHOPE) a débuté par la création de sites de conservation de l'abeille noire, deux en France dont un à Pontaurmur (45°51'N; 2°40'E) dans le département du Puy-de-Dôme et un à Chizé (46°06'N, 0°20'E) dans le département des Deux-Sèvres et un en Espagne à Bilbao (42°48'N; 2°20'W) dans le Pays Basque, ainsi que deux sites de conservation de l'abeille ibérique, un au nord du Portugal à Gimonde (41°48'N; 6°42'W) dans la région de Brangaça et un dans le sud du Portugal à Zavial (37°03'N; 8°52'W) dans la région de Raposeira. Deux autres sites de conservation de l'abeille noire, Champart (48°51'N; 2°0'E) et Rochefort (48°35'N; 1°57'E), situés dans le Conservatoire de l'Abeille Noire d'Île de France (CANIF) fondé en 2009, ont également été impliqués dans le projet BEEHOPE.

Chaque site de conservation a une superficie d'environ 380 km². Les échantillonnages et les relevés de mesures nécessaires à ma thèse ont été réalisés dans le centre des sites de conservation (zones dites « sanctuaires »). Six ruches ont été sélectionnées au hasard dans ces zones sanctuaires, et équipées d'instruments de mesure tels qu'une balance électronique ainsi que de « thermohygro boutons » enregistrant la température et l'humidité. De nombreuses données ont alors été récoltées sur chaque ruche, autour de quatre missions distinctes définies dans le cadre du projet BEEHOPE :

1. Une étude d'impact à l'aide d'analyses génétiques (i.e. ADNmt et ADNn) d'ouvrières issues de colonies afin de déterminer le niveau de pollution génétique (i.e. introgression) dû à d'autres lignées évolutives dans l'aire de distribution endémique de la lignée évolutive M d'*A. mellifera*
2. Un suivi éco-éthologique de colonies de la lignée évolutive M caractérisées génétiquement (ex. : masse, thermorégulation, hygrorégulation)
3. Un suivi spatio-temporel du microbiote de ces colonies
4. Une contribution à la réalisation d'actions de type « science participative » favorisant la discussion entre les acteurs socio-économiques, afin de mettre en place des comités et des projets sur chaque site de conservation, ceci dans le but de promouvoir l'apiculture durable et l'utilisation de colonies d'abeilles adaptées localement.

Mon sujet de thèse concernait les trois premières missions, mon objectif général étant de comprendre notamment la dynamique et la structuration du microbiote intestinal de la lignée évolutive M de l'abeille européenne en fonction de facteurs éco-éthologiques et génétiques des colonies d'abeilles, mais également de facteurs biogéographiques et temporels. Dans un premier temps, il était nécessaire de pouvoir prendre en compte indépendamment des données acquises dans le cadre de ma thèse, afin de déterminer leur importance dans le fonctionnement et le développement d'un superorganisme, ici une colonie d'abeilles. Pour ce faire, j'ai commencé par décrire les capacités de l'abeille noire et de l'abeille ibérique à réguler l'humidité à l'échelle quotidienne, saisonnière et annuelle dans leur ruche, ce qui n'avait encore jamais été décrit dans la littérature à ce jour.

Par la suite, l'analyse du microbiote intestinal et dans la tête des abeilles s'est effectué selon deux stratégies : (i) exploratoire (à travers la métagénomique par amplification d'un gène conservé (i.e. ARNr 16s) pour l'intestin, puis par cytométrie en flux pour l'intestin et la tête), et (ii) ciblée (RT-PCR, PCR) pour l'intestin et la tête. Ces données ont permis d'avoir une vision globale de la charge de bactéries, mais également de certains virus et microsporidies dans les abeilles au niveau de ces deux compartiments. Un protocole de cytométrie en flux permettant le suivi des virus à ADN des abeilles mellifères ayant été développé, celui-ci a été mis en application afin de déterminer si les charges virales observées dans nos sites d'étude étaient influencées par la biogéographie, le temps (i.e. mois) ou par la génétique des abeilles. La seconde partie de l'analyse exploratoire a été réalisée spécifiquement sur les bactéries, grâce à une analyse métagénomique (ARNr 16s) des intestins d'abeilles. L'objectif de ces analyses était de comprendre quelles familles et OTU (Unités Taxonomiques Opérationnelles) de bactéries étaient présentes dans chacun des conservatoires du projet BEEHOPE, et quelles influences avaient le temps, la génétique des abeilles et la biogéographie sur ces communautés bactériennes.

L'ensemble des travaux réalisés dans le cadre de ma thèse a fait l'objet d'un chapitre d'ouvrage à comité de lecture, de trois publications scientifiques (une soumise et deux en cours de soumission), d'une conférence invitée à un congrès international et de trois communications à des congrès.

VALORISATIONS SCIENTIFIQUES

Chapitre d'ouvrage à comité de lecture

Eouzan I, Garnery L, Sime-Ngando T, Biron DG, 2017. Les pesticides, la cause du déclin de l'abeille domestique ? Eds Bernard C, Mougin C, Pery A, Chapitre 8, pp. 185-198, *In* : Ecotoxicologie des communautés et impacts sur les fonctions des écosystèmes, ISTE Editions, Paris

Publications dans des journaux scientifiques à comité de lecture

Eouzan I, Garnery L, Pinto MA, Delalande D, Neves CJ, Fabre F, Lesobre J, Houte S, Estonba A, Montes I, Sime-Ngando T, Biron DG, 2018. Hygroregulation, a key ability for eusocial insects: Native Western European bees as a case study. *Soumis à Plos One*.

Eouzan I, Colombet J, Billard H, Garnery L, Pinto MA, Delalande D, Le Henry M, Houte S, Estonba A, Montes I, Sime-Ngando T, Biron DG, 2018. Flow cytometry, an efficient tool to survey the spatio-temporal dynamics of DNA virus load in honeybees. *En préparation de soumission*.

Eouzan I, Muñoz AM, Cougoul A, Garnery L, Pinto MA, Delalande D, Houte S, Estonba A, Montes I, Gasqui P, Bailly X, Sime-Ngando T, Biron DG, 2018. The role of biogeography, genetics and time in shaping diversity of the gut microbiota for the M evolutive lineage of honeybee. *En préparation de soumission*.

Conférence en tant qu'invitée à un congrès international

Eouzan I, Biron DG, 2016. Honeybee Conservation Centers in Western Europe: an innovative strategy using sustainable beekeeping to reduce honey bee decline. Western Apicultural Society, October 13-15, Honolulu, USA.

Communications à des congrès et à des symposiums

Eouzan I, Sime-Ngando T, Biron DG, 2016. Impact des activités humaines à l'échelle européenne sur la diversité et la dynamique des pathogènes associés à l'abeille domestique. 13^{ème} Rencontre des Microbiologistes du Pôle Clermontois, 5 avril, Campus des Cézeaux, Université Blaise Pascal, Aubière. Présentation orale.

Eouzan I, Sime-Ngando T, Biron DG, 2018. L'intérêt et l'apport de la caractérisation génétique des populations de l'abeille domestique afin de contribuer au développement d'une apiculture durable. Journée Sanitaire Apicole, 03 février, Tours. Présentation orale.

Eouzan I, Colombet J, Billard H, Garnery L, Pinto A, Delalande D, Houte S, Estomba A, Montes I, Lesobre J, Sime-Ngando T, Biron DG, 2018. Mise au point et validation d'un protocole pour quantifier la charge de virus à ADN chez l'abeille domestique à l'aide de la cytométrie en flux. 14-15 juin, Journées de l'Ecole Doctorale des Sciences de la Vie, Santé, Agronomie et Environnement, Université Blaise Pascal Clermont-Ferrand II. Poster.

Chapitre I : Synthèse bibliographique

1. Abeilles domestiques et déclin

Les abeilles représentent un sujet d'actualité très prisé, tant par leur aspect économique important que par les difficultés qu'elles rencontrent actuellement. Albert Einstein y a été lui-même associé, puisqu'on lui attribue cette célèbre phrase : « Si les abeilles disparaissaient de la surface du globe, l'homme n'aurait plus que quatre années à vivre » ; une citation qui s'est révélée être apocryphe. Cependant, même si cette phrase n'a probablement jamais été prononcée par le célèbre physicien, elle reste importante et résonne dans l'opinion publique. Les abeilles sont essentielles, et pas seulement par leur capacité inégalée à produire du bon miel. Leur grande assiduité dans la recherche de nectar en fait des pollinisatrices hors pair, et leur disparition totale serait une catastrophe environnementale qui impacterait de surcroît les populations humaines dans le monde entier. Cette disparition se dessine doucement depuis le début du XXI^e siècle, avec des mortalités annuelles variables mais inquiétantes. Les producteurs de pesticides ont alors été pointés du doigt, des scandales ont fait vibrer les médias et signer de nombreuses pétitions depuis des années. Mais les pesticides sont-ils vraiment les seuls coupables à blâmer ? N'y a-t-il pas d'autres facteurs qui entrent en jeu dans cette spirale de déclin ?

Le document suivant est un chapitre de livre qui s'inscrit dans le deuxième volume de la série Ecotoxicologie de la collection Système Terre-Environnement : « Ecotoxicologie, des communautés au fonctionnement des écosystèmes », écrit sous la direction de Cécile Bernard, Christian Mougin et Alexandre Péry, aux éditions ISTE. Première publication scientifique réalisée dans le cadre de mon doctorat, ce chapitre de livre retrace l'histoire évolutive de l'abeille européenne, puis rassemble les connaissances actuelles concernant le déclin des populations observé dans le monde. Enfin, il passe en revue les causes connues et soupçonnées de ces mortalités massives, avant de conclure sur de nouvelles pistes de réflexion sur ce sujet, qui s'inscrivent directement dans mon sujet de thèse.

Chapitre publié dans un livre à comité de lecture :**Les pesticides, la cause du déclin de l'abeille domestique ?**

Iris EOUZAN¹, Lionel GARNERY², Télesphore SIME-NGANDO¹ et David G. BIRON¹

¹Laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement, UMR CNRS 6023, Université Clermont-Auvergne, Campus Universitaire des Cézeaux, 1 Impasse Amélie Murat, 63178 Aubière cedex, France. ; ²Laboratoire Evolution, Génomes et Spéciation, UMR CNRS 9191, Bâtiment 13, Avenue de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette, France. ; ³Saint Quentin en Yvelines, Université de Versailles, 45 Avenue des Etats-Unis, 78000 Versailles, France.

Chapitre publié dans Ecotoxicologie des communautés et impacts sur les fonctions des écosystèmes, Eds Bernard C, Mougou C, Pery A, Chap. 8, pp. 185-198, ISTE Editions, Paris

1.1. Introduction

Les demandes croissantes pour nourrir l'ensemble de la population humaine ont mené ces dernières décennies à la synthèse et à l'utilisation de nombreux pesticides, incluant notamment les insecticides, fongicides et herbicides, qui ont fréquemment des effets sur des organismes non ciblés (Aubertot et al., 2005; Chansigaud, 2015). Ces produits sont largement répandus sur les cultures afin de les protéger et d'en augmenter la rentabilité, puis perdurent dans le sol et l'eau sur des temps variables. Parmi les animaux sensiblement exposés à ces substances figurent ceux responsables de la pollinisation des plantes. Cet important service écosystémique est exercé par différentes espèces animales, qu'elles soient diurnes ou nocturnes. En journée, il se fait activement par des oiseaux et surtout des insectes en tous genres tels que certains diptères, coléoptères, lépidoptères et hyménoptères (Pesson and Louveaux, 1984).

Au sein des hyménoptères, l'abeille domestique *Apis mellifera* Linnaeus (Hymenoptera : Apidae), occupe une place importante dans l'économie mondiale. Il a récemment été estimé que l'apport des abeilles sauvages représente quelque 3 251 dollars par hectare de culture, et les colonies d'abeilles domestiques 2 913 dollars (Kleijn et al., 2015). Cependant, à l'instar de nombreuses espèces naturelles, les populations européennes de l'abeille domestique sont confrontées sans cesse à la pression croissante de facteurs biotiques et abiotiques (Potts et al., 2010). Depuis au moins une dizaine d'années, une mortalité et une disparition massive des colonies de l'abeille domestique sont observées et confirmées dans les écosystèmes continentaux nord-américains, européens et japonais (Neumann and Carreck, 2010).

Qui est responsable du déclin d'*A. mellifera* ? L'homme ? Parmi les causes probables et souvent évoquées figurent le changement climatique, l'appauvrissement des habitats, les agents pathogènes, les produits phytosanitaires (par exemple, les néonicotinoïdes), les prédateurs (par exemple, le frelon asiatique) ou encore l'association nocive de plusieurs facteurs (par exemple, la synergie pathogènes/néonicotinoïdes) (Aufauvre et al., 2012; Potts et al., 2010; vanEngelsdorp and Meixner, 2010). Cependant, d'autres facteurs tels les pratiques apicoles sont trop rarement pris en compte par la communauté scientifique. Ainsi, ce chapitre présentera tout d'abord l'abeille domestique et son histoire évolutive, connaissances essentielles à tout lecteur pour mieux comprendre et cerner les causes probables de son déclin dans les civilisations occidentales. Le déclin des populations d'*A. mellifera* et ses causes probables seront considérées selon un nouveau paradigme : une cause multifactorielle, notamment la synergie issue de l'association pathogènes/insecticides. Ensuite, la contribution possible des pratiques apicoles au déclin d'*A. mellifera* sera discutée. Finalement, nous conclurons sur des solutions possibles pour freiner celui-ci afin de favoriser le bon fonctionnement de ce service écosystémique.

1.2. L'abeille domestique et son histoire évolutive

Il y a environ 100 millions d'années, les premières plantes à fleurs apparaissaient sur Terre, offrant au règne animal une abondante source de nourriture (essentiellement les pollens et nectars) (Vidau et al., 2011). C'est probablement au même moment qu'ont émergé les premiers hyménoptères pollinisateurs, à l'origine de la superfamille des apoïdes. Résistant aux crises climatiques successives, les hyménoptères pollinisateurs et les plantes à fleurs ont partagé une histoire évolutive commune, contribuant à l'émergence de 250 000 espèces de plantes à fleurs et de 20 000 espèces d'apoïdes connues à ce jour (Vidau et al., 2011). Un spécimen de la tribu des Apini âgé de 80 millions d'années a été découvert dans un morceau d'ambre au New Jersey (Michener and Grimaldi, 1988). Au vu des différents fossiles découverts, il semblerait que les abeilles aient subi de rapides évolutions morphologiques pendant l'Oligocène puis n'aient plus connu de grandes modifications depuis 30 millions d'années (Clément, 2015).

Les abeilles appartiennent à la classe des insectes, à l'ordre des hyménoptères et à la famille des apidés. Il existe de nombreuses espèces d'abeilles solitaires et peu d'espèces sociales. C'est parmi cette deuxième catégorie que se situent les abeilles dites « abeilles à miel », car elles sont de grandes

productrices de miel, appartenant toutes au genre *Apis* (Han et al., 2012). Ce genre regroupe actuellement dix espèces divisées en trois groupes distincts : les abeilles nichant dans des cavités (*Apis*), les abeilles géantes (*Megapis*) et les abeilles naines (*Micrapis*) (Arias and Sheppard, 2005; Raffiudin and Crozier, 2007) (voir figure I-1a). Parmi ces espèces, seules *A. mellifera* (dite « abeille occidentale » ou « abeille domestique ») et, dans une moindre mesure, son homologue asiatique *Apis cerana*, ont été à ce jour domestiquées par l'homme ; les autres espèces ne sont présentes qu'à l'état sauvage.

L'origine évolutive d'*A. mellifera* reste encore un sujet très controversé. Jusqu'à récemment, il avait été admis que cette espèce était issue d'une abeille venue du Moyen-Orient. Une étude récente suggère cependant plutôt une origine africaine (Han et al., 2012). Pourtant, la théorie de l'origine orientale (Garnery et al., 1992) (voir figure I-1b) reste la plus probable car celle-ci s'appuie notamment :

- sur des comparaisons significatives entre les sous-espèces d'*A. mellifera* (suite à un échantillonnage représentatif des populations de toute l'aire de répartition de l'abeille domestique);
- sur une banque de données génétiques pour l'étude ancestrale et évolutive de l'ADN mitochondrial (ADNmt) et de l'ADN nucléaire (ADNn) de l'abeille domestique.

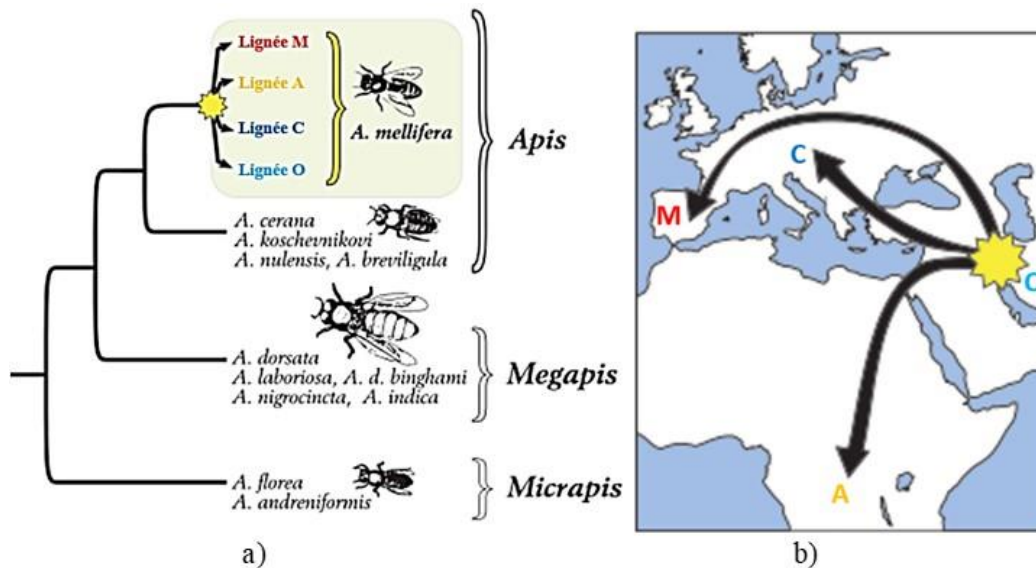


Figure I-1 : Histoire évolutive de l'abeille domestique. a) Phylogénie des trois clades du genre *Apis*. b) Hypothèse la plus probable concernant la colonisation de l'Europe par *A. mellifera* (d'après Han et al., 2012).

D'après des études morphométriques, génétiques, physiologiques et comportementales, les sous-espèces de l'abeille domestique se répartissent en quatre lignées évolutives : A (africaine), M (ouest-méditerranéenne), C (nord-méditerranéenne), O (Turquie et Caucase) (Magnus et al., 2014) (voir figure I-2). La lignée A correspond aux sous-espèces retrouvées en Afrique (*A. m. scutellata*, *A. m. capensis*), la lignée M aux sous-espèces d'Europe occidentale (l'abeille noire ou *A. m. mellifera* et à l'abeille ibérique, *A. m. iberiensis*), le groupe C aux sous-espèces vivant en Europe orientale (par exemple *A. m. carnica*, *A. m. ligustica*), et le groupe O inclut les sous-espèces présentes en Turquie et au Caucase (*A. m. caucasica*). Il est cependant à noter que certaines études ne font pas de distinction entre les groupes C et O (Han et al., 2012). Au total, on dénombre actuellement 26 sous-espèces (ou races) d'*A. mellifera* (Miguel et al., 2011).

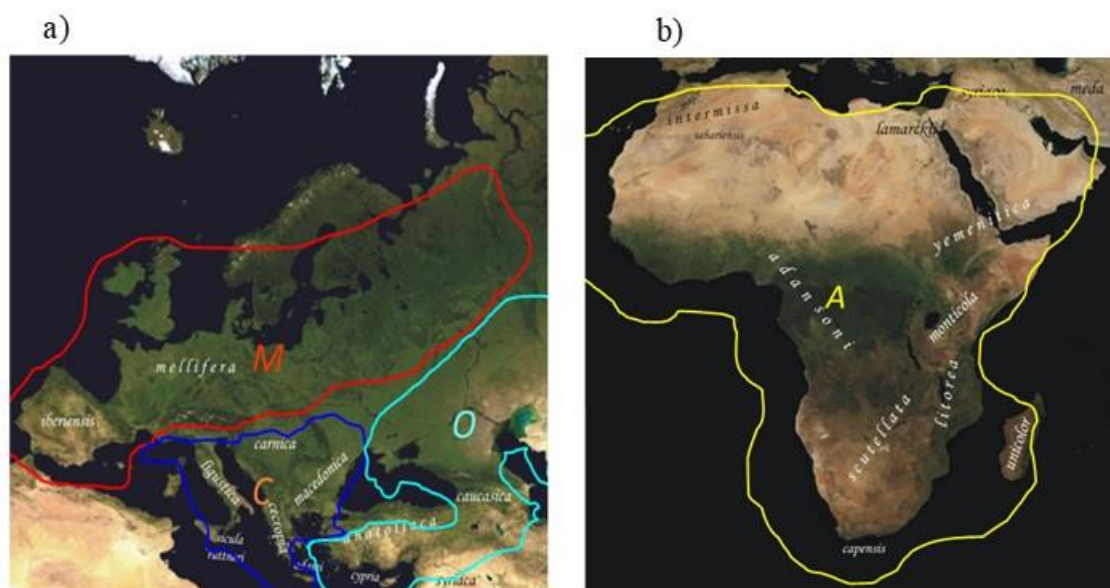


Figure I-2 : Répartition géographique actuelle des différentes sous-espèces d'*A. mellifera* en Europe (a) et en Afrique (b)

La colonisation de zones tempérées par les apoïdes a contraint *A. mellifera* à faire des provisions importantes en miel et en pollen durant les saisons chaudes, afin d'assurer la thermorégulation au sein des colonies durant l'hiver et la croissance de la population au printemps (Vidau et al.). Cette particularité est assurément à l'origine de la rencontre entre *A. mellifera* et l'Homme, il y a environ 15 000 ans (Crane, 1983). La plus ancienne trace de l'Homme à titre de destructeur de colonies d'*A. mellifera* pour récupérer le précieux nectar (c'est-à-dire le miel) a été trouvée dans le ravin de la Valltorta, près de Valence en Espagne, sur des peintures rupestres datant du Néolithique (Dams, 1978). La

domestication d'*A. mellifera* aurait débuté il y a environ 4 400 ans dans la civilisation égyptienne (Dams, 1978). Ainsi, des siècles durant, *A. mellifera* fut l'unique source de sucre et de cire pour l'homme, faisant d'elle le premier insecte, et l'un des rares, domestiqués par *Homo sapiens*. L'importance de ces abeilles dans la pollinisation et la production de différents produits (par exemple, le miel, la gelée royale, la cire) a mené à l'élevage et l'étude de ces insectes depuis au moins l'Antiquité en Occident et en Orient (Mackowiak, 2009). Par exemple, Aristote a décrit de manière précise dans son ouvrage zoologique intitulé *Histoire des Animaux* les différentes castes d'*A. mellifera* présentes au sein d'une colonie (Aristote, 1964). Ce n'est qu'en 1758 que Carl von Linné donna un nom à l'abeille domestique après avoir posé les bases de la nomenclature binomiale dans son ouvrage *Systema Naturæ* (Linnaeus, 1758). Ce nom, *Apis mellifera*, signifie « porte le miel » et fut modifié en *Apis mellifica*, « fabrique le miel », par Linné lui-même lorsqu'il se rendit compte que son premier choix était mal adapté (Mackowiak, 2009). Le second substantif proposé par Linné n'est cependant pas ou peu utilisé à cause du principe d'antériorité. L'ensemble de ces éléments a fait de l'apiculture une activité largement répandue à travers le monde, capable de s'adapter aux différents climats du globe et aux paysages.

En France notamment, il existe au moins cinq types d'apiculture différents :

- l'apiculture de montage, dans des paysages composés essentiellement de prairies, haies, bosquets et forêts
- l'apiculture méditerranéenne disposant de garrigues, maquis, forêts de chênes verts et de résineux
- l'apiculture en zone de grande culture
- l'apiculture de plaine dans des paysages très diversifiés (vallées, coteaux, collines...)
- l'apiculture urbaine dont le paysage est constitué principalement de bâtiments, parcs et jardins (Clément, 2010).

Chacun de ces paysages possède ses propres conditions biotiques et abiotiques auxquelles les sous-espèces et les populations d'*A. mellifera* sont plus ou moins adaptées.

1.3. Des populations d'*A. mellifera* en déclin

Cependant, depuis la fin du XX^e siècle, une importante surmortalité dans les colonies d'*A. mellifera* est observée dans les écosystèmes continentaux nord-américains, européens et japonais (vanEngelsdorp and Meixner, 2010). En Europe et aux États-Unis, le nombre de colonies a diminué respectivement de 27 % et 49 % entre 1961 et 2007 (vanEngelsdorp and Meixner, 2010). Dans d'autres

régions du monde moins anthropisées, telles l'Asie, l'Afrique et l'Amérique du Sud, les populations d'*A. mellifera* se sont largement renforcées (respectivement +426 %, +130 % et +83 %). Le cheptel apicole mondial a augmenté de 45 % durant les cinquante dernières années (Aizen and Harder, 2009).

Alors, pourquoi parle-t-on de déclin pour l'abeille domestique ? En réalité, cette idée est liée à un phénomène de surmortalité dans les colonies d'*A. mellifera* plutôt qu'à une diminution du nombre de colonies. C'est durant les années 1990 qu'a émergé en France l'inquiétude concernant le devenir des colonies d'*A. mellifera*. À la sortie de l'hiver et durant les miellées du printemps, les apiculteurs français découvraient des milliers de cadavres d'abeilles à l'entrée de leurs ruches. Les pertes de cheptel atteignaient 25 à 100 % selon les régions tandis que la mortalité naturelle devait se situer en deçà de 10 %.

En 2004, un autre phénomène a été constaté aux États-Unis, en Californie tout d'abord : de nombreuses colonies d'*A. mellifera* ont été retrouvées brusquement vidées de leurs habitantes à l'exception du couvain, de la reine et de quelques mâles, un effectif trop faible pour permettre la survie de la colonie à court terme. Les réserves de nourriture, miel comme pollen, étaient bien présentes, mais n'étaient curieusement pas pillées par les autres abeilles et n'ont été colonisées que très tardivement par les parasites (vanEngelsdorp et al., 2009). L'ensemble de ces symptômes est caractéristique d'un phénomène, appelé « syndrome de l'effondrement des colonies » (ou *colony collapse disorder*, CCD). Ce phénomène, à l'origine propre aux États-Unis, a récemment été repéré en Europe (Dainat et al., 2012a).

1.4. Les causes probables du déclin

1.4.1. Les pesticides

Historiquement, la première hypothèse proposée pour expliquer le déclin des colonies d'*A. mellifera* constaté depuis les années 1990 fut celle des produits phytosanitaires, en particulier des insecticides systémiques (autrement dit, qui se diffusent au travers de la plante via le système vasculaire). À la fin du XX^e siècle, la création de nouvelles familles d'insecticides aux propriétés systémiques (c'est-à-dire néonicotinoïdes et phénylpyrazoles) souleva de nouvelles inquiétudes, notamment concernant leur toxicité chronique. Par exemple l'imidaclopride, un néonicotinoïde, est 6 000 fois plus toxique en exposition chronique qu'en exposition aiguë (Suchail et al., 2001). Des études récentes ont démontré que lorsque l'abeille domestique subit des expositions chroniques de doses sublétales de

néonicotinoïdes, il en résulte une altération à la fois de ses capacités cognitives (par exemple, l'orientation et apprentissage) et motrices. Ces effets ont un impact négatif sur le butinage et, par conséquent, sur le stockage de réserves et la production de miel au sein des colonies (van der Sluijs et al., 2013). Par ailleurs, une exposition à des résidus d'un et/ou de plusieurs pesticides peut impacter la longévité des larves d'*A. mellifera* comme celle des adultes, réduire la santé de la colonie, accroître la sensibilité des individus aux agents pathogènes et augmenter la fécondité du varroa (Wu et al., 2011), un acarien parasite considéré comme le plus grand responsable du déclin des abeilles.

Ces insecticides systémiques sont beaucoup utilisés aux États-Unis sur tous types de champs, y compris ceux pollinisés par les abeilles (Quarles, 2008). Ils peuvent être appliqués sur les graines, les sols ou directement sur le feuillage des plantes. Or, les néonicotinoïdes et phénylpyrazoles diffèrent des insecticides classiques, car ils sont systémiques (transportés dans les différentes parties des plantes) (Trapp and Pussemier, 1991) et peuvent être par la suite détectés dans le pollen et le nectar en période de floraison (Cutler and Scott-Dupree, 2007). Ainsi, les abeilles peuvent subir une exposition chronique sur de longues périodes. En 2010, une étude a démontré la présence en moyenne de six résidus de pesticides par colonie suivie, certaines colonies en contenant jusqu'à trente-neuf (Mullin et al., 2010). De plus, les herbicides utilisés à proximité et/ou dans leurs habitats réduisent la diversité de leurs ressources alimentaires. Ils provoquent une diminution de la survie et de la reproduction des pollinisateurs. Par conséquent, compte tenu de l'effet synergique probable des mélanges de toxiques, les risques encourus par les colonies d'abeilles sont majeurs lors d'une exposition chronique à de faibles doses de pesticides placées en extérieur, ou à l'intérieur des colonies pour contrer des espèces nuisibles (Colin and Belzunces, 1992; van der Sluijs et al., 2013).

1.4.2. Les pathogènes

La seconde hypothèse proposée au début du XXI^e siècle pour expliquer le déclin des colonies concerne les pathogènes de l'abeille. En 2008, un rapport de l'Agence nationale de sécurité sanitaire (ANSES) a révélé la forte prévalence d'agents pathogènes dans les ruchers français en déclin et/ou décimés (Faucon et al., 2008). Ce constat avait été observé un an plus tôt aux États-Unis (Cox-Foster et al., 2007). Parmi ces pathogènes, les plus fréquemment incriminés sont les bactéries responsables de la loque américaine (*Paenibacillus larvae*) et la loque européenne (*Melissococcus plutonius* et *Paenibacillus alvei*), de nombreux virus à ARN simple brin positif, de l'ordre des picornavirales, et des champignons, notamment des microsporidies (comme *Nosema ceranae* et *Nosema apis*). Le plus incriminé reste

cependant le varroa (*Varroa destructor*). Cet acarien ectoparasite d'*A. mellifera*, introduit en Europe en 1970, se nourrit de l'hémolymphe des abeilles adultes et des larves operculées (Frazier et al., 2011) en se fixant sur les individus et en les piquant à travers la cuticule. Par ce procédé, les varroas contribuent à transmettre des virus et autres pathogènes d'une colonie d'*A. mellifera* à une autre (Potts et al., 2010). Ainsi, la présence des virus est étroitement corrélée à celle de *V. destructor*. Ainsi en France, la seule zone géographique non atteinte à ce jour par le varroa, l'île d'Ouessant en Bretagne, est dépourvue de virus d'abeilles (Tentcheva et al., 2004).

1.4.2.1. Les virus

Actuellement, 18 espèces de virus capables d'infecter *A. mellifera* sont connues (Aubert et al., 2008). La majorité de ces virus cause principalement des infections inapparentes, c'est-à-dire qu'ils peuvent avoir une forte prévalence dans les abeilles sans provoquer de symptômes à l'échelle de l'individu ou de la colonie. Généralement, les infections deviennent apparentes lorsque les virus sont présents dans la tête des abeilles, par opposition à l'intestin (Möckel et al., 2011). Ce phénomène s'opère notamment à cause du *V. destructor*, qui peut injecter des virus dans des zones qu'ils n'auraient pas pu atteindre autrement. Par ailleurs, le varroa peut avoir un effet d'activateur de réplication de ces virus puisqu'il injecte dans les abeilles un immunosuppresseur lorsqu'il les pique, permettant alors à l'ensemble des virus présents dans les abeilles de se multiplier plus facilement dans le corps de l'insecte (Yang and Cox-Foster, 2005). Parmi les virus infectant *A. mellifera*, six d'entre eux sont particulièrement connus et fréquemment étudiés car supposés responsables du CCD : l'ABPV (*Acute Bee Paralysis Virus*), le BQCV (*Black Queen Cell Virus*), le CBPV (*Chronic Bee Paralysis Virus*), l'IAPV (*Israeli Acute Paralysis Virus*), le KBV (*Kashmir Bee Virus*) et le DWV (*Deformed Wing Virus*). Ce dernier virus est particulièrement dangereux pour les abeilles puisqu'il peut provoquer des difformités de l'aile, empêchant les abeilles de voler, mais il peut également impacter leurs facultés d'apprentissage, leur espérance de vie et leur agressivité (Zheng et al., 2015). Par ailleurs, le virus CBPV cause des symptômes que beaucoup de chercheurs et d'apiculteurs confondent fréquemment avec ceux induits par l'exposition aiguë à un insecticide systémique (par exemple, un néonicotinoïde) : tremblement des abeilles sur la planche d'envol d'une ruche et/ou sur le sol près de celle-ci. Les modes d'infection du CBPV et des autres virus associés à l'abeille domestique sont à ce jour encore insuffisamment connus et étudiés.

1.4.2.2. Les microsporidies

Les microsporidies provoquent également des infections importantes dans les ruchers d'*A. mellifera* et sont présentes dans le monde entier. Deux espèces sont actuellement bien connues pour leurs effets sur les colonies d'*A. mellifera* : *Nosema apis* et *Nosema ceranae*. Les microsporidies sont des eucaryotes unicellulaires et des parasites intracellulaires obligatoires (Texier et al., 2010). Les abeilles adultes se contaminent en ingérant les spores de ces microsporidies. *N. ceranae* et *N. apis* effectuent ensuite leur cycle de développement dans les cellules épithéliales de l'intestin d'*A. mellifera*. En cas de forte contamination, *N. ceranae* et *N. apis* peuvent causer une maladie appelée nosémose, qui impacte les colonies d'*A. mellifera* en termes de force et de productivité (Fries, 1988; Higes et al., 2010). *N. ceranae* a été découverte chez l'abeille asiatique *A. ceranae* en 1996 (Fries, 1996). Sa présence chez *A. mellifera* n'a été décelée qu'en 2005, mais le transfert de cette microsporidie asiatique vers l'Europe remonterait à plus de 15 ans avant cette première détection (Invernizzi et al., 2009). La présence de *N. ceranae* dans les colonies européennes d'*A. mellifera* se traduit par de nombreuses perturbations physiologiques et comportementales. En effet, *N. ceranae* détourne les voies métaboliques, induisant un stress nutritionnel chez les abeilles qui s'affaiblissent (Mayack and Naug, 2009; Panek, 2015). Par ailleurs, la nosémose provoque une altération irréversible de l'épithélium et du péristaltisme de l'intestin (Panek, 2015). À l'échelle du comportement, les abeilles présentent des problèmes d'orientation en vol (Kralj and Fuchs, 2010) ainsi que des changements de transcrits impliqués dans la neurogenèse, mais également une diminution de ceux impliqués dans la perception sensorielle et les stimuli (Holt et al., 2013).

1.4.2.3. Les bactéries

Il existe également des bactéries responsables de graves maladies chez *A. mellifera*, telles que la loque américaine (*P. larvae*) et la loque européenne (*M. pluton* et *P. alvei*) qui sont des maladies présentes dans le monde entier (Bailey, 1983; Hansen and Brødsgaard, 1999). Bien que la loque européenne soit bien moins grave que la loque américaine, elle peut malgré tout induire un affaiblissement général des colonies d'*A. mellifera*. La loque américaine, quant à elle, provoque la mortalité directe des larves contaminées et peut se révéler létale pour la colonie toute entière. Le fort risque de contamination des ruches voisines par la loque américaine rend par ailleurs la signalisation des ruches infectées obligatoire et peut conduire à des procédures de combustion des ruches dans les cas les plus extrêmes (Genersch, 2010).

1.4.3. Les autres facteurs du déclin

Il existe d'autres organismes s'attaquant aux ruches et provoquant directement la mort des ouvrières et des faux-bourçons, à savoir leurs prédateurs. Ils sont variés, à commencer par les oiseaux (guêpier, bondrée apivore...), les renards et blaireaux, mais également les insectes tels que les frelons et les guêpes qui pénètrent dans les nids ou les ruches pour voler les larves (Morse and Nowogrodski, 1990). De nouveaux prédateurs ont également été signalés suite à leur importation en Europe, qu'elle soit illégale ou accidentelle (Breeze and Potts, 2012). C'est le cas par exemple du frelon asiatique *Vespa velutina* qui est devenu, depuis sa récente introduction en Europe, un prédateur majeur pour *A. mellifera* : l'attaque d'une ruche par plusieurs frelons asiatiques peut conduire à la mort de l'ensemble de la colonie (Monceau et al., 2014; Potts et al., 2010; vanEngelsdorp and Meixner, 2010). Plus récemment, un nouveau prédateur a été introduit en Europe et surnommé le petit coléoptère des ruches : *Aethina tumida*. Cet insecte de la famille des *Nitidulidae* est un parasite des sous-espèces africaines d'abeilles, qui a été introduit en France, en Australie et en Amérique du Nord par les déplacements humains (Mustafa et al., 2014; Neumann and Elzen, 2004). Les dommages causés aux ruches sont dus à la larve du coléoptère qui se nourrit du couvain, du pollen et du miel des ruches (Mustafa et al., 2014).

En plus des pesticides, parasites et prédateurs, les abeilles mellifères doivent également faire face à d'autres facteurs qui ne provoquent pas directement leur mort, mais participent à l'affaiblissement de leurs colonies. C'est le cas par exemple des sources de stress environnementales telles que la malnutrition, la pollution, le manque de vitalité et de diversité génétique (Neumann and Carreck, 2010; Potts et al., 2010). L'appauvrissement de la qualité de l'environnement est présenté comme une cause majeure du déclin général des pollinisateurs, incluant les colonies d'*A. mellifera*. L'urbanisation, la raréfaction des haies et des jachères fleuries, la monoculture ou encore les fauches précoces sont les perturbations les plus souvent citées pour illustrer cet appauvrissement de la qualité de l'environnement pour les pollinisateurs (Winfrey et al., 2009).

1.5. Un nouveau paradigme

Après plusieurs années à rechercher une cause unique au déclin des colonies d'*A. mellifera*, les chercheurs s'orientent aujourd'hui vers une origine multifactorielle (figure I-3). Une étude a démontré qu'une co-infection par *N. ceranae* et un virus de la famille des iridoviridae induisent des taux de mortalité plus élevés que chaque agent pris séparément (Bromenshenk et al., 2010). Une exposition croisée d'ouvrières d'*A. mellifera* à l'imidaclopride et à *N. ceranae* affaiblit considérablement les abeilles

et entraîne un taux de mortalité très important (Alaux et al., 2010). Cet effet « cocktail » mortel a été confirmé pour deux autres insecticides (le fipronil et le thiaclopride) lorsque des ouvrières d'*A. mellifera* parasitées par *N. ceranae* succombent à des doses sublétales d'insecticides, ce qui n'est pas le cas des abeilles saines (Aufauvre et al., 2012; Vidau et al., 2011b). Ainsi, suite à ces études, plusieurs scientifiques, notamment en France, privilégient la piste d'une interaction entre certains pesticides (insecticides néonicotinoïdes) et parasites (dont *N. ceranae*) pour expliquer le déclin d'*A. mellifera*.

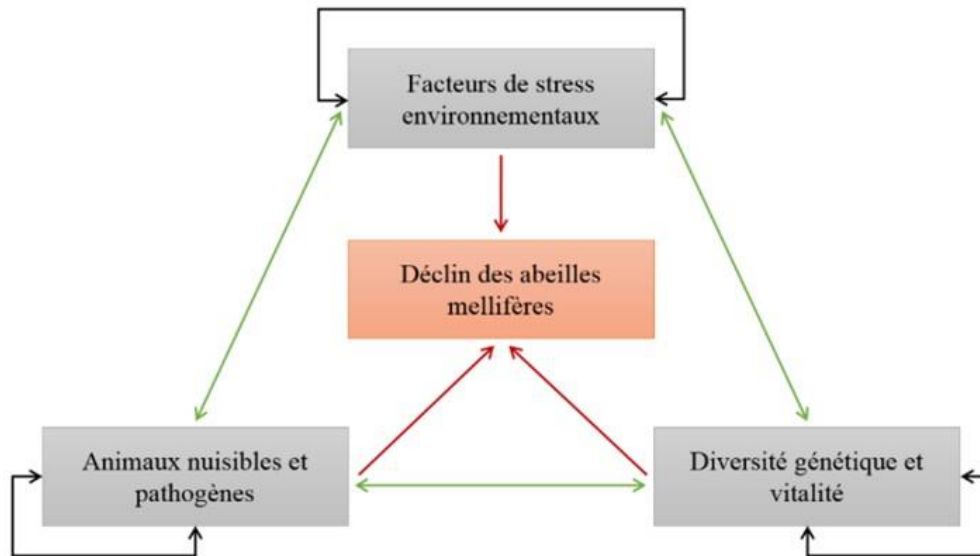


Figure I-3 : Interactions entre les divers facteurs responsables de la mortalité des abeilles. Les boîtes grises représentent les trois principaux groupes associés au déclin des abeilles ; les flèches rouges représentent les pressions directes sur les abeilles par ces facteurs ; les flèches vertes représentent les interactions entre ces facteurs et les flèches noires représentent les interactions entre les facteurs (d'après Potts et al., 2010).

En effet, la présence d'un xénobiotique (autrement dit, d'une substance étrangère à l'organisme) tel qu'un pesticide peut modifier l'impact d'un parasite sur son hôte : les effets peuvent être « additifs », « antagonistes » ou « synergiques » (Aufauvre et al., 2012, 2014). Dans le premier cas (c'est-à-dire « additif »), les effets du xénobiotique et du parasite s'additionnent simplement. Il y a « antagonisme » lorsque les deux facteurs en combinaison ont un effet moindre que la somme de leurs effets attendus, les deux effets pouvant s'annuler. Au contraire, lorsque la combinaison d'agents stressants a un effet plus important que celui auquel on aurait pu s'attendre en additionnant simplement chacun des agents, on parle de « synergie » (Holmstrup et al., 2010). C'est le cas de *N. ceranae* et du fipronil, un insecticide présent sur le marché depuis 1993 et largement utilisé pour traiter les champs de maïs (Aufauvre et al.,

2012, 2014). Seul, ce produit est un composé neurotoxique impactant la signalisation neuronale des ouvrières d'*A. mellifera* et pouvant mener à leur mort (Cole et al., 1993). Mais administré oralement à une dose sub létale (c'est-à-dire aux alentours de DL50/150) à une abeille déjà infectée par *N. ceranae*, il y a une action synergique insecticide/pathogène, menant à une augmentation considérable de la mortalité des abeilles (Aufauvre et al., 2012; Vidau et al., 2011b). Ainsi, bien que les pathogènes soient présents naturellement dans les colonies saines, les abeilles ont la capacité de faire face à ces infections par leur système immunitaire. Mais en cas d'exposition additionnelle avec des pesticides, y compris les résidus de produits utilisés pour le traitement contre le varroa (Pettis et al., 2013; Wu et al., 2012), ces insectes butineurs se trouvent incapables de résister à l'infection et les colonies d'*A. mellifera* peuvent alors succomber (voir figure I-4).

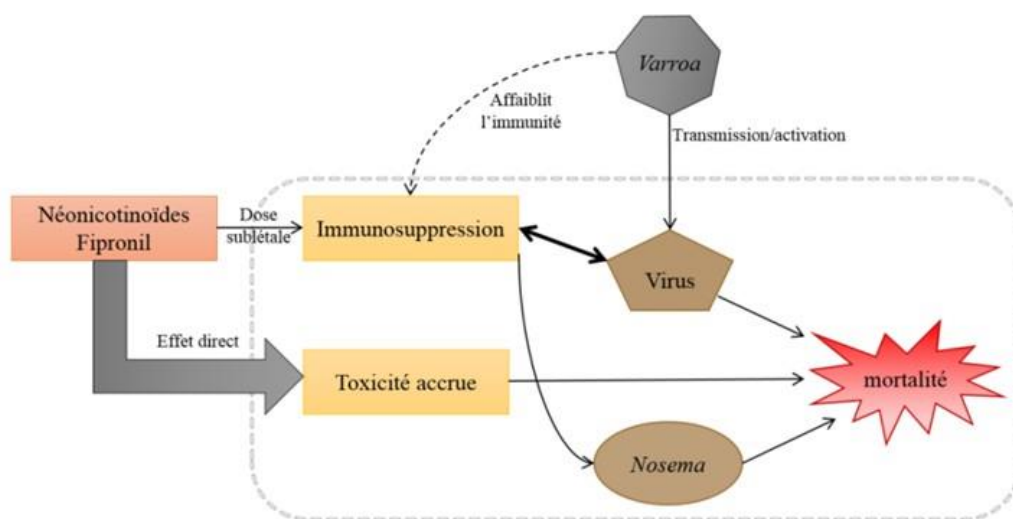


Figure I-4 : Interactions simplifiées entre certains pesticides et parasites en relation avec le déclin des colonies d'*A. mellifera*. Les abeilles (représentées par le rectangle en pointillés) sont exposées aux différents facteurs de stress. Les varroas provoquent une réplication virale et une immunosuppression qui peuvent faciliter les infections par d'autres pathogènes tels que les virus et Nosema. Cet effet est renforcé par une dose sub létale d'insecticides tels que les néonicotinoïdes et le fipronil, ce qui contribue à l'immunosuppression (d'après Sánchez-Bayo et al., 2016).

Afin de limiter les risques environnementaux et sanitaires, certains pesticides ont ainsi été interdits dans certains pays. Ils sont remplacés par des substances issues d'organismes de la biosphère, tels que

les plantes par exemple, jugées moins toxiques. Ainsi, des études sont réalisées pour remplacer, si possible, les acaricides de synthèse par des huiles essentielles. C'est ainsi que l'huile essentielle de thym a été proposée en tant qu'acaricide ciblant le varroa. Celle-ci contient une forte concentration de thymol et a une bonne activité acaricide (Damiani et al., 2009). Les abeilles domestiques sont donc beaucoup au contact de cet acaricide naturel qui est introduit en grandes quantités dans les ruches, notamment dans des formulations à base de thymol telles qu'Apilife Var®, Thymovar®, et Apiguard®. Mais il a été récemment démontré que le thymol, malgré son origine naturelle, a des conséquences sur *A. mellifera* en modifiant l'expression de son génome et en altérant certains de ses comportements (Boncristiani et al., 2012).

1.6. Les pratiques apicoles et le déclin des populations d'*A. mellifera*

En parallèle de tous les facteurs, les pratiques apicoles doivent également être prises en compte afin de comprendre l'effondrement des colonies. En effet, l'introduction de nouvelles espèces d'abeilles, issues d'autres zones géographiques, peut avoir un effet néfaste sur les sous-espèces européennes d'*A. mellifera* (Clément, 2010). Étant donné l'intérêt agronomique de l'abeille domestique, sa structure naturelle a été perturbée en Europe, et notamment en France, par l'introduction délibérée de reines et d'essaims issus de sous-espèces et d'hybrides non indigènes au territoire. Ce phénomène tend à homogénéiser la diversité génétique naturelle et par conséquent à mettre en danger de nombreuses sous-espèces de l'abeille domestique. La répartition naturelle des sous-espèces d'*A. mellifera* et la pureté des sous-espèces utilisées par les apiculteurs professionnels ont probablement été perturbées et affectées depuis plusieurs décennies :

- par les techniques usuelles d'apiculture
- par le commerce international des abeilles (par exemple, de colonies, de reines, de faux-bourçons)
- par les produits et stratégies utilisés pour tenter de freiner le déclin de l'abeille domestique

Par exemple, l'apiculture a favorisé la répartition de sous-espèces possédant des traits spécifiques apicoles, à l'extérieur de leur aire de répartition naturelle, généralement au détriment des autres sous-espèces. Ce phénomène a engendré une baisse de la diversité génétique nécessaire pour faire face à des parasites indigènes ou invasifs, introduits par les colonies d'*A. mellifera* commerciales telle la Buckfast® (en d'autres termes, une marque déposée d'une abeille domestique hybride issue de plusieurs sous-espèces) (Evans and Spivak, 2010; Shafer et al., 2009). De plus, le commerce européen et international de reines et de colonies a contribué et contribue toujours à la propagation de plusieurs

parasites (Villalobos, 2016; Wilfert et al., 2016). Un des exemples les plus documentés est celui du changement d'hôte du *Varroa jacobsoni*, qui a été transféré d'*A. cerana* à *A. mellifera* dans les années 1980. Tous ces facteurs anthropiques, biotiques et abiotiques, brièvement résumés dans ces dernières lignes, impactent la biologie d'*A. mellifera*, et différentes combinaisons de ces facteurs sont probablement impliquées dans les pertes importantes de colonies observées dans le monde (Potts et al., 2010; vanEngelsdorp and Meixner, 2010; Wilfert et al., 2016).

1.7. Conclusion

Comment sortir de cette crise en apiculture ? Le déclin des colonies d'*A. mellifera* peut-il être freiné ? Il n'existe pas de solution unique ; pour chaque paysage, chaque continent et chaque pays, plusieurs solutions impliquant différents acteurs travaillant en « synergie » (un service de l'état, des élus et des décideurs locaux et nationaux, des éducateurs, des citoyens, des agriculteurs et des apiculteurs) peuvent être mises en place pour contrer le déclin des colonies d'*A. mellifera*, mais aussi contribuer à la survie de tous les pollinisateurs. Ainsi, les solutions choisies en Europe ne seront pas nécessairement adaptées pour l'Amérique du Nord car l'histoire évolutive d'*A. mellifera* a débuté et se poursuit en Europe, tandis que l'abeille domestique a été introduite en Amérique lors de la colonisation des États-Unis et du Canada. Cependant, une utilisation raisonnée ou l'arrêt de l'utilisation des insecticides néonicotinoïdes dans les écosystèmes de tous les pays devrait être favorable à l'atténuation des risques de synergie entre les résidus de pesticides, les pesticides et les pathogènes. Des efforts sur le développement de nouveaux produits pour contrer les parasites d'*A. mellifera*, qui comme le varroa, sont devenus résistants à plusieurs traitements, devront être entrepris. Une procédure d'évaluation des produits phytosanitaires prenant en compte les dernières avancées dans le domaine de la toxicologie devra également être envisagée, et proposée aux législateurs nationaux et internationaux.

Repenser l'agriculture à long terme est également une solution à laquelle l'Homme sera confronté au XXI^e siècle, une grande partie des problèmes écosystémiques et climatiques étant causée par l'agriculture intensive et l'utilisation excessive de la monoculture. La filière apicole doit s'assurer d'avoir aussi des approches qui favoriseront l'apiculture durable : par exemple éviter les importations d'essaims et de reines, contrer l'utilisation excessive de traitements sanitaires au sein des colonies d'*A. mellifera* et favoriser l'utilisation de sous-espèces et/ou de populations d'abeilles adaptées à leur environnement local. Finalement, à court terme, la mise en place et l'union de conservatoires nationaux et internationaux permettront de préserver et valoriser le patrimoine des sous-espèces d'*A.*

mellifera. Ils seront nécessaires et pertinents pour le maintien du service écosystémique assuré par l'abeille domestique, à savoir la pollinisation. Ainsi, il sera possible de constituer une réserve de diversité génétique adaptée aux différents habitats qui sera utilisable par l'industrie apicole et les apiculteurs. Ces solutions à court et long terme sont désormais indispensables pour que l'Homme et l'abeille domestique puissent perpétuer leur aventure commune, entamée au Néolithique.

Remerciements

I.E. est financée par une bourse doctorale du Ministère de l'Éducation nationale de l'enseignement supérieur et de la recherche (France). La réflexion dans ce chapitre est issue du projet de recherche BEEHOPE financé *via* l'appel à projet européens communs 2013-2014 BiodivERsA/FACCE-JPI des agences de recherches de la France (ANR-14-EBID-0001), de l'Espagne (PCIN-2014-090) et du Portugal (BiodivERsA/0002/2014).

2. Les conservatoires, un réseau en plein développement

2.1. Les conservatoires en France

Suite à l'ensemble de ces constatations sur le déclin de l'abeille européenne et à l'effet qu'ont certaines pratiques apicoles occidentales telles que la transhumance ou l'importation excessive de reines, de nombreux acteurs de la protection des abeilles locales se sont regroupés pour former différents conservatoires. Ainsi, dans l'optique de promouvoir et de préserver l'abeille noire endémique de l'Europe de l'Ouest, la FEdCAN, ou Fédération européenne des Conservatoires de l'Abeille Noire (www.fedcan.org), a été créée en 2015 avec un cahier des charges à respecter par chaque conservatoire de la fédération. La FEdCAN a pour objectif de déployer des zones protégées dans lesquelles il n'y aurait pas les pratiques de transhumance et d'importation de races non natives. Ces zones devraient permettre aux populations de l'abeille européenne de s'adapter localement à leur habitat, et ainsi contribuer à l'amélioration de leur capacité de résistance aux conditions biotiques et abiotiques du milieu. A ce jour, onze conservatoires de l'abeille noire sont répertoriés en France. Ils sont situés sur l'île d'Ouessant, l'île de Groix, Belle-Île, ainsi que dans l'Orne, l'Île de France, l'Auvergne, l'Ardèche, la Savoie, les Cévennes, les Pyrénées et l'Hérault. De l'ensemble de ces conservatoires, seuls les trois premiers (i.e. les conservatoires localisés sur des îles) bénéficient à l'heure actuelle d'arrêtés municipaux et préfectoraux interdisant l'importation de ruchers autres que l'abeille endémique, *A. mellifera mellifera*, dans les communes. La FEdCAN continue ses démarches consultatives et juridiques avec des associations de citoyens, d'apiculteurs ainsi qu'avec des élus locaux,

nationaux et européens afin d'élargir ces arrêtés et d'y inclure l'ensemble des conservatoires, qui sont de plus en plus nombreux.

2.2. Le projet BioDIVERSA ERANET « BEEHOPE »

2.2.1. Naissance du projet

A ce jour, le dernier conservatoire ayant été officiellement créé en France est celui du CANEC (Conservatoire de l'Abeille Noire En Combrailles, www.canec.fr), situé en Auvergne avec son siège social à Pontaumur. Celui-ci a obtenu son statut d'association (loi 1901) en 2016 mais sa mise en place remonte au début de l'année 2015 dans le cadre du projet BEEHOPE, notamment avec le vote et le choix de ses statuts par les acteurs socio-économiques impliqués. Le projet BEEHOPE est un projet de recherche financé par le programme européen BioDIVERSA ERANET qui réunit six partenaires sur un axe nord-sud : le Laboratoire Evolution Génome Comportement et Ecologie (EGCE, UMR CNRS 9191) à Gif-Sur-Yvette, le Laboratoire Micro-organismes: Génome et Environnement (LMGE, UMR CNRS 6023) à Clermont-Ferrand, le Lycée Agricole des Combrailles à Pontaumur, le centre d'études biologiques de Chizé (UMR CNRS 7372) à Villiers-en-Bois, l'Université Basque d'Espagne à Bilbao et l'Institut Polytechnique de Bragança au Portugal. Ce partenariat a vu le jour en 2015 pour une durée de quatre ans.

2.2.2. Principe

L'une des ambitions du projet BEEHOPE est d'ouvrir le dialogue et mettre en place l'union de conservatoires. BEEHOPE a aussi pour vocation de créer une dynamique entre les citoyens, les apiculteurs, les élus, les scientifiques et les formateurs intra- et inter- conservatoires. A moyen et long terme, le projet BEEHOPE vise à contribuer à la mise en place et l'union de conservatoires nationaux et européens qui ont pour objectifs principaux de : (i) caractériser la diversité génétique et éco-éthologique des abeilles de la lignée évolutive M (l'abeille noire *A. m. mellifera* et l'abeille ibérique *A. m. iberiensis*), (ii) protéger et préserver la diversité génétique des populations de cette lignée évolutive, (iii) constituer une réserve de diversité utilisable par l'industrie apicole et les apiculteurs, (iv) étudier l'impact des colonies d'abeille mellifère domestiquées dans l'entretien de la diversité floristique locale et (v) pouvoir employer l'abeille comme bio-collecteur et comme indicateur biologique de qualité environnementale.

Pour cela, le projet BEEHOPE s'est articulé en quatre axes concrets d'études bien distinctes, à savoir (i) l'analyse génétique (i.e. ADNmt et ADNn) des colonies des conservatoires localisés le long du gradient du sud du Portugal au nord de la France afin de déterminer le niveau d'introgression par d'autres lignées évolutives d'*A. mellifera*, (ii) le suivi éco-éthologique de ces colonies, (iii) le suivi spatio-temporel du microbiote des abeilles et (iv) le développement de programmes de promotion assorti d'une importante communication auprès des apiculteurs sur l'importance de l'utilisation de colonies de la lignée évolutive M adaptées localement à leurs habitats situés dans leur aire de distribution naturelle.

3. Problématiques

Les objectifs de ma thèse découlent directement des quatre axes d'études mentionnés ci-dessus, puisque mon sujet regroupe les trois premiers axes. En effet, ma mission était de réaliser un suivi spatio-temporel du microbiote des colonies d'*A. m. mellifera* et *A. m. iberiensis*, le long d'un gradient allant du sud du Portugal au nord de la France, afin d'identifier les micro-organismes présents dans les conservatoires concernés, et de comprendre quelles relations lient la présence de ces communautés avec les facteurs éco-éthologiques, biotiques et abiotiques relevés sur les différentes ruches.

Dans un premier temps, le chapitre II de ce travail de recherche présente de façon détaillée les installations réalisées dans les colonies d'abeilles suivies, ainsi que les protocoles ayant servi aux analyses. Ce chapitre est un élément essentiel permettant d'avoir une vue d'ensemble du travail réalisé et de mieux comprendre l'organisation des conservatoires.

Par la suite, afin de pouvoir confronter l'ensemble des facteurs et des données récoltées, une étape a consisté en l'étude de la capacité de régulation de l'humidité dans une ruche par un essaim (i.e. superorganisme) au quotidien, mais également à l'échelle saisonnière et annuelle. Le manque d'humidité est un facteur limitant pour la croissance des colonies d'abeilles mellifères, mais qui peut, en excès, favoriser le développement de pathogènes tels que les champignons par exemple. Les recherches réalisées sur les insectes solitaires et sociaux (ex. : fourmis, termites, abeilles apoïdes et mellifères) sont nombreuses concernant la thermorégulation, mais il y en a très peu pour l'hygrorégulation. C'est donc le sujet d'une publication intégrant le chapitre III de ma thèse, soumise à un journal scientifique à comité de lecture. Par la suite, l'étude spatio-temporelle du microbiote de la lignée évolutive M (i.e. l'abeille noire et l'abeille ibérique) s'est déroulée en deux étapes : une recherche

exploratoire (i.e. virus à ADN, bactéries), et une recherche ciblée qualitative (i.e. virus à ARN, bactéries, microsporidies).

Le chapitre IV concerne la recherche de virus à ADN, réalisée à l'aide de la cytométrie en flux. La variation spatio-temporelle des charges virales contenues d'une part dans la tête, et d'autre part dans l'intestin des abeilles a été analysée afin de comprendre quel facteur l'influence le plus : l'emplacement géographique ou le temps. Cette étude a fait l'objet d'une publication en préparation de soumission à un journal scientifique à titre de « short communication ».

Enfin, le chapitre V répond à la problématique en s'intéressant aux bactéries. Dans cette étude, une analyse métagénomique a été réalisée sur les intestins d'abeilles afin d'identifier les communautés bactériennes présentes dans chacun des conservatoires de BEEHOPE. Dans un second temps, différents paramètres biogéographiques, génétiques et temporels ont été relevés et analysés afin de déterminer lequel de ces paramètres avait eu le plus d'influence sur ces communautés de bactéries. Cette étude a permis la réalisation d'une publication en préparation de soumission à un journal scientifique à comité de lecture.

Chapitre II : Matériel et méthode

1. Sur le terrain

1.1. Organisation des conservatoires de BEEHOPE

Les sites d'études participant à l'analyse sont au nombre de sept, et sont situés dans la zone sanctuaire de six conservatoires de la lignée évolutive M (figure II-1) :

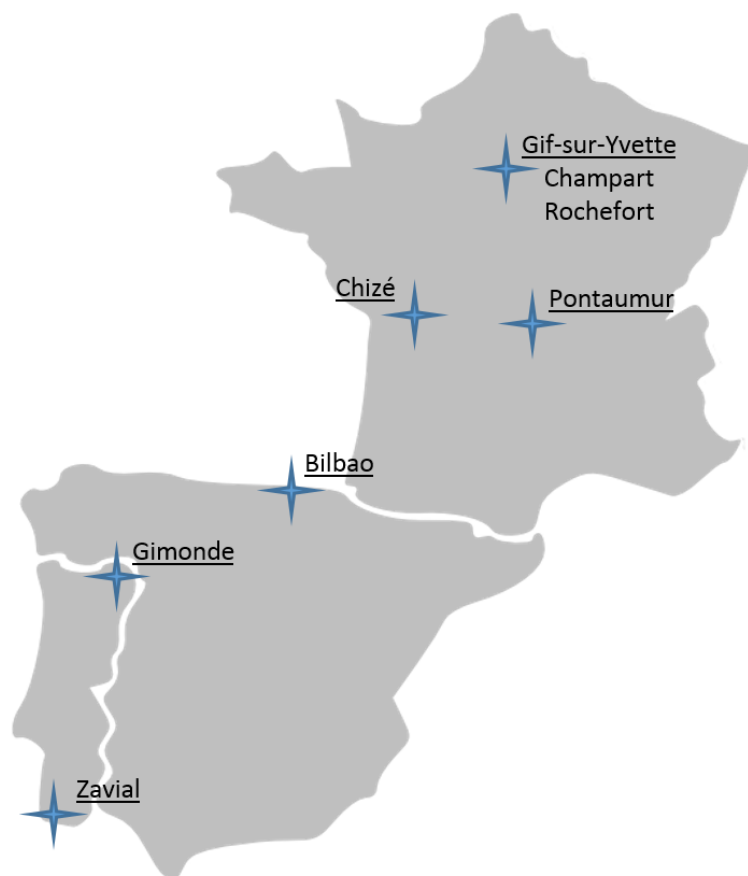


Figure II-1 : Répartition des six conservatoires participant au projet BEEHOPE

- Les sites de Rocheport et Champart sont situés dans le CANIF, et rattachés au laboratoire Evolution Génome Comportement et Ecologie (EGCE, UMR CNRS 9191) de Gif-Sur-Yvette. Respectivement, de par l'environnement proche de ces ruchers, ils correspondent à une apiculture dite « de forêt » et « de grande culture ».
- Le site de Pontaumur est situé dans le CANEC, en Auvergne, et est rattaché au Laboratoire Microorganismes, Génome et Environnement (LMGE, UMR CNRS 6023), en partenariat avec le

lycée Agricole des Combrailles à St-Gervais d'Auvergne. Il correspond à une apiculture dite « de montagne ».

- Le site de Chizé est situé dans le conservatoire du centre d'études biologiques de Chizé du CNRS (UMR CNRS 7372) à Villiers-en-Bois et appartient à la catégorie d'apiculture « de plaine ».
- Le site de Bilbao est dans un conservatoire géré par l'Université Basque d'Espagne et a été associé à une apiculture « de montagne ».
- Les sites de Gimonde et Zavial sont situés dans deux conservatoires, le premier au nord du Portugal et le second au sud. Ceux-ci sont sous la gestion de l'Institut Polytechnique de Bragança et correspondent à une apiculture « de montagne » pour Gimonde et « de plaine » pour Zavial.

Chacun des conservatoires est constitué d'une zone sanctuaire d'environ 6 km de diamètre, entourée de deux zones tampons de 4 km de rayon supplémentaire, soit un diamètre total de 22 km pour une surface totale moyenne d'environ 380 km². Ces zones tampons ont pour objectif de limiter l'accouplement des reines natives du conservatoire avec des mâles issus de ruchers extérieurs. Au sein de chaque conservatoire, six ruches appartenant au même rucher ont été choisies afin de participer aux analyses du projet BEEHOPE. Considérant les sept sites d'études, c'est donc sur un total de quarante-deux ruches que reposent toutes les analyses réalisées dans le cadre de mon doctorat.

1.2. Collecte des données

Le protocole utilisé dans le cadre de ma thèse et du projet BEEHOPE a pour objectif la collecte d'un maximum de données sur chacune des quarante-deux ruches concernées. Ce protocole inclut la pesée et la récolte du pollen, des prélèvements d'abeilles, l'évaluation de la taille du couvain, la collecte du microbiote dans les alvéoles, le relevé de la température ainsi que de l'humidité dans les ruches et en dehors de celles-ci, la pluviométrie et la vitesse du vent à proximité des ruches, la masse quotidienne des ruches et le comptage de varroas. Toutes les données récoltées n'ayant pas été exploitées à ce jour, je ne développerai ici que celles qui ont été utilisées dans le cadre de ma thèse. Par ailleurs, les données n'ont pas été récoltées sur toute la durée du projet, en raison de certaines contraintes financières et humaines, ainsi que la mort de certaines colonies suivies, à savoir les colonies 1 et 4 du site de Chizé, dont les données n'ont pu être collectées que jusqu'à juillet 2016.

1.2.1. Température et humidité

La température et l'humidité relative (HR) ont été mesurées à l'aide de trois thermo-hygro-boutons par ruche. Ces capteurs ont été répartis dans la colonie entre les cadres : les thermo-hygro-boutons A et C aux extrémités de la ruche, entre les deux derniers cadres, et le thermo-hygro-bouton B au centre, approximativement dans la zone du couvain. Chacun d'eux était suspendu entre deux cadres grâce à un fil de fer (figure II-2).



Figure II-2 : Présentation du système d'attache des thermo-hygro-boutons sur les cadres (à gauche) et leur répartition dans la ruche (à droite). Chacune des ruches monitorées avait trois thermo-hygro-boutons : deux aux extrémités (A et C), et un au centre (B).

Un thermo-hygro-bouton a également été placé dans chaque rucher, à proximité des ruches surveillées, afin de collecter selon la même fréquence les données à l'extérieur des ruches. Les capteurs collectaient la température et l'humidité relative toutes les heures avec une précision respective de $\pm 0,1^\circ \text{C}$ et $\pm 1\% \text{HR}$. Les données ont été collectées approximativement tous les trimestres, en fonction de la météo, grâce à un lecteur (Plug et Track, Progues PLUS) et exportées au format Excel sur ordinateur avec le logiciel Thermotrack PC V.7. En parallèle, la pluviométrie journalière a été collectée chaque jour à 2h, 8h, 14h et 20h par une petite station météo (Micro El d.o.o., Zagreb) placée dans chaque rucher monitoré.

1.2.2. Prélèvement d'abeilles

Les analyses de microbiote et de génétique nécessitant des abeilles, celles-ci ont été collectées chaque mois lorsque la météo le permettait, de 2015 à 2017. Les abeilles utilisées ici ont été collectées directement sur les cadres des ruches, au mois de juillet, d'août et de septembre 2016. Le prélèvement

a été réalisé à l'aide d'un tube Falcon de 50 mL, l'objectif étant de récolter environ 80 ouvrières au centre de la ruche. Les tubes ont ensuite été congelés à -80°C avant les analyses en laboratoire.

2. Au laboratoire

2.1. Approches exploratoires

2.1.1. Cytométrie en flux

La cytométrie en flux est une technique permettant de faire défiler des particules, molécules ou cellules à grande vitesse dans un capillaire devant le faisceau d'un laser qui va exciter un marqueur préalablement ajouté à l'échantillon, par exemple le SYBR-Green1, qui est un fluorophore fonctionnant comme un intercalant de l'ADN (Macey, 2007). Ce marqueur va ensuite fluorescer à une longueur d'onde connue, interceptée par des capteurs spécifiques. Le cytomètre va ainsi compter le nombre d'événements de fluorescence, et en déterminer la taille (plus l'intensité de fluorescence est forte, plus il y a d'ADN dans l'échantillon observé). Il peut également déterminer par exemple la complexité cellulaire, en observant la déviation du faisceau laser par les membranes ou organites à l'intérieur de ces particules.

La cytométrie en flux permet donc une estimation quantitative de la concentration en virus libres des échantillons. Cette technique est utilisée en routine dans le laboratoire d'accueil, le LMGE, pour l'analyse d'échantillons d'eau. Par ailleurs, un protocole pour l'analyse d'échantillons biologiques humains a été développé dans le cadre de l'étude de la maladie de Crohn (Lepage et al., 2008). La cytométrie en flux est un outil qui est particulièrement utilisé dans le domaine de la biologie cellulaire, notamment en hématologie, cancérologie, immunologie ou encore dans l'étude du cycle cellulaire (Melamed, 2001). Ainsi, nous avons choisi d'utiliser cet outil car il permettait une quantification de certains virus. En effet, la PCR apporte une information sur les virus connus, tandis que la cytométrie en flux permet une quantification des virus en général, qu'ils soient connus ou non. Cependant, cette quantification a été limitée aux virus à ADN par le choix du fluorochrome, ainsi que par la taille des virus à ARN, qui sont trop petits pour se distinguer des débris de tissus d'abeilles présents dans les échantillons analysés.

La littérature ne présentait aucun protocole visant à quantifier les virus des insectes par cytométrie en flux. Nous avons donc choisi de mettre au point un protocole en s'appuyant sur celui développé

au sein de notre laboratoire par Lepage et al. (2008). Deux compartiments ont été choisis pour cette analyse : la tête et l'intestin. En effet, lorsqu'ils infectent les abeilles, les virus sont détectables dans au moins l'un de ces deux compartiments, parfois même les deux pour certains virus (Aubert et al., 2011). Les abeilles ont été disséquées et leurs têtes et intestins ont été regroupés afin de faire des lots de neuf intestins ou neuf têtes par condition. Trois répétitions ont été faites par condition, et placées dans des tubes avec 150 µl d'eau MilliQ, 4% de PFA et du Tris-EDTA jusqu'à atteindre 3 mL. Les têtes ont été écrasées avec un Potter avant d'être mélangées au vortex pendant une heure et traitées aux ultrasons 3 fois 30 s dans la glace, avec une pause de 30 s entre chaque sonication. Ensuite, les tubes ont été centrifugés à 10 000 g pendant 10 min. et le surnageant a été introduit dans un tube Eppendorf avec 2% de PFA. Avant l'analyse par cytométrie, 1, 2 ou 20 µl de l'échantillon, en fonction de la concentration, ont été mélangés avec 1X SYBR Green et 1X Tris-EDTA. Le mélange a été placé 5 min. dans l'obscurité, puis chauffé à 80 °C pendant 10 min. avant la quantification avec FACSCalibur (Becton Dickinson, Franklin Lake, USA). Ce protocole a été développé dans le chapitre IV de ce manuscrit.

2.1.2. Métagénomique (ARNr 16S)

Suite au séquençage du premier génome bactérien en 1977 par Sanger (Sanger et al., 1977), des améliorations techniques considérables ont permis l'émergence de nouvelles technologies de séquençage (NTS) dites « à haut débit ». C'est ainsi que sont nés plusieurs modèles de séquenceurs plus compacts, parmi lesquels Illumina (Heather and Chain, 2016). Le faible coût de l'analyse et sa rapidité rendent le système Illumina particulièrement adapté à l'étude du microbiote intestinal des abeilles mellifères.

Afin de pouvoir réaliser cette analyse, les ouvrières collectées, sur des cadres à couvain au centre des quarante-deux ruches de l'étude, ont été disséquées à raison de trois répétitions de neuf abeilles par ruche. Afin d'avoir une étude spatio-temporelle du microbiote intestinal, l'opération a été réalisée sur des ouvrières prélevées en juillet, août et septembre 2016. Leur intestin a été tiré hors de l'abdomen à l'aide d'une pince fine, et chaque lot de neuf intestins a été broyé au potter Tenbroek dans du tampon phosphate selon les recommandations de l'ANSES (2016) pour obtenir du clarifiat en vue de faire des PCR. En effet, le clarifiat obtenu a été immédiatement divisé en deux, une partie étant destinée aux analyses PCR et l'autre aux analyses métagénomiques (i.e. ARNr 16s). Ainsi, ces deux analyses ont été réalisées à partir des mêmes abeilles.

L'extraction d'ADN a été réalisée suivant le protocole du kit QIAamp DNA Mini Kit développé par Qiagen. Les échantillons ont ensuite été congelés à -20°C et envoyés en Espagne au département de génétique de l'Université Basque à Bilbao pour y être séquencés par Illumina MiSeq. Les données obtenues ont été analysées selon le protocole conseillé par l'équipe d'Engel et al. (2013), développé ici dans le chapitre V.

2.2. Approches ciblées

2.2.1. PCR et RT-PCR

La PCR, ou Polymerase Chain Reaction, est une technique d'amplification enzymatique qui possède l'avantage de permettre de cibler les organismes recherchés et de les détecter même en cas de très faible présence. Elle peut être faite de manière qualitative ou quantitative. Dans cette étude, pour des raisons de budgets limités, le choix a été fait de rechercher uniquement la présence des micro-organismes, sans les quantifier. Sept virus ont été ciblés dans cette analyse, BQCV, CBPV, DWV, KBV, IAPB et SBV. Ces sept virus ont été choisis en raison de leur impact vérifié ou présumé sur le déclin des abeilles mellifères observé à travers le monde (McMenamin and Genersch, 2015). Les bactéries responsables de la loque américaine (*Paenibacillus larvae*) et de la loque européenne (*Melissococcus plutonius* et *Paenibacillus alvei*) ainsi que deux microsporidies (*Nosema apis* et *N. ceranae*) ont également été recherchées lors de ces analyses par PCR.

Les PCR ont été réalisées directement à partir des mêmes clarifiats préparés pour l'analyse des intestins par métagénomique (ARNr 16S), et un protocole identique a été appliqué aux têtes des mêmes abeilles. Ainsi, les PCR et RT-PCR ont toutes été réalisées sur les deux compartiments des abeilles. Les virus recherchés étant tous constitués d'ARN, l'extraction a été faite à l'aide du kit QIAamp Viral RNA Mini Kit pour les virus, tandis que l'extraction d'ADN pour les bactéries et microsporidies a été faite à l'aide du kit QIAamp DNA Mini Kit.

La rétro-transcription a été réalisée pour les virus à l'aide de kits iScript cDNA Synthesis kit (BIORAD). La PCR a été réalisée avec le kit Dream Taq Hot Start Green PCR Master Mix (Thermofisher) en utilisant un cycle long (i.e. 3 min. à 95°C, 40 cycles de 30 sec. à 95 °C + 30 sec. à température mère +1 min. à 72°C et pour finir 15 min. à 72°C) et une température mère de 55°C. Les témoins positifs ont été fournis par l'ANSES de Sophia-Antipolis, ainsi que les séquences des amorces utilisées pour chaque pathogène, décrites dans le tableau II-1.

Tableau II-1 : Description des pathogènes recherchés par RT-PCR (virus) et PCR (bactéries, microsporidies) ainsi que des amorces utilisées pour les cibler.

<i>Pathogène</i>	<i>Classification</i>	<i>Transmission</i>	<i>Amorces de PCR utilisées</i>	
			<i>Nom</i>	<i>Séquence</i>
Virus de la paralysie aiguë ABPV	Dicistroviridae	Horizontale, Verticale	ABPV 3	5'-CAT ATT GGC GAG CCA CTA TG-3'
			ABPV 4	5'-CCA CTT CCA CAC AAC TAT CG-3'
Virus de la cellule royale noire BQCV	Dicistroviridae	Horizontale	BQCV 3	5'-GGT GCA AGT CTC TTC CTA G-3'
			BQCV 4	5'-AAT AAC CTG AAA GGC CAA GAG-3'
Virus de la paralysie chronique CBPV	/	Horizontale	CBPV1-1	5'-TCA GAC ACC GAA TCT GAT TAT TG-3'
			CBPV1-2	5'-ACT ACT AGA AAC TCG TCG CTT CG-3'
Virus des ailes déformées DWV	Iflavirus	Horizontale, Verticale	DWV 3	5'-GGT CCG CGG CTA AGA TTG TA-3'
			DWV 4	5'-CGG CTG TTT GAT GGA AGA AGT T-3'
Virus Israélien de la paralysie aiguë IAPV	Dicistroviridae	Horizontale, Verticale	IAPV 3	5'-CGA TGA ACA ACG GAA GGT TT-3'
			IAPV 4	5'-ATC GGCT AAG GGG TTT GTT T-3'
Virus du Cachemire KBV	Dicistroviridae	Horizontale, Verticale	KBV 6f	5'-TAT GCT GAA CAA CGC AAA GA-3'
			KBV 6r	5'-ACA ACA CGA TGT CTG GGT TT-3'
Virus du couvain sacciforme SBV	Iflavirus	Horizontale	SBV 1	5'-ACC AAC CGA TTC CTC AGT AG-3'
			SBV 2	5'-CCT TGG AAC TCT GCT GTG TA-3'
<i>Melissococcus plutonius</i> Loque européenne	Gram +	Horizontale	EFB 1 (EFB-F)	5'-GAA GAG GAG TTA AAA GGC GC-3'
			EFB 2 (EFB-R)	5'-TTA TCT CTA AGG CGT TCA AAG G-3'
<i>Paenibacillus larvae</i> Loque américaine	Gram +	Horizontale	AFB 3 (AFB-F)	5'-CCT GTG TTT CTT TCG GGA GAC GCC A-3'
			AFB 4 (AFB-R)	5'-TCT TAG AGT GCC CAC CTC TGC G-3'
<i>Nosema apis</i>	Microsporidies	Horizontale	321 APIS FOR	5'-GGG GGC ATG TCT TTG ACG TAC TAT GTA-3'
			321 APIS REV	5'-GGG GGG CGT TTA AAA TGT GAA ACA ACT ATG-3'
<i>Nosema ceranae</i>	Microsporidies	Horizontale	218 MITOC FOR	5'-CGG CGA CGAT GTG ATA TGA AAA TAT TAA- 3'
			218 MITOC REV	5'-CCC GGT CAT TCT CAA ACA AAA AAC CG-3'

2.2.2. Bilan des analyses en laboratoire

Pour l'analyse métagénomique du microbiote intestinal (ARNr 16s), seuls les intestins ont été utilisés, contrairement à la RT-PCR et à la cytométrie en flux où les têtes ont également été utilisées. Par ailleurs, les intestins utilisés pour la RT-PCR et la métagénomique proviennent des mêmes abeilles (figure II-3).

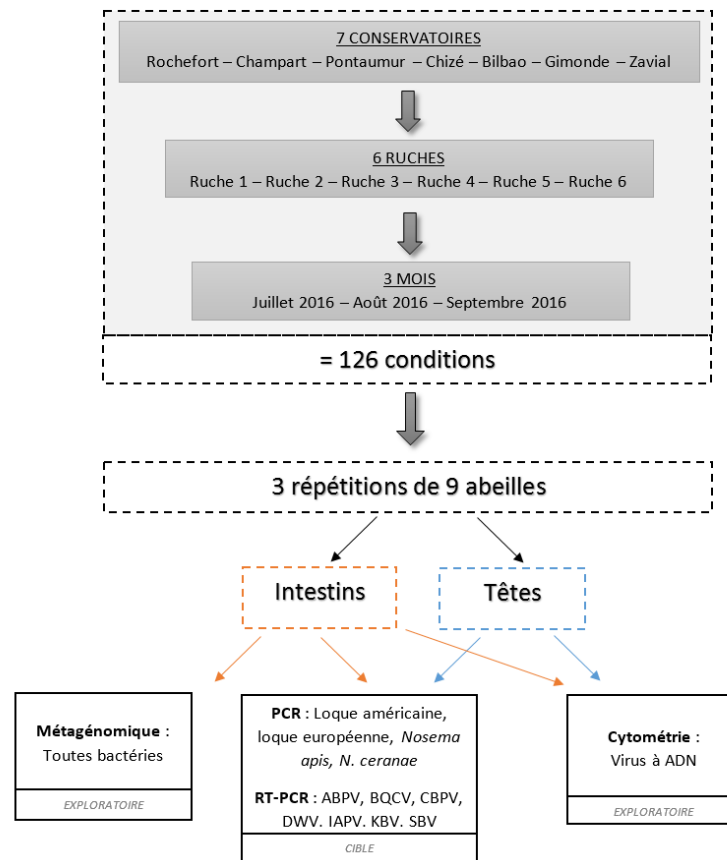


Figure II-3 : Bilan récapitulatif des conditions utilisées pour les analyses en laboratoire.

2.3. Analyses génétiques de l'ADN mitochondrial (lignée évolutive des colonies)

Les analyses génétiques des colonies ont été réalisées par le laboratoire Evolution, Génomes, Comportement, Ecologie (EGCE, UMR CNRS 9191) de Gif-sur-Yvette, et dirigées par le Dr. Lionel Garnery. Deux types de marqueurs moléculaires complémentaires sont utilisés pour étudier la diversité et la structuration génétique de la population : l'ADN mitochondrial (région intergénique COI-COII) permet de déterminer l'origine maternelle des colonies (lignée évolutive des colonies), et l'ADN nucléaire (13 locus microsatellites) permet de déterminer les niveaux d'introgression par d'autres lignées évolutives dans la population d'abeille étudiée.

Ces analyses ont été réalisées sur une abeille par colonie, prélevée en 2016 et envoyée dans de l'alcool à 96% à l'EGCE (UMR CNRS 9191). Puis les ADN totaux de chaque individu ont été extraits à partir de la tête de chaque abeille provenant de chacune des colonies échantillonnées. Les extractions ont été réalisées en utilisant la méthode du chelex de (Walsh et al., 1991), modifiées par (Garnery et al., 1995). Après dissection, chaque tête est broyée individuellement dans 600 µl de solution Chelex à 10%. Les protéines sont éliminées par un traitement à la protéinase K pendant 1h30 à 50 °c. Puis la protéinase est dégradée par chauffage des tubes à 95°C pendant 15 min. Cette dernière opération est répétée deux fois. Les tubes d'extraction sont ensuite centrifugés pendant 10 min. à 12 000 rpm et stockés à -20°C avant leur utilisation pour l'amplification d'ADN. Cette méthode permet de garder le maximum d'ADN en particulier lorsque l'échantillon à amplifier n'en contient que peu. Ces ADN extraits sont utilisés aussi bien pour caractériser la diversité mitochondriale que la diversité nucléaire.

2.3.1. Analyse de l'ADN mitochondrial

L'ADN mitochondrial est une molécule circulaire contenue dans les mitochondries des cellules. Contrairement à l'ADN nucléaire, la transmission de cette molécule est uniquement maternelle. Chez l'abeille domestique, l'ADN mitochondrial a donc un très fort pouvoir de marqueur de colonie puisque toutes les ouvrières d'une même colonie ont la même mère. Ainsi, l'étude d'une seule abeille suffit à caractériser la colonie. La transmission maternelle de la molécule en fait un marqueur particulièrement adapté à la détermination de l'origine maternelle d'une colonie et par conséquent de l'origine maternelle de la reine.

L'utilisation de l'ADN mitochondrial est basée sur le test COI–COII (Garnery et al., 1993). Un fragment de restriction présentant une variabilité de longueur en fonction de l'origine des lignées évolutives M (Ouest Méditerranéenne), A (Africaine), et C (Nord méditerranéenne) est utilisé en routine par notre équipe pour caractériser l'origine maternelle des colonies et déterminer aussi la diversité génétique observée au sein des lignées évolutives (i.e. haplotypes). Le test utilisé repose sur l'amplification de la région intergénique située entre les gènes des sous-unités I et II de la cytochrome oxydase, suivie de sa digestion par l'enzyme de restriction DraI. Ce test est particulièrement adapté aux estimations des introgressions maternelles dans une population étudiée (De La Rua et al., 1998; Franck et al., 1998, 2000; Garnery et al., 1995, 1998a).

2.3.2. Analyse de l'ADN nucléaire

Les marqueurs microsatellites sont des marqueurs à hérédité biparentale. Ils sont composés de séquences répétées pour lesquelles les formes alléliques sont liées au nombre de répétitions du motif, qui déterminent la taille de l'allèle. Chaque ouvrière (ou reine) possède deux allèles pour chaque locus, un provenant de la mère et l'autre provenant du père alors que les males sont haploïdes (issus d'œufs non fécondés) et ne comporteront donc que l'allèle d'origine maternelle. Les allèles peuvent être différents (l'abeille est alors qualifiée d'hétérozygote à ce locus), ou identiques (dans ce cas elle est homozygote à ce locus). La proportion d'hétérozygotes dans une population est un indice de la diversité génétique de la population.

Dans le cadre du projet BEEHOPE, 13 locus microsatellites (A124, A43, A88, A24, Ap33, A8, A113, Ap43, A7, A28, Ap55, Ap81 et Ap66) ont été utilisés. La plupart d'entre eux sont considérés comme particulièrement discriminants entre les lignées M et C (Garnery et al., 1998b). Le protocole d'amplification de ces locus utilise les conditions générales décrites par (Estoup et al., 1995), modifiées par (Garnery et al., 1998b). Dans le cadre de ma thèse, uniquement les données obtenues pour l'analyse de l'ADNmt ont été utilisées. Les analyses microsatellites sont en phase d'analyse et d'interprétation pour l'ensemble des conservatoires du projet BEEHOPE.

Chapitre III : Régulation de l'humidité dans la ruche

Cette étude est la première à avoir été réalisée dans le cadre de ma thèse. En effet, de nombreuses études montrent déjà l'efficacité des abeilles à réguler la température au sein de leur ruche. Mais à ce jour, très peu d'éléments venaient éclairer la question de l'humidité : les abeilles sont-elles capables de la réguler dans leur nid (ici, la ruche) ?

Le protocole mis en place dans le cadre de BEEHOPE avait un avantage certain pour répondre à cette question. En effet, de nombreux capteurs de température et d'humidité ont été installés dans les ruches, et constituaient un grand avantage puisqu'ils enregistraient la température et l'humidité en continu pendant trois mois, avant d'être saturés. Cela permettait de n'ouvrir les ruches qu'une fois tous les trois mois notamment en hiver, quand la régulation de la température est connue pour être difficile pour les abeilles, qui doivent maintenir leur nid à une température suffisamment élevée pour survivre. Ce dispositif nous a donc permis de récolter de nombreuses données en continu, sur plusieurs années. Pour cette publication, les données d'une année complète ont été analysées, de septembre 2015 à août 2016. Cette longue durée a permis de faire une étude à trois niveaux : journalier, saisonnier et annuel. Ainsi, nous sommes interrogés sur « la capacité d'un super organisme (i.e. une colonie d'abeilles) à réguler l'humidité dans son nid (i.e. "hypothèse d'hygrorégulation") », et étudier si la biogéographie, les saisons ou les sous-espèces sont des facteurs qui impactent cette capacité. L'article qui suit présente les résultats que nous avons obtenus sur ce sujet et les conclusions de ce travail.

Article 1:**Hygroregulation, a key ability for eusocial insects: Native Western European honeybees as a case study**

Iris Eouzan^{1,*}, Lionel Garnery^{2,3}, M. Alice Pinto⁴, Damien Delalande², Cátia J. Neves⁴, Francis Fabre¹, Jérôme Lesobre¹, Sylvie Houte⁵, Andone Estonba⁶, Iratxe Montes⁶, Télésphore Sime-Ngando¹, David G. Biron¹

¹Laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement, UMR CNRS 6023, Université Clermont-Auvergne, Campus Universitaire des Cézeaux, 1 Impasse Amélie Murat, Aubière cedex, France ; ²Laboratoire Evolution, Génomes et Spéciation, UMR CNRS 9191, Bâtiment 13, Avenue de la Terrasse, Gif-sur-Yvette, France ; ³ Saint Quentin en Yvelines, Université de Versailles, 45 Avenue des Etats-Unis, Versailles, France ; ⁴Centro de Investigação de Montanha (CIMO), Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Santa Apolónia, Bragança, Portugal ; ⁵Centre d'Etudes Biologique de Chizé, UMR CNRS 7372, Université de la Rochelle, Villiers-en-Bois, France ; ⁶Department of Genetics, Physical Anthropology and Animal Physiology, University of the Basque Country (UPV/EHU), Barrio Sarriena s/n, Leioa (Bizkaia), Spain

* Corresponding author.

E-mail: iris.eouzan@uca.fr (IE)

1. Abstract

Sociality has brought many advantages to various hymenoptera species, including their ability of regulating physical factors in their nest (e.g., temperature). Although less studied, humidity is known to be important for egg, larval and pupal development, and also for nectar concentration. Two subspecies of *Apis mellifera* of the M evolutionary lineage were used as models to test the ability of a superorganism (i.e. honeybee colony) to regulate the humidity in its nest (i.e. “hygroregulation hypothesis”) in four conservation centers: two in France (*A. m. mellifera*) and two in Portugal (*A. m. iberiensis*). We investigated the ability of both subspecies to regulate the humidity in hives daily, but also during the seasons for one complete year. Our data and statistical analysis demonstrated the capacity of the bees to regulate humidity in their hive, regardless of the day, season or subspecies. Furthermore, the study showed that humidity in beehives is stable even during winter, when brood is absent, and when temperature is known to be less stable in the beehives. These results suggest that humidity is important for honeybees at every life stage, maybe because of the ‘imprint’ of the evolutionary history of this hymenopteran lineage.

Keywords: Honeybees, *Apis mellifera*, black bee, subspecies, humidity, hygroregulation

2. Introduction

Terrestrial insects have high sensitivity to temperature and humidity. Most of them cannot control their body temperature (i.e., ectotherm species) and are, thereby, very dependent on their environment (Heinrich, 1971, 1974; Heusner and Stussi, 1964). Indeed, temperature has an important impact on foraging (Heinrich, 1974) and it is also crucial for reproduction, larval and pupal development, and the success of the offspring (Doull, 1976). As superorganisms, eusocial insects have evolved many strategies to maintain their nest temperature stable and controlled (Bollazzi and Roces, 2010; Jones and Oldroyd, 2006), especially in order to protect the eggs from extreme temperature variations (Jones and Oldroyd, 2006). Nest homeostasis provides not only an incubator for the brood, but also a thermal refuge for individuals to use temperature gradients to regulate their own body temperature (Chown and Nicolson, 2004).

The Eusocial bees use thermoregulation to ensure their survival and health (Heusner and Stussi, 1964; Jones and Oldroyd, 2006; Schäfer et al., 2011); for instance, *Apis mellifera* larvae can only survive in an environment with slight temperature fluctuation (i.e., from 32 to 36 °C) (Stabentheiner et al., 2010). The nest thermoregulation strategies of eusocial insects can be passive (e.g., nest orientation, architecture) or active (e.g., clustering, incubation), depending on the species (Jones and Oldroyd, 2006). Those thermoregulation strategies could have an impact on humidity levels (Frouz, 2000), a less studied phenomenon although also vital for terrestrial insects (Buxton, 1932). Indeed, environmental humidity is an essential factor to control for the survival of adults and eggs (Buxton, 1932). While eusocial insects exhibit a range of humidity preferences in the nest regarding their activity or the presence of brood (Buxton, 1932; Cabrera et al., 2013; Potts et al., 1984), eggs generally require a relative humidity (RH) of above 55% to hatch successfully, with the highest survival varying between 90 and 95% (Buxton, 1932; Doull, 1976).

Here, we chose the honeybee, *A. mellifera* (Linnaeus 1758) (Hymenoptera, Apidae), as our model organism to assess regulation of humidity in the nest. This insect is present worldwide and has been increasingly studied since the decline of its colonies in many occidental countries (Johnson, 2007; Pettis and Delaplane, 2010; Potts et al., 2010), due to its key role in pollination of many crops and in sustaining the wild biodiversity of ecosystems (Potts et al., 2010). While several experiments have been conducted (i) to disentangle the mechanisms that lead to creation and maintenance of microclimate in beehives (Fahrenholz et al., 1989; Stabentheiner et al., 2010), and (ii) to determine the impact of

parasitism on thermoregulating social behavior (Meikle et al., 2017; Schäfer et al., 2011), little is known about regulation of humidity in beehives. The eggs are very sensitive to humidity fluctuations within the nest (Buxton, 1932): a dry atmosphere can lead to the eggs death, either because the embryos die or because the dry egg envelopes become too hard for the larvae to hatch (Buxton, 1932). After hatching, humidity is still essential for the brood and the adults survival (Woodrow, 1935), and it is considered at least as important as temperature for larval and pupal development (Abou-Shaara et al., 2012; Doull, 1976; Ellis et al., 2008).

In this study, we investigated for the first time humidity in beehives of native European honeybee subspecies belonging to the M evolutionary branch (Miguel et al., 2011), *A. m. mellifera* in France, and *A. m. iberiensis* in Portugal. Our experimental setup includes daily, seasonal and annual measures of relative humidity during an entire year in the beehives to assess the ability of a superorganism (i.e. honeybee colony) to regulate the humidity in its nest (i.e. “hygroregulation hypothesis”), and to determine if geographic, seasonal or sub-species parameters impact this capacity.

3. Materials and Methods

3.1. Ethics statement

This field study granted by a European program, BioDIVERSA ERANET, in favor of preservation and protection of biodiversity, did not involve endangered or protected species. For all locations in France and in Portugal, no specific permission was required, as the apiaries were outside of Natural Parks. We only had to comply for Portugal with the general regulations about distance between apiaries, which is 800 m from the closest apiary (Decree Law n.o 203/2005).

3.2. European study sites

The study was conducted in four conservation centers created in France and Portugal to preserve the two native M-lineage subspecies. The conservation apiaries were deployed in private lands after obtaining permission from the owners, and to conduct experiments by them on their sites. These conservation centers have an approximate size of 350km². The French conservation centers are located at Rochefort (48°35'N; 1°57'E) and Pontaurmur (45°51'N; 2°40'E), in the regions of “Ile-de-France” and “Auvergne-Rhône-Alpes”, respectively. The landscape in Rochefort corresponds to that of “plain beekeeping”, and the landscape in Pontaurmur corresponds to that of “semi-mountain

beekeeping”. The Portuguese conservation centers are located at two latitudinal extremes in Gimonde (41°48’N; 6°42’W) and Zavial (37°03’N; 8°52’W), in the regions of “Trás-os-Montes” and “Algarve”, respectively. The landscape in Gimonde corresponds to that of “semi-mountain beekeeping”, and the landscape in Zavial corresponds to that of “plain beekeeping”.

3.3. Experimental design to monitor the relative humidity in hives

In each conservation center, six healthy beehives from the sanctuary zone were randomly chosen to monitor the relative humidity (RH) in honeybee hives. RH was measured by three thermo-hygro button data loggers (also named iButtons). The iButtons were placed in the nest of each of the six monitored colonies, at the two outermost frames (iButton A and C) and at the central frame (iButton B), each of them hanging between two frames by an iron thread. An external thermo-hygro button was placed in each apiary at approximately 200cm high, near the monitored beehives, to register environmental RH variation. Each iButton was programmed to measure RH hourly with a precision of $\pm 1\%$. Data from iButtons were collected every four months by a reader (Plug & Track, Progues PLUS) and exported to Excel format using the Thermotrack PC V.7 software. The pluviometry (rainfall) data was daily collected at 2 a.m., 8 a.m., 2 p.m. and 8 p.m. by a weather station (Micro El d.o.o., Zagreb) placed in each sanctuary.

3.4. Statistical Analysis

To test the “hygroregulation hypothesis”, at daily scale, first, RH (%) measured for each hive was plotted to give an overview of the humidity variation within the hives. Then, the days with the most similar external RH daily profile between the four geographic locations and for two contrasting seasons in beekeeping: summer (high colony activity) and winter (low colony activity) were selected using a similarity index (S) for days without rain in the four conservatories. A similarity matrix $S=1-D$, where S denotes similarity and D denotes distance ($D(x,y) = (\sum_i (x_i - y_i)^2)^{1/2}$), with x_i and y_i being the pairs of conservatories to compare, was calculated using Statistica 8.0 software (Stat Soft Inc., Arizona, USA). This index allows us to select one day in winter and one day in summer to compare in-hive RH and external RH in each conservatory.

Then, both days were divided into two parts: the part of the day with gradual decrease in external RH (i.e., from maximum RH, at 6 a.m., to minimum RH, at 5 p.m.), and the part of the day with a gradual increase of external RH (i.e., from the minimum RH of the day, at 6 p.m., until next day’s

morning, when RH was maximum, at 5 a.m.). For each selected day, linear regression was calculated using in-hive from iButton B and external data, for each part of the day, to test the daily “hygroregulation hypothesis” (i.e. weak correlation ($-0.6 \leq r \leq 0.6$) linked with a $R^2 \leq 0.40$ (weak coefficient of determination). An index $((RH_i - RHe)/RHe)$ with RH_i being the in-hive data of iButton B and RHe being the external RH, was calculated for each hour of each selected day. A clustering analysis was performed with this index in order to classify the hives from each conservatory in a hierarchical way. This analysis was performed using the PermutMatrix 1.9.4 seriation software (SupAgro, Montpellier, France).

An analysis of RH was conducted at the season level, by considering September to November for autumn, December to February for winter, March to May for spring and June to August for summer. For each season and iButton (A, B, C), a non-parametric test, Mann-Whitney, was used to compare the RH data in-hives to the outside ones. For each season, a Mandel’s statistics analysis (statistical test for extreme values) was done to detect if means and variances of RH measured in hives are homogeneous between the four conservation centers. For each season and iButton (A, B, C), a non-parametric ANOVA (Kruskal-Wallis) followed by a Multiple Comparison test (Steel-Dwass-Critchlow-Fligner) were done to compare between conservation centers the RH measured in-hives.

An analysis of RH was also performed for one complete year, from September 2015 to August 2016. In-hive data from each iButton (A, B and C) were put together for each conservation center in order to compare them with the external data, and to study the variability inside and between conservations centers, using XLSTAT Premium 2018.5. Two data mining analyses, Hierarchical Clustering Analysis (HCA) and Multidimensional Scaling (MDS), were performed to explore the grouping of samples. Then, a non-parametric test, Mann-Whitney, was used to compare for each iButton (A, B and C) the RH data of in-hives to the outside ones during one year. A Mandel’s statistics analysis (statistical test for extreme values) was done to detect if means and variances of RH measured in hives are homogeneous between the four conservation centers. For each iButton (A, B, C), a non-parametric ANOVA (Kruskal-Wallis) followed by a Multiple Comparison test (Steel-Dwass-Critchlow-Fligner) were done to compare the RH measured in-hives between conservation centers.

4. Results

4.1. Daily hygroregulation

The external RH from the two selected days for the four conservation centers are given in S1 Fig: December 11th, 2015, a winter day without rain or snow, had the most similar external RH profile among the four conservation centers (50% similarity, with RH varying between 23 and 100%), whereas July 21st, 2016, was the most similar not-rainy summer day (40% similarity, with RH varying between 80 and 100%). Regression lines calculated for the central iButton (B) of hive 1 in each conservation center for the summer day are shown in figure III-1 and in figure III-S2 for the winter day. These are representative of the regression lines for the remaining five hives and iButtons (i.e., linear equations, r and R^2), that are shown in supplementary material S1 (summer) and S2 (winter) tables.

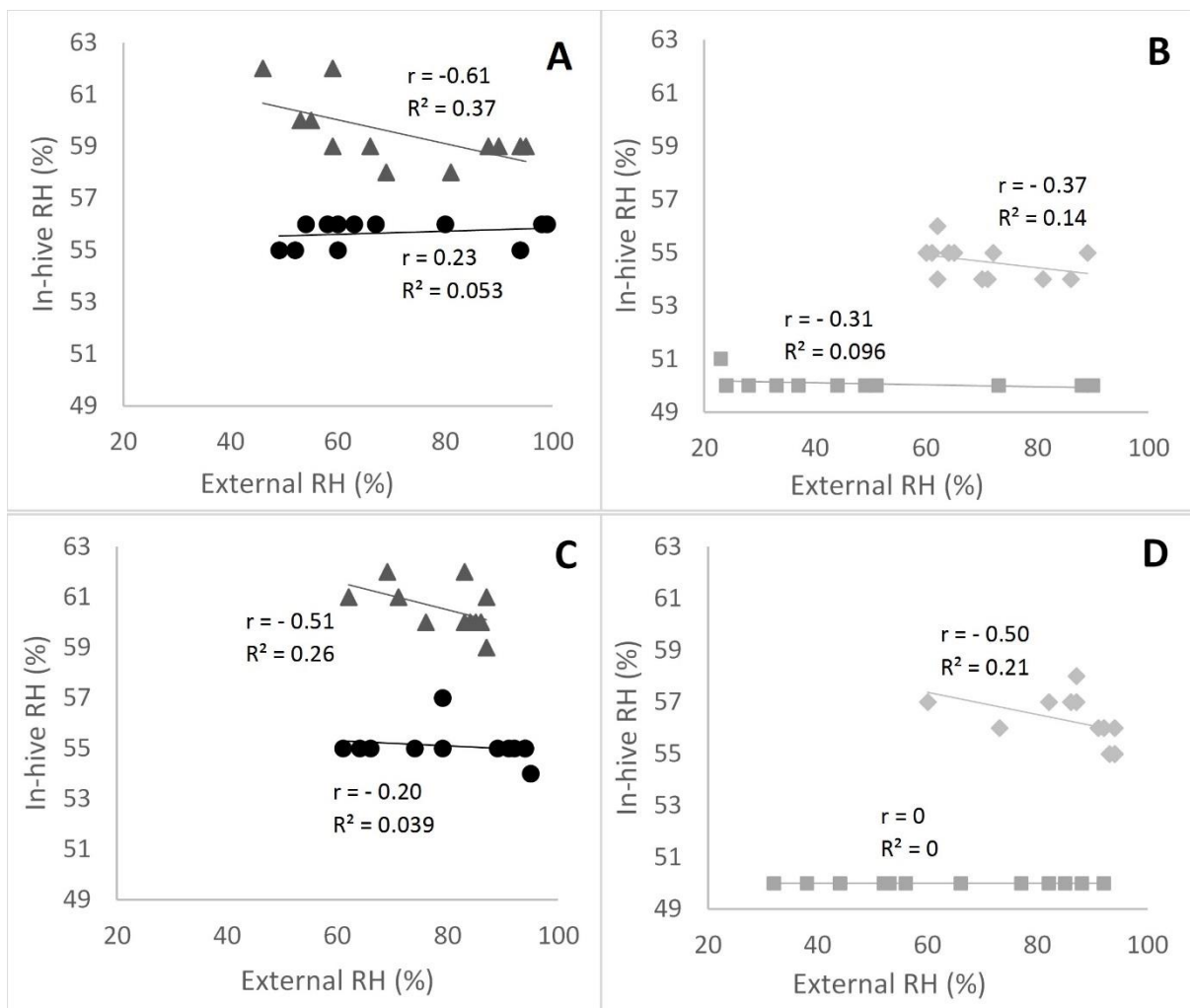


Figure III-1 : Linear modeling of the relationship between RH observed in the summer in the beehives 1, iButton B (in-hive) with those recorded in their habitat (external) in

each conservation center. The modeling was done for one day (July 21, 2016) and separated in two parts: downward RH from 6 a.m. to 5 p.m. and upward RH from 6 p.m. to 5 a.m. the next day. Linear modeling for *A. m. mellifera* is represented in A (downward RH) and C (upward RH) for Pontaumur (▲) and Rochefort (●). Linear modeling for *A. m. iberiensis* is represented in B (downward RH) and D (upward RH) for Zavial (◆) and Gimonde (■).

The cluster analysis was only performed for iButton B because it assessed RH in the main part of the brood (i.e. eggs, larvae and pupae) (figure III-2). During summer, the results show globally a positive regulation (in-hive RH > external RH) in the afternoon, especially in Gimonde. In Gimonde, the beehives are mostly maintained with low humidity inside, compared to the other apiaries. During winter, results show a similarity between all conservation centers, since RH is maintained along the whole day at lower level inside than outside the hives (figure III-S3).

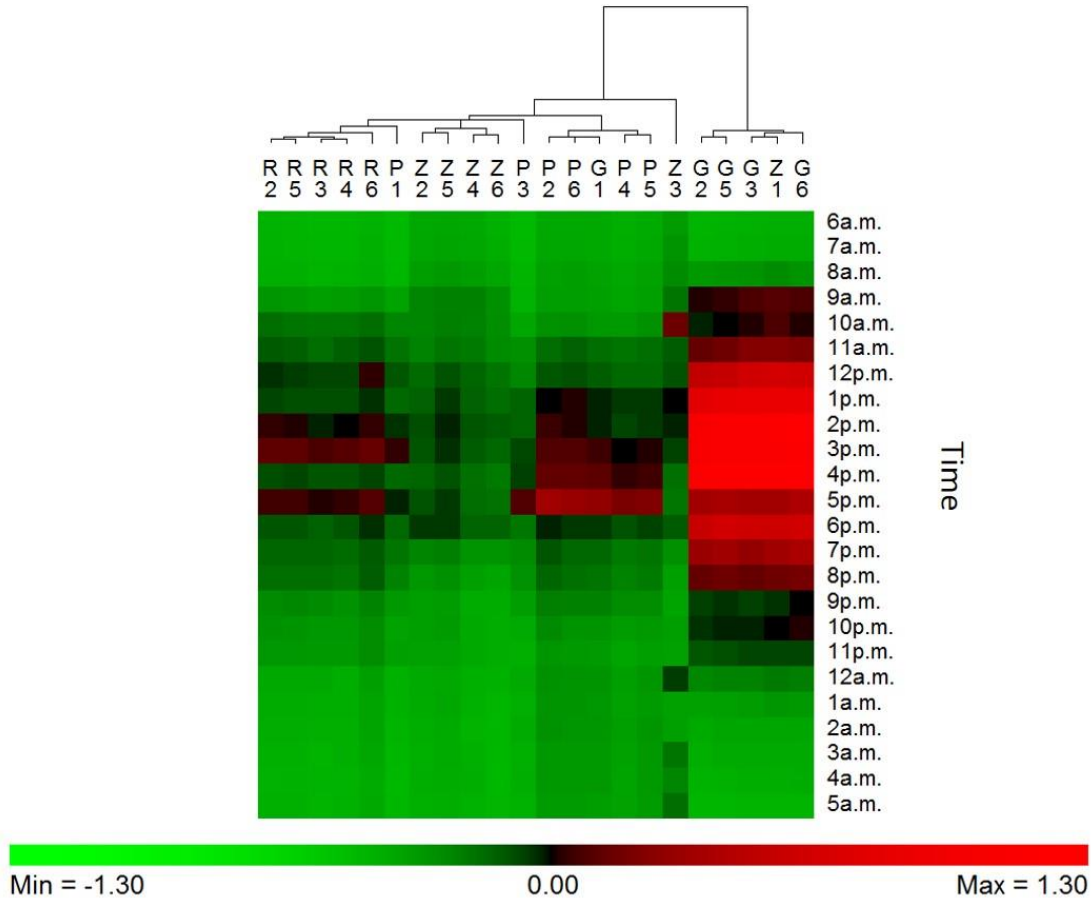


Figure III-2 : Hygroregulation observed (ratio $(R_{Hi}-R_{He})/R_{He}$) in the central brood frame (iButton B)) of each of the 6 hives during a 24h-period in the summer, from 6 a.m. (July 21, 2016) to 5 a.m. of the next day (July 22, 2016), in the four conservation centers (Rochefort, R; Pontaumur, P; Gimonde, G; and Zavial, Z). Green means that the in-

hive RH is lower than the external RH (negative regulation), red means the opposite (positive regulation).

4.2. Seasonal and annual hygroregulation

For RH measured each hour over a complete year in hives of conservation centers, the average, median with 1st and 3rd quartile, the range (maximum and minimum values) for each iButton (A, B, C) are given in figure III-3 and supplementary material table III-S3. The data mining done by HCA and MDS analysis show a grouping of RH data obtained over a complete year according to the position of iButtons in hives (i.e. iButton B in the center, iButtons A and C both at extremities), and not according to the location of conservation centers (figures III-4, III-5). For each iButton (A, B and C), the RH data in-hives were significantly different (Mann-Whitney U test, $p < 0.05$) to the outside ones during one year for the two honeybee subspecies deployed in the four conservation centers (*A. m. mellifera* in Rochefort and Pontaurmur, *A. m. iberiensis* in Gimonde and Zavial) (figure III-3). Mandel's statistical analysis shows that all conservation centers and iButtons are homogenous for annual average in-hive RH except for the Rochefort's iButton A (figure III-6A), and also they are homogenous for annual variance in-hive RH for iButtons in position B and C, except for Gimonde (figure III-6B). The comparison of in-hive RH data collected hourly each day over a year shows that conservation centers are statistically different from each other for each position of iButtons (A, B, C) in hives (Kruskal-Wallis ANNOVA followed by the Steel-Dwass-Critchlow-Fligner test, $p < 0.05$).

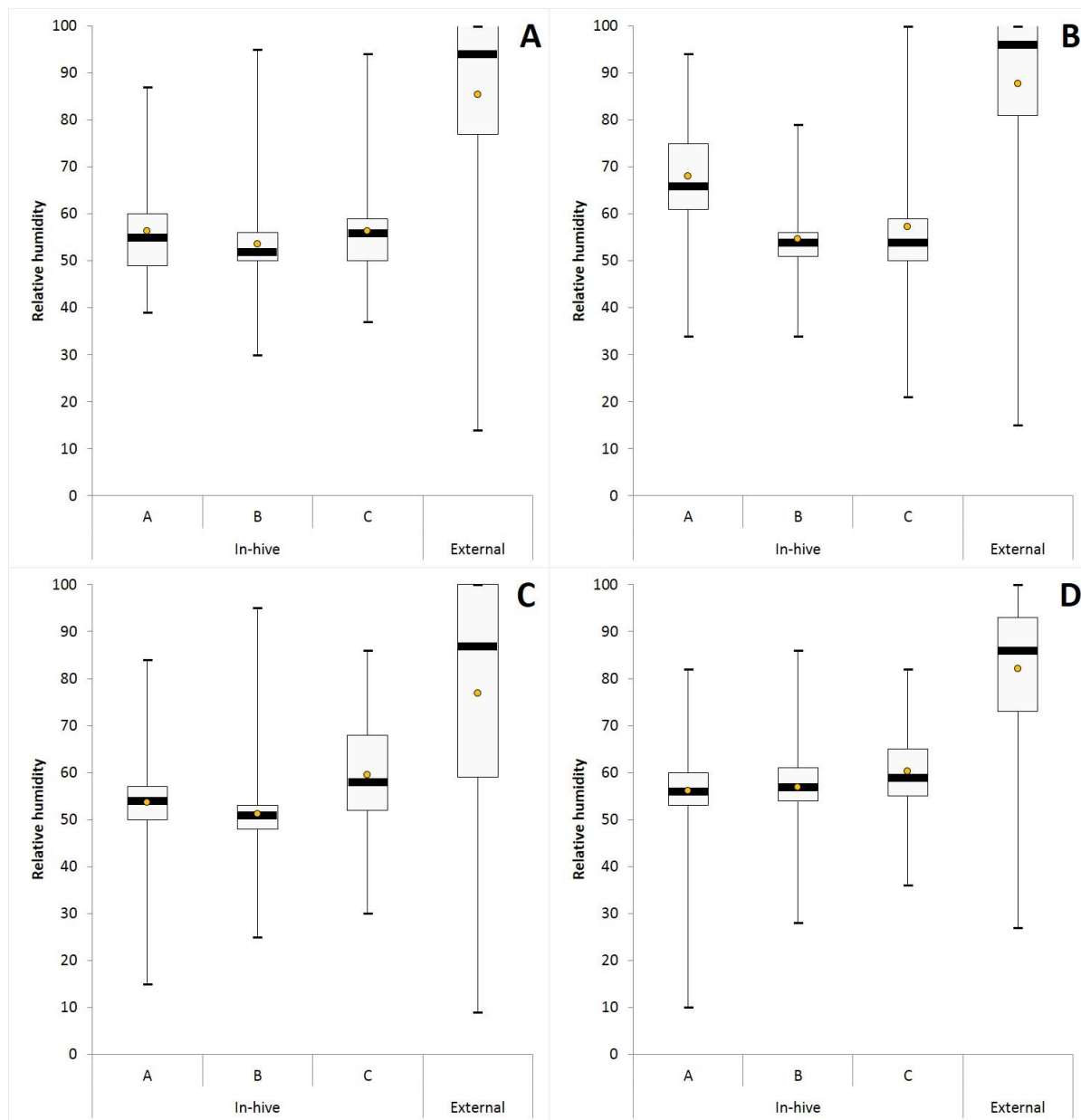


Figure III-3 : RH levels over a complete year (September 2015 - August 2016) for Pontaurmur (A), Rochefort (B), Gimonde (C), and Zavial (D). Box plots: mean (orange point), median (black stripes) with 1st and 3rd quartiles, maximum and minimum values. For each iButton (i.e. A, B, C) of conservation centers, in-hive RH data were calculated using the six beehives, and external RH was calculated using only the external iButton.

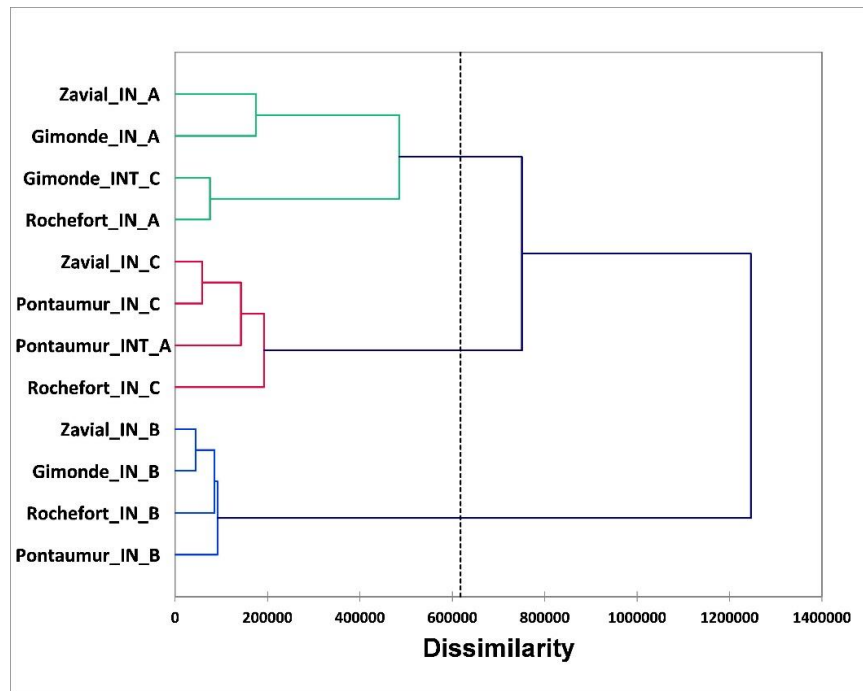


Figure III-4 : Dendrogram (distance measure: Euclidian; Linkage rule: Ward's method) resulting of the hierarchical clustering analysis for RH levels measured in the hives of the four conservation centers over a complete year for each iButton (A, B, C).

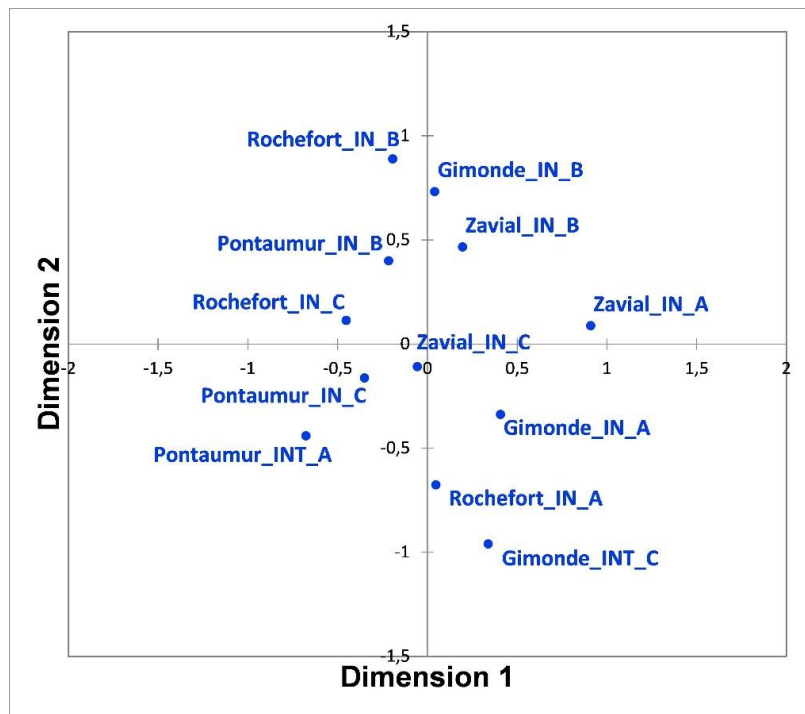


Figure III-5 : MDS graph resulting of the analysis done with the matrix of dissimilarities (distance measure: Euclidian) for RH levels measured in hives of the four conservation centers over a complete year for each iButton (A, B, C).

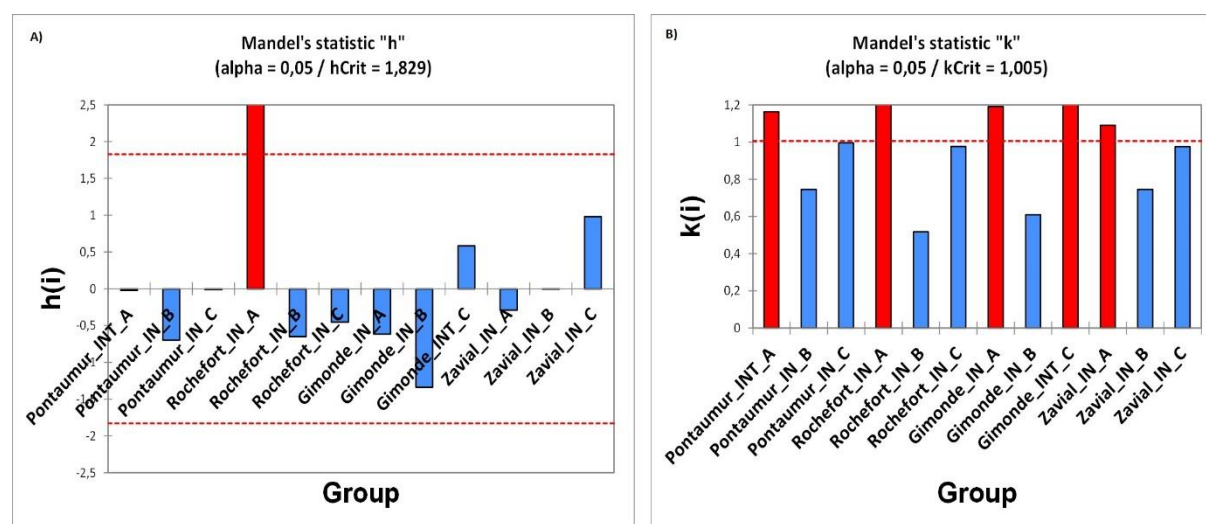


Figure III-6 : Mandel's graphs showing results of statistical analysis on homogeneity of means (A) and variances (B) of RH measured in hives of the four conservation centers over a complete year for each iButton (A, B, C).

The average, median with 1st and 3rd quartile, the range (maximum and minimum values) for each iButton (A, B, C) are given for RH measured hourly for the four seasons in hives of conservation centers, in figure III-S4 for autumn, figure III-S5 for winter, figure III-S6 for spring and figure III-S7 for summer. The values are given in supplementary material table III-S4. The seasonal analysis of RH for each iButton (A, B, C) showed significant differences of RH between the in-hive and the external data (Mann-Whitney U test, $p < 0.05$), for each conservation center in each season (supplementary material, figures III-S4, III-S5, III-S6, III-S7). Mandel's statistical analysis shows that all conservation centers and iButtons are homogenous on each season for the seasonal average in-hive RH, except for the Rochefort's iButton A (figures III-S8A (autumn), III-S9A (winter), III-S10A (spring), III-S11A (summer)). Moreover, for each season, conservation centers are mainly homogenous for seasonal variance in-hive RH for iButtons, except for Rochefort_IN_A, Gimonde_IN_A and Gimonde_C in autumn (figure III-S8B); for Pontaumur_IN_A, Rochefort_IN_C, Gimonde_IN_C, Zavial_IN_A in winter (figure III-S9B); for Pontaumur_IN_A, Pontaumur_IN_C, Rochefort_IN_A, Rochefort_IN_C and Zavial_IN_A in spring (figure III-S10B); for Gimonde_IN_A, Gimonde_IN_C and Zavial_IN_C in summer (figure III-S11B).

Furthermore, the statistical analysis shows that, for each season and iButtons (A, B, C), the four

conservation centers had significantly different in-hive RH (Kruskall Wallis ANOVA ($p < 0.05$) followed by Multiple Comparisons (Steel-Dwass-Critchlow-Fligner test, $p < 0.05$)), (i) except in winter, when Pontaumur (iButton C = $59.8 \pm 9.4\%$) was similar to Rochefort (iButton C = $64.0 \pm 17.0\%$) (Steel-Dwass-Critchlow-Fligner test, $p = 0.834$), when Gimonde (iButton A = 57.3 ± 7.3) was similar to Zavial (iButton A = $54.9 \pm 13.2\%$) (Steel-Dwass-Critchlow-Fligner test, $p = 0.386$); and (ii) except in spring, when Pontaumur (iButton A = $54.3 \pm 3.3\%$) was similar to Gimonde (iButton A = $54.9 \pm 13.2\%$) ((Steel-Dwass-Critchlow-Fligner test, $p = 0.150$)).

5. Discussion

Eusociality brought advantages to many insect species, especially the ability of living in community and, thus, to regulate some parameters of their immediate environment, such as temperature and humidity. While temperature regulation in superorganisms like eusocial insects has been studied extensively (Bollazzi and Roces, 2010; Fahrenholz et al., 1989; Heinrich, 1974; Jones and Oldroyd, 2006; Jones et al., 2004), providing insights about the factors that influence temperature management (Cooper et al., 1985; Heinrich, 1974; Weidenmüller et al., 2002), such as climate (Darchen, 1973) or genetics (Jones et al., 2004), there is little information on the humidity regulation inside nests and hives. In this study, we tested the “hygroregulation hypothesis” by means of using as model two native honeybee subspecies from the M branch, *A. m. mellifera* and *A. m. iberiensis*, and the assessment of the temporal humidity variation inside and outside beehives. Thereby, we sought to better understand the ability of eusocial insects to regulate the humidity of their nest (hive).

Our study has the advantage to present an approach at different scales, namely the day, the season and the year, in geographic regions with contrasting climates and landscapes. Our daily results overall show low or even no correlation between humidity inside and outside the hive for the two honeybee subspecies, in summer (figure III-1, supplementary material table III-S2) and in winter (supplementary material figure III-S2, table III-S1 and table III-S2). Thus, the honeybee populations in the French and in Portuguese conservation centers maintain constant nest humidity despite the extreme variations that take place outside (figure III-2). In addition, our results show that in-hive RH is more stable than external RH, over the year (figure III-3) but also at seasonal level (supplementary material figures III-S4, III-S5, III-S6 and III-S7). This illustrates the ability of the two honeybee subspecies to regulate their nest humidity regardless the season, even in the heart of the summer or in the winter, when brood is absent (Clément, 2015). Furthermore, no differences were found over the year between the

two honeybee subspecies, since the in-hive RH in Pontaurmur (*A. m. mellifera*) and Gimonde (*A. m. iberiensis*) are at the same level, and those from Zavial and Rochefort are higher and close to each other, with Rochefort having always a higher RH level. The similar in-hive hygroregulation in Pontaurmur and Gimonde on the one hand, and of Zavial and Rochefort on the other hand, could be due to the environment, Pontaurmur and Gimonde being in a semi-mountain place, and Rochefort and Zavial being both in a plain landscape. In addition, Mandel's test showed that the in-hive RH regulation is homogeneous for all iButtons except for Rochefort, where iButton A is slightly higher regardless the season (figure III-6, supplemental material figures III-S8, III-S9, III-S10, III-S11). This phenomenon is due to all the hives of the Rochefort conservatory, and can be explained in particular by the hives orientation, the iButton A being on the side that is the most exposed to the wind. Besides, the variance analysis (Box plots and extreme values analysis) highlights differences between seasons, the variances being more important in spring in both hives' extremities (iButtons A and B), regardless the conservatory (Supplemental table III-S4, figures III-S6, III-S10). This phenomenon can be explained by the activity of the bees, which is higher in spring due to the rebuilding of the colony after winter, and the exit of drones and workers during the day that causes big populations variations during the days. Moreover, considering the colony as a superorganism, its expression of hygroregulation can be different according to different factors like environment of subspecies.

It has been shown that temperature is better regulated in beehives in summer, when there is brood in the hive, than in winter, (Southwick and Heldmaier, 1987). This is likely due to the important role of temperature in egg development; it is known that at too low (i.e. $< 33^{\circ}\text{C}$) or too high (i.e. $> 36^{\circ}\text{C}$) temperature eggs, larvae and pupae die (Himmer, 1932; Stabentheiner et al., 2010). Similarly, maintenance of humidity level is crucial for social insects; it directly affects the proper development of eggs, larvae and pupae (Buxton, 1932; Doull, 1976), which die when the ambient environment is too dry (Buxton, 1932). Therefore, a minimum of 55% humidity is required for honeybee eggs to hatch, with a maximum survival rate between 90 and 95% (Doull, 1976). In addition, Ellis *et al.* (2008) have shown that honeybee workers have a marked preference for approximately 75% humidity in the absence of brood (Ellis et al., 2008). In this study, we obtained lower humidity levels in the beehives, with seasonal RH in the middle of the beehives (iButton B) ranging from $50 \pm 3\%$ (Gimonde, autumn) to $60 \pm 6\%$ (Zavial, winter) (supplemental material table III-S4). Seasons when brood is present in the hive (spring and summer) do not differ significantly from the rest of the year (supplemental material Figure III-S4). However, in those two seasons, RH does not drop below 50%, threshold below which

eggs cannot hatch (Doull, 1976).

The fact that humidity is stable and, therefore, regulated in the winter, unlike temperature (Fahrenholz et al., 1989; Southwick and Heldmaier, 1987) suggests two hypotheses: (i) the humidity is more easily maintained in the hive than the temperature, despite the fact that the two honeybee subspecies must reduce their energy efforts because food reserves are limited (Seeley and Visscher, 1985), and (ii) moisture is a more important factor for adult health than previously suggested in the literature (Abou-Shaara et al., 2012; Buxton, 1932; Doull, 1976; Ellis et al., 2008), especially for adult bees that keep it constant even in the absence of brood. The first hypothesis involves a link between temperature and humidity. Indeed, honeybee subspecies, such as *A. m. mellifera* and *A. m. iberiensis*, mainly use active regulation systems to manage the temperature of their nest (Jones and Oldroyd, 2006). This strategy includes ventilation, which has also an impact on ambient humidity (Clément, 2015; Southwick and Heldmaier, 1987). The second hypothesis is based on studies by Buxton, who showed in 1932 that insects only drink very rarely and need a moist environment to avoid desiccation, whether they are in the larval or adult stages (Buxton, 1932; Ellis et al., 2008).

It is important to note that the evolutionary history of honeybees goes back several million years (Miguel et al., 2011), whereas their encounter with humans dates back only 15,000 years ago (Clément, 2015), when bees moved from nesting in various natural cavities to beehives. Their ability to maintain stable moisture and temperature within the colony may have facilitated the migration of different subspecies to geographical areas with a climate that often varies greatly with the seasons, or particularly arid countries, such as in many parts of Africa (Han et al., 2012).

Currently, global warming is causing significant changes in the environment that organisms have to face (Cheng et al., 2013; Epstein et al., 1998; Noyes et al., 2009; Pachauri et al., 2014; Thomas and Blanford, 2003). Since 1990, the average global surface temperature, the environmental factor with the greatest impact on the biosphere, has increased by around 0.9° C, with a faster rise for the minimum than for the maximum (Pachauri et al., 2014). This global warming contributes to the destruction of several habitats and biological invasions in several ecosystems (Epstein et al., 1998; Pachauri et al., 2014). Insects, however, show strong adaptabilities to new climates, for example by modifying their range (Epstein et al., 1998; Hughes, 2000) or their period of activity (Willmer and Stone, 1997). However, according to our results, the two honeybee subspecies included in this study require a nest with relatively stable and high humidity levels. Some eusocial hymenoptera living in relatively arid areas

have adapted their behavior according to their unavailability of water (Heinrich, 1971; Willmer and Stone, 1997). For those social species, the lack of water due to global warming could lead to a significant change in their geographic distribution, in order to survive in those new and limiting conditions.

Moreover, as our data support previous studies and confirm an importance of moisture for both brood and adults of bee species (Abou-Shaara et al., 2012, 2017; Ayton et al., 2016; Doull, 1976; Ellis et al., 2008; Human et al., 2006), it is conceivable that the development of certain diseases may be manifested by a disturbance of the humidity in the nest: either (i) poor moisture control that would favor the occurrence of opportunistic parasites such as Varroa mites whose ability to reproduce is impacted by moisture in hives (Kraus and Velthuis, 1997), or (ii) the presence of parasites and pathogens causing weakening of colonies (Amiri et al., 2015; Annoscia et al., 2012; Martín-Hernández et al., 2011), which would induce a decrease in the ability of insects to properly regulate the humidity of their nest. Thus, we suggest that monitoring abiotic factors such as humidity and temperature in honeybee hives could be a strategy for identifying colonies having disturbance in their normal functioning as a eusocial community, and help to find the eventual factors leading to the decline of a honeybee colony.

6. Conclusion

Our data and statistical analysis sustain the validation of the “hygroregulation hypothesis”: the ability of a superorganism (i.e. a honeybee colony) to regulate the humidity in its nest, at a day, but also at seasonal and year scales. Thereby, humidity is constant during the year in the beehives, even in winter when temperature is less regulated because of the absence of brood. Furthermore, the slight differences observed between the seasons can be due to the increase of the colonies’ activity during spring. Overall, our results help to better understand how humidity level in nest (hive) is regulated in eusocial insects, and its relative importance all year long.

Acknowledgements

We thank Noel Mallet, Claude Grenier, Jean-Charles Labat, Céline Robert, Paulo Ventura, Miguel Vilas-Boas, Jonathan Gaboulaud, Cécile Ribout, Jean-François Odoux, Egoitz Galarza and Hélène Legout, who all helped us in the BEEHOPE project.

7. Supporting information

Table III-S1 : Linear equation, r and R² for each model of the relationship between RH observed in summer in the beehives (in-hive) with those recorded outside (external). The empty places correspond to iButtons that were absent from the beehive at this moment. Missing data are due to a breakdown for two iButtons for a couple of days.

		DOWNWARD RH				UPWARD RH		
		Hive	iButton A	iButton B	iButton C	iButton A	iButton B	iButton C
PONTAUMUR	Linear equation	1	y = -0.03x + 54.2	y = -0.05x + 62.8	y = -0.01x + 50.8	y = 0.01x + 52.6	y = -0.06x + 64.9	y = -0.02x + 52.2
	R ²		0.28	0.37	0.08	0.01	0.26	0.15
	r		-0.53	-0.61	-0.28	0.11	-0.51	-0.39
	Linear equation	2	y = -0.06x + 61.7	y = -0.01x + 51.0	y = 0.001x + 60.1	y = -0.1x + 67.9	y = -0.0004x + 50.7	y = 0.01x + 59.5
	R ²		0.79	0.11	0	0.65	0.00005	0.02
	r		-0.89	-0.33	0	-0.8	-0.01	0.15
	Linear equation	3	y = -0.02x + 58.4	y = 0.02x + 54.3	y = 0.2x + 46.1	y = 0.03x + 57.0	y = -0.002x + 55.7	y = 0.3x + 37.8
	R ²		0.13	0.39	0.79	0.24	0	0.64
	r		-0.35	0.63	0.89	0.49	-0.03	0.8
	Linear equation	4	y = 0.01x + 56.4	y = 0.05x + 53.2	y = 0.01x + 63.6	y = 0.08x + 53.1	y = 0.08x + 51.7	y = -0.1x + 74.4
	R ²		0.04	0.79	0.01	0.14	0.33	0.55
	r		0.19	0.89	0.11	0.37	0.57	-0.74
	Linear equation	5	y = -0.07x + 60.9	y = -0.02x + 61.2	y = 0.01x + 57.1	y = -0.03x + 60.5	y = 0.04x + 56.6	y = 0.008x + 57.2
	R ²		0.79	0.59	0.04	0.21	0.43	0.03
	r		-0.89	-0.77	0.21	-0.46	0.65	0.16
	Linear equation	6	y = -0.07x + 65.5	y = -0.01x + 58.9	y = 0.002x + 56.4	y = 0.005x + 62.2	y = -0.01x + 59.2	y = -0.008x + 57.3
	R ²		0.68	0.07	0.001	0.0034	0.02	0.02
	r		-0.83	-0.26	0.03	0.06	-0.15	-0.14
ROCHFORD	Linear equation	1	y = 0.04x + 63.5	y = 0.01x + 55.2	y = 0.01x + 48.5	y = -0.02x + 66.4	y = -0.01x + 55.9	y = 0.01x + 48.1
	R ²		0.4	0.05	0.26	0.05	0.04	0.14
	r		0.63	0.23	0.51	-0.23	-0.2	0.38
	Linear equation	2	y = 0.01x + 64.8	y = -0.004x + 53.8	y = 0.002x + 58.0	y = -0.2x + 77.9	y = -0.02x + 56.0	y = 0.04x + 55.8
	R ²		0.08	0.01	0.0028	0.52	0.12	0.43
	r		0.28	-0.1	0.05	-0.72	-0.34	0.65
	Linear equation	3	y = 0.01x + 59.3	y = -0.004x + 54.5	y = 0.01x + 51.0	y = -0.008x + 59.5	y = -0.006x + 54.6	y = 0.01x + 51.0
	R ²		0.05	0.04	0.15	0.11	0.01	0.05
	r		0.22	-0.2	0.38	-0.33	-0.11	0.22
	Linear equation	4	y = -0.02x + 61.6	y = -0.003x + 55.3	y = 0.004x + 58.6	y = -0.005x + 60.7	y = -0.006x + 55.6	y = -0.009x + 59.5
	R ²		0.38	0.03	0.01	0.02	0.03	0.06
	r		-0.62	-0.16	0.11	-0.15	-0.18	-0.24
	Linear equation	5	y = 0.03x + 60.8	y = -0.02x + 57.9	y = 0.01x + 60.6	y = -0.1x + 68.2	y = 0.02x + 56.6	y = -0.04x + 64.1
	R ²		0.24	0.06	0.02	0.54	0.12	0.42
	r		0.49	-0.25	0.15	-0.73	0.35	-0.65
	Linear equation	6	y = -0.01x + 58.4	y = 0.01x + 51.0	y = -0.002x + 57.1	y = 0.03x + 55.9	y = -0.005x + 51.9	y = -0.03x + 59.9
	R ²		0.0037	0.06	0.0004	0.04	0.01	0.08
	r		-0.06	0.24	-0.02	0.2	-0.11	-0.29
GIMONDE	Linear equation	1	y = 0.01x + 51.6	y = -0.004x + 50.3	y = 0.09x + 52.5	y = 52	y = 50	y = 0.1x + 49.1
	R ²		0.13	0.1	0.51	0	0	0.74
	r		0.36	-0.31	0.72	0	0	0.86
	Linear equation	2	y = 0.09x + 48.6	y = 0.01x + 51.4	y = 0.005x + 57.5	y = 0.1x + 45.7	y = 0.04x + 48.7	y = 58
	R ²		0.63	0.06	0.07	0.87	0.58	0
	r		0.79	0.25	0.27	0.93	0.76	0
	Linear equation	3	y = 0.07x + 22.9	y = 51	y = -0.01x + 35.0	y = 0.4x + 10.7	y = 0.002x + 51.1	y = -0.01x + 34.9
	R ²		0.35	0	0.09	0.97	0.01	0.34
	r		0.6	0	-0.3	0.98	0.07	-0.58
	Linear equation	4	y = 0.03x + 48.6	missing data	y = 0.01x + 61.2	y = 0.04x + 46.7	missing data	y = 0.01x + 61.1
	R ²		0.35	missing data	0.27	0.73	missing data	0.14
	r		0.59	missing data	0.52	0.85	missing data	0.38
	Linear equation	5	y = 0.02x + 55.1	y = 0.003x + 52.4	y = 0.2x + 42.0	y = 0.01x + 56.2	y = -0.002x + 52.6	y = 0.3x + 36.0
	R ²		0.6	0.03	0.62	0.23	0.01	0.92
	r		0.77	0.16	0.79	0.47	-0.09	0.96
	Linear equation	6	y = 0.02x + 57.9	y = 0.02x + 51.7	y = 0.03x + 56.8	y = 0.02x + 58.0	y = 0.02x + 50.3	y = 0.008x + 57.3
	R ²		0.24	0.17	0.69	0.31	0.32	0.17
	r		0.49	0.41	0.83	0.56	0.57	0.41

ZAVAIL	Linear equation	1	$y = 0.06x + 54.6$	$y = -0.02x + 56.4$	missing data	$y = 0.03x + 57.1$	$y = -0.04x + 60.0$	missing data
	R ²		0.38	0.14	missing data	0.14	0.21	missing data
	r		0.62	-0.37	missing data	0.37	-0.46	missing data
	Linear equation	2	$y = 0.4x + 30.6$	$y = 0.2x + 48.8$	$y = 0.1x + 49.3$	$y = 0.4x + 25.9$	$y = 0.69x + 4.7$	$y = 0.06x + 52.2$
	R ²		0.49	0.05	0.59	0.8	0.38	0.45
	r		0.7	0.21	0.77	0.89	0.61	0.67
	Linear equation	3	$y = 0.01x + 54.9$	$y = 0.03x + 52.2$	$y = 0.6x + 16.4$	$y = 0.02x + 55.0$	$y = 0.06x + 47.9$	$y = 0.5x + 13.5$
	R ²		0.08	0.06	0.59	0.11	0.37	0.74
	r		0.29	0.25	0.77	0.34	0.61	0.86
	Linear equation	4	$y = 0.03x + 53.8$	$y = -0.1x + 67.0$	$y = 0.01x + 64.3$	$y = 0.03x + 53.8$	$y = -0.01x + 58.5$	$y = 0.001x + 65.0$
	R ²		0.23	0.77	0.05	0.22	0.02	0.0008
	r		0.48	-0.88	0.23	0.47	-0.14	0.03
	Linear equation	5	$y = 0.4x + 22.8$	$y = -0.04x + 54.7$	$y = 0.05x + 55.9$	$y = 0.3x + 26.1$	$y = -0.02x + 53.8$	$y = 0.06x + 54.9$
	R ²		0.7	0.31	0.39	0.83	0.26	0.76
	r		0.83	-0.55	0.63	0.91	-0.51	0.87
	Linear equation	6	$y = 0.1x + 46.0$	$y = -0.2x + 64.2$	$y = 0.4x + 25.8$	$y = 0.09x + 49.6$	$y = 0.1x + 43.2$	$y = 0.4x + 19.8$
	R ²		0.8	0.4	0.64	0.74	0.4	0.76
	r		0.89	-0.64	0.8	0.86	0.63	0.87

Table III-S2 : Linear equation, r and R² for each model of the relationship between RH observed in winter in the beehives (in-hive) with those recorded outside (external). The empty places correspond to iButtons that were absent from the beehive at this moment. Missing data are due to a breakdown for two iButtons for a couple of days.

		Hive	DOWNWARD RH			UPWARD RH		
			iButton A	iButton B	iButton C	iButton A	iButton B	iButton C
PONTAUMUR	Linear equation	1	$y = 0.001x + 47.7$	$y = 0.02x + 45.8$	$y = -0.2x + 75.0$	$y = -0.01x + 49.3$	$y = 0.04x + 43.9$	$y = 0.3x + 35.9$
	R ²		5,00	0.02	0.09	0.03	0.04	0.64
	r		2.24	0.13	-0.29	-0.17	0.19	0.8
	Linear equation	2	$y = -0.16x + 68.0$	$y = 0.03x + 59.2$	$y = 50$	$y = 1.2x - 56.4$	$y = -0.01x + 63.3$	$y = -0.01x + 50.6$
	R ²		0.05	0.03	0	0.6	0.03	0.01
	r		-0.22	0.18	0	0.77	-0.17	-0.08
	Linear equation	3	$y = 58$	$y = 0.03x + 50.2$	$y = -0.03x + 68.1$	$y = 0.6x + 5.4$	$y = 0.04x + 49.6$	$y = -0.03x + 71.5$
	R ²		0	0.06	0.01	0.38	0.1	0.09
	r		0	0.24	-0.07	0.62	0.32	-0.3
	Linear equation	4	$y = -0.04x + 55.3$	$y = 0.02x + 46.4$	$y = -0.1x + 68.7$	$y = 0.05x + 47.2$	$y = -0.007x + 48.6$	$y = 0.08x + 53.05$
	R ²		0.04	0.02	0.07	0.13	0.01	0.24
	r		-0.19	0.13	-0.26	0.36	-0.08	0.49
	Linear equation	5	$y = -0.02x + 51.5$	$y = -0.001x + 60.3$	$y = 0.03x + 49.2$	$y = 0.04x + 45.9$	$y = 0.007x + 60.4$	$y = 0.3x + 23.6$
	R ²		0.03	0.0001	0.01	0.15	0.0019	0.81
	r		-0.17	-0.01	0.1	0.39	0.04	0.9
	Linear equation	6	$y = -0.3x + 76.2$	$y = -0.05x + 87.4$	$y = -0.07x + 74.3$	$y = 0.2x + 41.3$	$y = -0.07x + 89.5$	$y = 0.06x + 63.4$
	R ²		0.15	0.16	0.21	0.63	0.17	0.17
	r		-0.38	-0.4	-0.46	0.79	-0.41	0.41
ROCHEFORT	Linear equation	1			$y = 47$	$y = -0.2x + 110.3$	$y = -0.2x + 80.8$	$y = 0.5x - 3$
	R ²		0	0	0	0.06	0.05	1,00
	r		0	0	0	-0.25	-0.21	1,00
	Linear equation	2			$y = -0.8x + 165.7$	$y = 0.09x + 78.1$	$y = 48$	$y = 0.5x + 38.5$
	R ²		0	0	0.55	0.02	0	0.08
	r		0	0	-0.74	0.13	0	0.28
	Linear equation	3			$y = 0.03x + 46.4$	$y = 0.09x + 59.09$	$y = 0.05x + 53.5$	$y = -0.1x + 63.4$
	R ²		0	0	0.02	0.02	0.01	0.02
	r		0	0	0.13	0.13	0.09	-0.13
	Linear equation	4			$y = 54$	$y = 0.2x + 40.7$	$y = 55$	$y = 54$
	R ²		0	0	0	0.0385	0	0
	r		0	0	0	0.2	0	0
	Linear equation	5			$y = -1.2x + 186.8$	$y = 0.2x + 53.2$	$y = -0.3x + 85.2$	$y = 1.3x - 57.7$
	R ²		0	0	0.78	0.03	0.08	0.26
	r		0	0	-0.88	0.16	-0.27	0.51
	Linear equation	6			$y = 56$	$y = -0.7x + 147.8$	$y = 0.09x + 41.1$	$y = 0.05x + 51.5$
	R ²		0	0	0	0.27	0.01	0.01
	r		0	0	0	-0.52	0.09	-0.09

GIMONDE	Linear equation	1	$y = 0.01x + 46.8$	$y = 0.02x + 44.5$	$y = 0.04x + 49.3$			
	R ²		0.0009	0.02	0.03	0	0	0
	r		0.03	0.15	0.17	0	0	0
	Linear equation	2	$y = 0.09x + 43.7$	$y = 1.0x - 40.8$	$y = -0.2x + 94.6$			
	R ²		0.04	0.42	0.24	0	0	0
	r		0.2	0.65	-0.49	0	0	0
	Linear equation	3	$y = 67$	$y = 0.03x + 47.7$	$y = -0.08x + 78.0$			
	R ²		0	0.04	0.13	0	0	0
	r		0	0.21	0.36	0	0	0
	Linear equation	4	$y = 0.03x + 48.7$	$y = 1.3x - 85.4$	$y = -0.04x + 66.7$			
	R ²		0.04	0.25	0.03	0	0	0
	r		0.21	0.5	-0.18	0	0	0
ZAVIAL	Linear equation	5	$y = 0.2x + 31.1$	$y = 1.1x - 52.5$	$y = -0.02x + 62.5$			
	R ²		0.45	0.55	0.02	0	0	0
	r		0.67	0.74	-0.15	0	0	0
	Linear equation	6	$y = 0.02x + 53.4$	$y = 0.03x + 47.7$	$y = 0.005x + 46.6$			
	R ²		0.01	0.04	0.0009	0	0	0
	r		0.07	0.21	-0.03	0	0	0
	Linear equation	1	$y = -0.01x + 57.1$	$y = -0.5x + 101.7$	$y = 0.1x + 59.3$	$y = 0.01x + 54.9$	$y = -0.5x + 97.9$	$y = -0.05x + 74.5$
	R ²		0.01	0.07	0.2	0.01	0.16	0.03
	r		-0.09	-0.26	0.45	0.08	-0.4	-0.18
	Linear equation	2	$y = -0.1x + 83.8$	$y = -0.6x + 113.6$	$y = 0.01x + 52.9$	$y = 0.03x + 69.4$	$y = -0.3x + 83.4$	$y = -0.1x + 65.4$
	R ²		0.02	0.09	0.01	0.01	0.15	0.1
	r		-0.14	-0.31	0.09	0.09	-0.38	-0.32
	Linear equation	3	$y = 54$	$y = 0.3x + 41.4$	$y = -0.09x + 60.7$	$y = -0.03x + 57.2$	$y = -0.09x + 71.6$	$y = -0.06x + 58.4$
	R ²		0	0.08	0.05	0.02	0.14	0.05
	r		0	0.28	-0.23	-0.15	-0.37	-0.22
	Linear equation	4	$y = -0.06x + 65.1$	$y = 0.2x + 48.5$	$y = -0.7x + 130.9$	$y = 0.2x + 45.3$	$y = -0.2x + 77.8$	$y = 0.2x + 50.3$
	R ²		0.02	0.08	0.25	0.16	0.09	0.25
	r		-0.16	0.28	-0.5	0.4	-0.3	0.5
	Linear equation	5	$y = 0.09x + 47.2$	$y = -0.01x + 55.4$	$y = -0.1x + 70.4$	$y = -0.03x + 57.1$	$y = -0.03x + 57.1$	$y = 0.1x + 51.3$
	R ²		0.1	0.0017	0.24	0.06	0.06	0.13
	r		0.31	-0.04	-0.49	-0.24	-0.24	0.36
	Linear equation	6	$y = -0.1x + 57.3$	$y = -0.02x + 66.7$	$y = 0.03x + 67.4$	$y = -0.03x + 53.2$	$y = -0.2x + 83.6$	$y = -0.01x + 71.7$
	R ²		0.15	0.0033	0.01	0.02	0.22	0.0026
	r		-0.39	-0.06	0.09	-0.15	-0.47	-0.05

Table III-S3 : Mean, median with 1st and 3rd quartiles, maximum and minimum values of RH levels over a complete year (September 2015 – August 2016) for each conservatory. For each iButton (i.e. A, B, C) of conservation centers, in-hive RH data were calculated using the six beehives, and external RH (Ext.) was calculated using only the external iButton.

	Pontaumur				Rocheport				Gimonde				Zavial			
	A	B	C	Ext.	A	B	C	Ext.	A	B	C	Ext.	A	B	C	Ext.
Min	39	30	37	14	34	34	21	15	15	25	30	9	10,1	28	36	27
Q1	49	50	50	77	61	51	50	81	50	48	52	59	53	54	55	73
Median	55	52	56	94	66	54	54	96	54	51	58	87	56	57	59	86
Mean	56	54	56	85	68	55	57	88	54	51	59	77	56	57	60	82
Q3	60	56	59	100	75	56	59	100	57	53	68	100	60	61	65	93
Max	87	95	94	100	94	79	100	100	84	95	86	100	82	86	82	100
Standard error	9	6	7	19	10	5	12	17	8	5	10	25	9	6	7	14
Variance	73	32	53	355	108	28	150	296	68	28	99	645	76	36	50	203
Number of data	49175	49181	49179	8197	52705	52705	52705	8785	48661	50020	51421	8572	52054	52050	49409	8684

Table III-S4 : Mean, median with 1st and 3rd quartiles, maximum and minimum values of RH levels for each season over a complete year (September 2015 – August 2016). For each iButton (i.e. A, B, C) of conservation centers, in-hive RH data were calculated using the six beehives, and external RH was calculated using only the external iButton.

		Pontaumur				Rochefort				Gimonde				Zavial			
		A	B	C	Ext.	A	B	C	Ext.	A	B	C	Ext.	A	B	C	Ext.
AUTUMNS	Min	45	42	39	29	45	41	43	36	23	41	32	17	39	38	38	33
	Q1	48	48	50	82	59	51	50	87	42	48	48	65	52	54	52	75
	Median	51	51	51	96	65	52	53	97	47	51	51	89	53	57	54	87
	Mean	54	51	53	88	66	52	53	91	48	50	54	79	54	57	57	84
	Q3	58	53	56	100	72	55	56	100	53	52	59	100	55	60	60	95
	Max	83	73	82	100	89	62	75	100	64	70	77	100	81	80	76	100
	Standard error	8	4	5	16	10	3	5	13	7	3	8	24	5	4	6	14
	Variance	62	12	30	253	98	8	21	166	47	9	61	556	28	19	35	191
	Number of data	13109	13107	13109	2185	13109	13109	13110	2185	9063	11829	11826	1972	12461	12461	12461	2085
WINTER	Min	47	30	37	37	50	43	38	48	43	25	46	28	10,1	33	52	44
	Q1	48	49	51	91	66	50	50	96	53	48	56	91	51	56	56	81
	Median	57	52	57	99	73	56	57	100	56	51	69	100	56	61	62	89
	Mean	59	55	60	94	74	57	64	97	57	51	65	93	55	60	64	87
	Q3	64	58	69	100	80	61	85	100	58	54	73	100	59	64	72	94
	Max	86	95	80	100	94	79	100	100	77	77	84	100	82	81	82	100
	Standard error	12	8	9	10	9	7	18	7	7	5	10	12	13	6	8	10
	Variance	134	61	89	96	86	56	318	50	54	23	109	146	173	31	68	102
	Number of data	13104	13104	13104	2184	13104	13104	13104	2184	13104	13104	13104	2184	13103	13098	13103	2184
SPRING	Min	39	30	40	17	34	34	21	18	28	11	38	14	16,8	28	37	30
	Q1	49	49	52	70	62	51	49	72	52	48	58	63	56	54	58	76
	Median	55	52	56	92	68	55	53	92	56	52	66	87	60	56	63	87
	Mean	56	53	56	82	69	55	56	84	57	53	64	79	59	57	62	84
	Q3	61	55	58	99	77	57	58	100	61	57	70	100	63	60	66	94
	Max	87	93	94	100	93	79	100	100	84	95	81	100	81	85	78	100
	Standard error	8	6	7	21	10	5	13	18	6	8	7	21	8	6	5	13
	Variance	67	31	48	445	103	27	171	342	33	65	51	460	57	39	24	169
	Number of data	9738	9738	9733	1623	13251	13251	13251	2209	13240	13228	13239	2207	13248	13246	12813	2208
SUMMER	Min	43	33	37	14	44	40	40	15	15	36	30	9	30	29	35	27
	Q1	52	52	52	60	58	52	51	63	47	49	52	33	54	51	54	63
	Median	56	55	56	86	61	54	56	86	52	51	57	55	56	54	58	75
	Mean	55	55	56	77	62	54	55	79	50	51	55	56	56	54	58	74
	Q3	58	57	59	96	64	56	59	98	56	52	60	80	59	56	62	89
	Max	68	68	71	100	89	68	72	100	77	61	86	100	74	86	71	100
	Standard error	4	4	5	22	8	3	5	21	8	3	8	26	5	5	6	16
	Variance	13	16	20	490	65	10	24	449	71	7	68	694	29	29	33	259
	Number of data	13215	13224	13224	2204	13235	13235	13233	2206	13248	11853	13245	2208	13242	13241	11033	2207

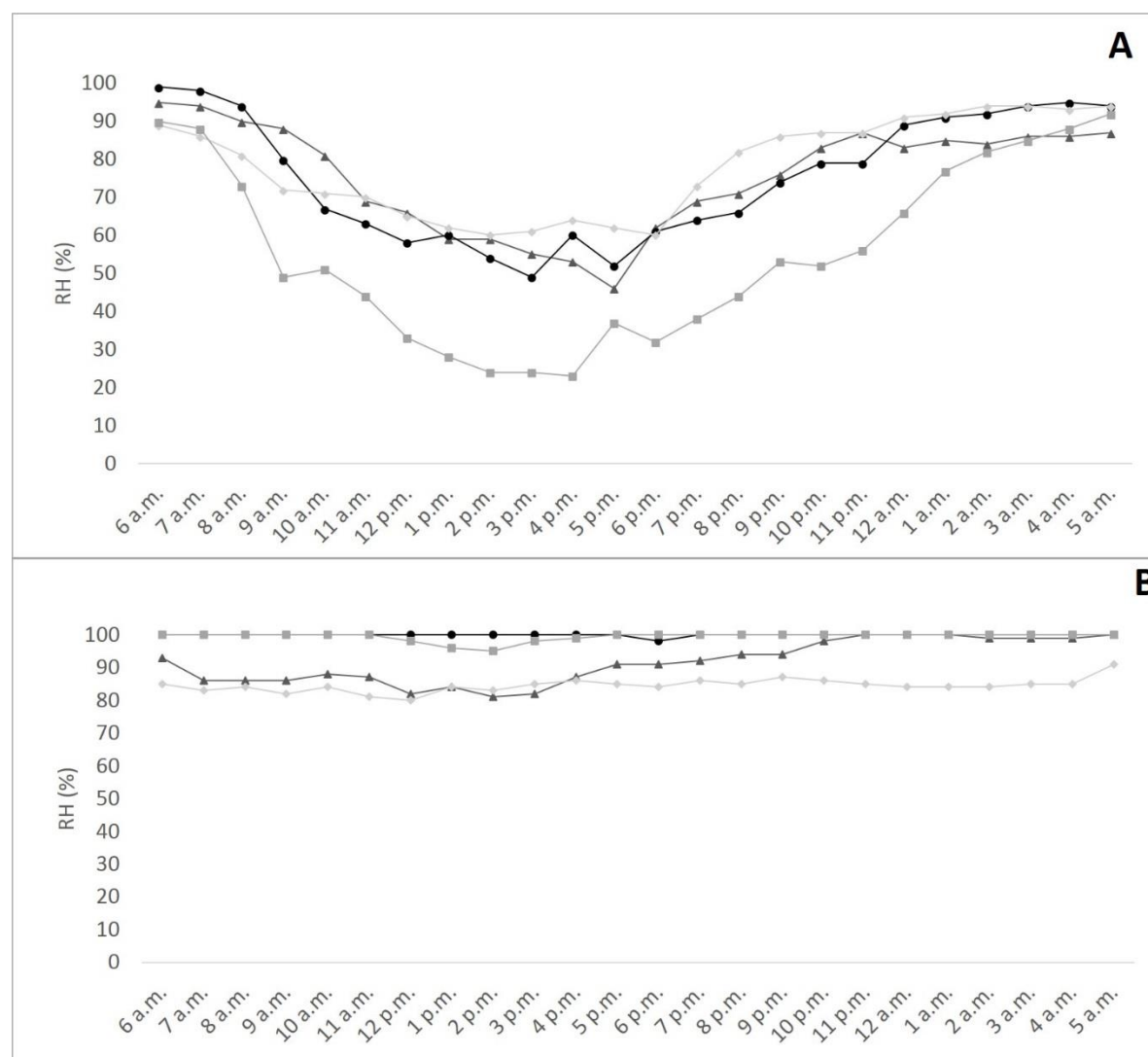


Figure III-S1 : RH measured by the external iButton in the four conservation centers: Pontaumur (▲), Rochefort (●), Zavial (◆) and Gimonde (■), (A) in summer (July 21, 2016) and (B) in winter (December 11, 2015). These two dates were chosen because they have the most similar external RH among the four conservatories in the two seasons, and because it did not rain in any of the four conservation centers. The data were taken from 6 a.m. to 5 a.m. the next day for both dates.

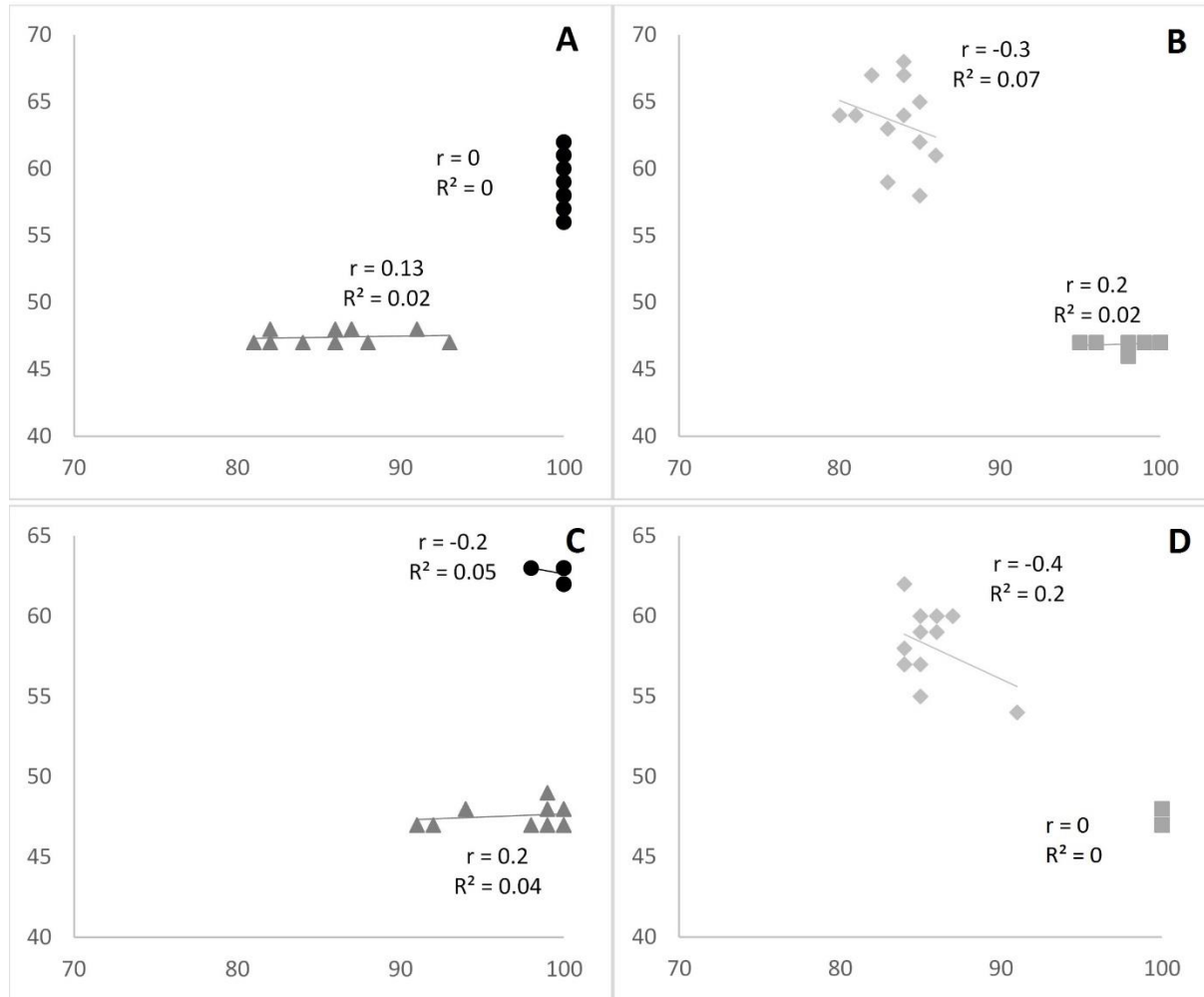


Figure III-S2 : Linear modeling of the relationship between RH observed in the winter in the beehives (in-hive) with those recorded in their habitat (external). The modeling was done for one day (December 11, 2015) and separated in two parts: downward RH from 6 a.m. to 5 p.m. and upward RH from 6 p.m. to 5 a.m. the next day. Linear modeling for *A. m. mellifera* is represented in A (downward RH) and C (upward RH) for Pontaurmur (▲) and Rochefort (●). Linear modeling for *A. m. iberiensis* is represented in B (downward RH) and D (upward RH) for Zavial (◆) and Gimonde (■).

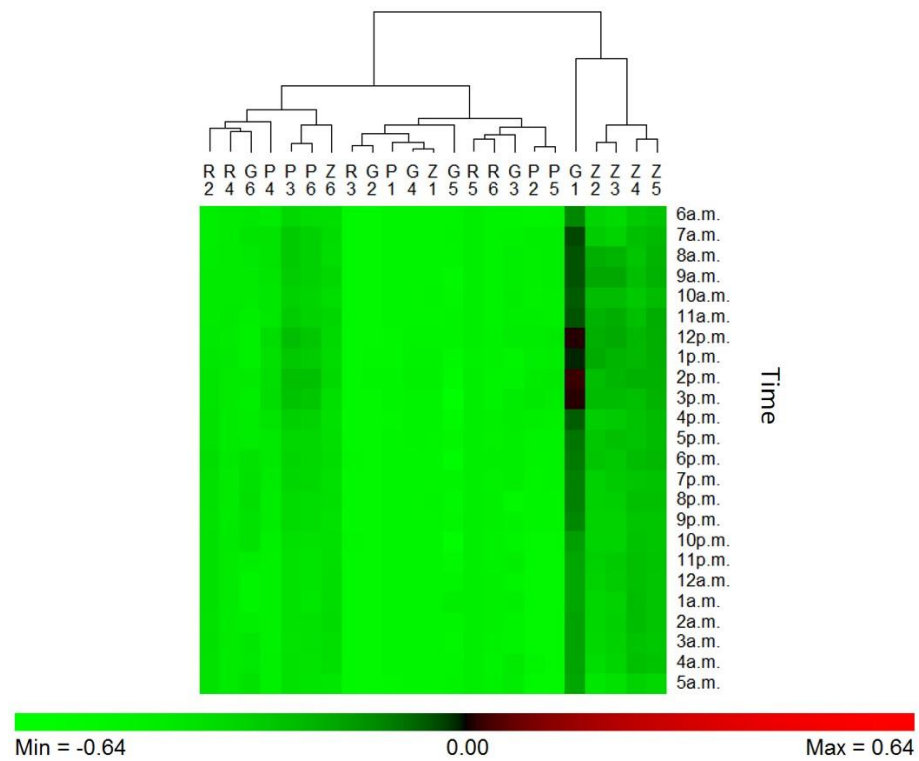


Figure III-S3 : RH regulations observed in winter for each colony (iButton B) regarding to the time of the day: from 6 a.m. to 5 p.m. the next morning. Green means the in-hive RH is lower than the external RH (negative regulation), red means the opposite (positive regulation).

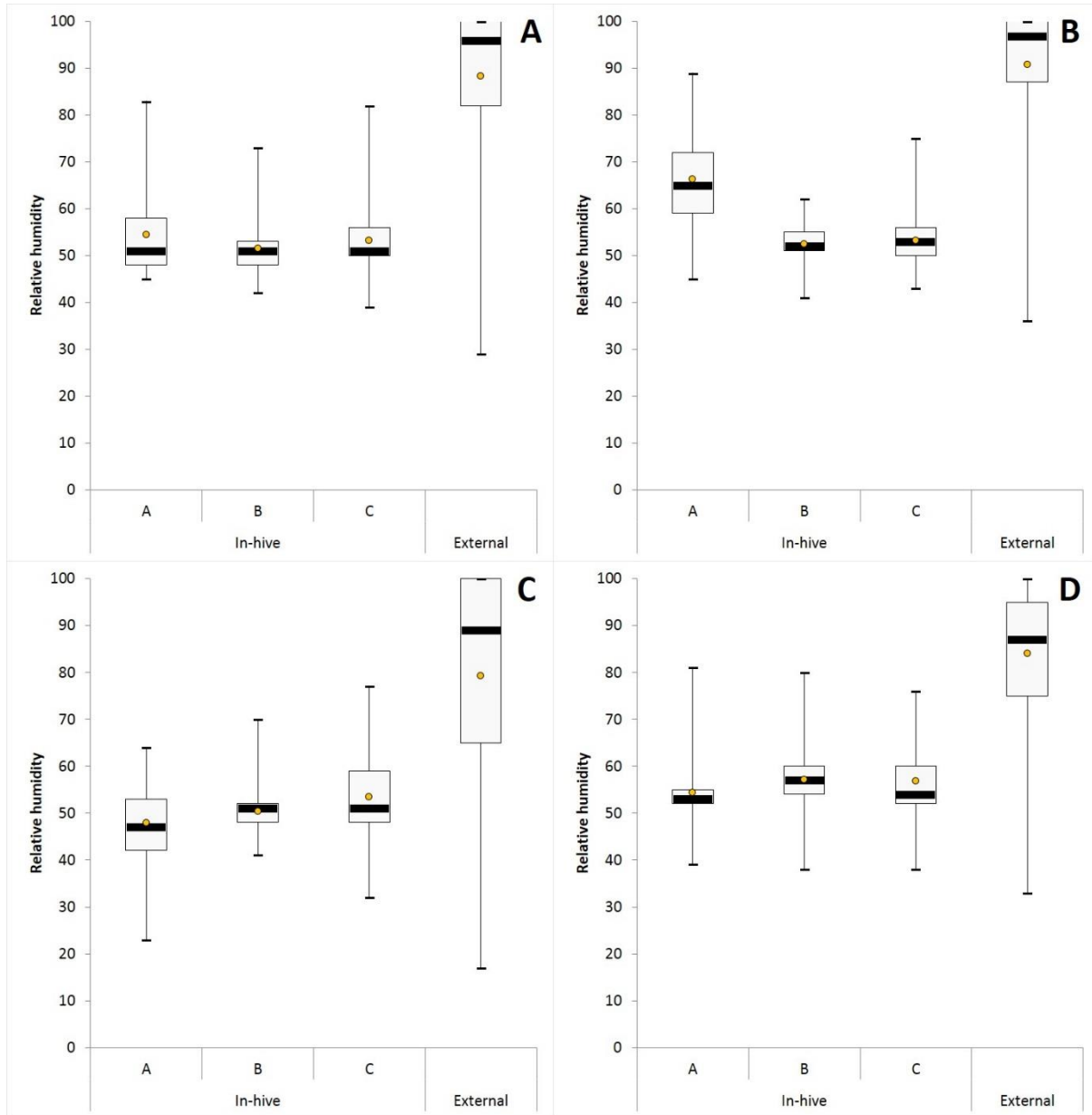


Figure III-S4 : RH levels during autumn 2015 for Pontaurmur (A), Rochefort (B), Gimonde (C), and Zavial (D). Box plots: mean (orange point), median (black stripes) with 1st and 3rd quartiles, maximum and minimum values. For each iButton (i.e. A, B, C) of conservation centers, in-hive RH data were calculated using the six beehives, and external RH was calculated using only the external iButton for each conservation center.

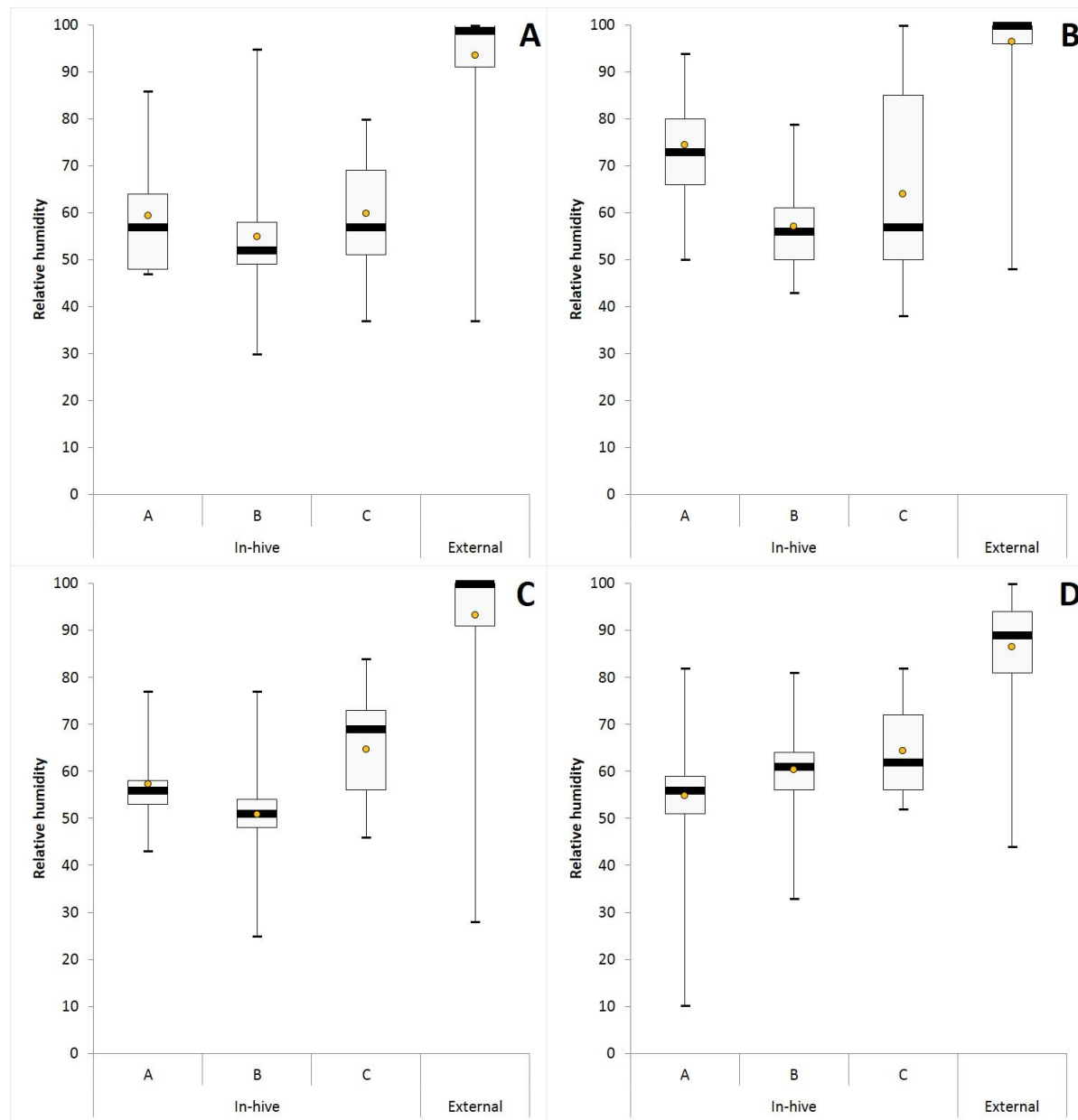


Figure III-S5 : RH levels during winter 2016 for Pontaurmur (A), Rochefort (B), Gimonde (C), and Zavial (D). Box plots: mean (orange point), median (black stripes) with 1st and 3rd quartiles, maximum and minimum values. For each iButton (i.e. A, B, C) of conservation centers, in-hive RH data were calculated using the six beehives, and external RH was calculated using only the external iButton for each conservation center.

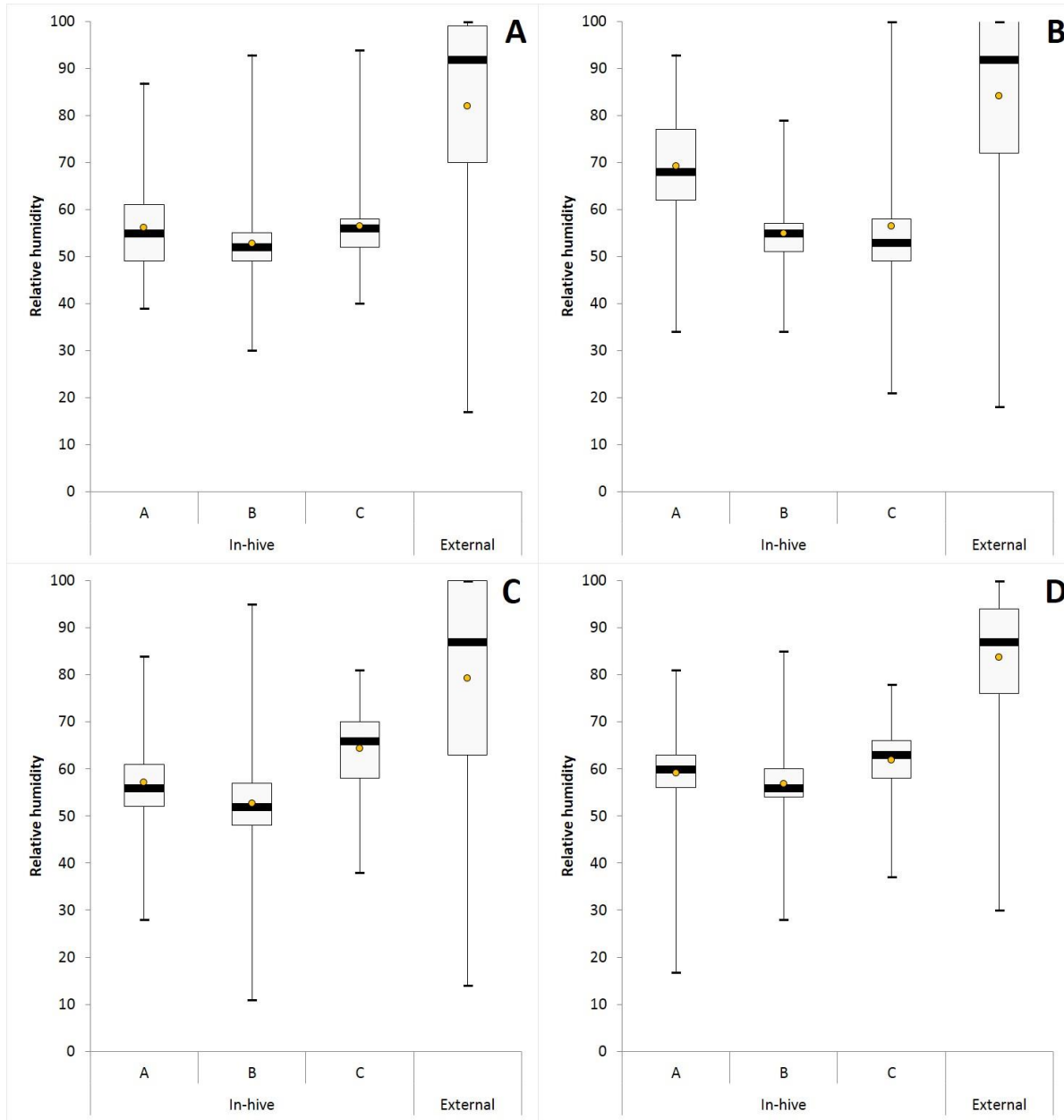


Figure III-S6 : RH levels during spring 2016 for Pontaumur (A), Rochefort (B), Gimonde (C), and Zavial (D). Box plots: mean (orange point), median (black stripes) with 1st and 3rd quartiles, maximum and minimum values. For each iButton (i.e. A, B, C) of conservation centers, in-hive RH data were calculated using the six beehives, and external RH was calculated using only the external iButton for each conservation center.

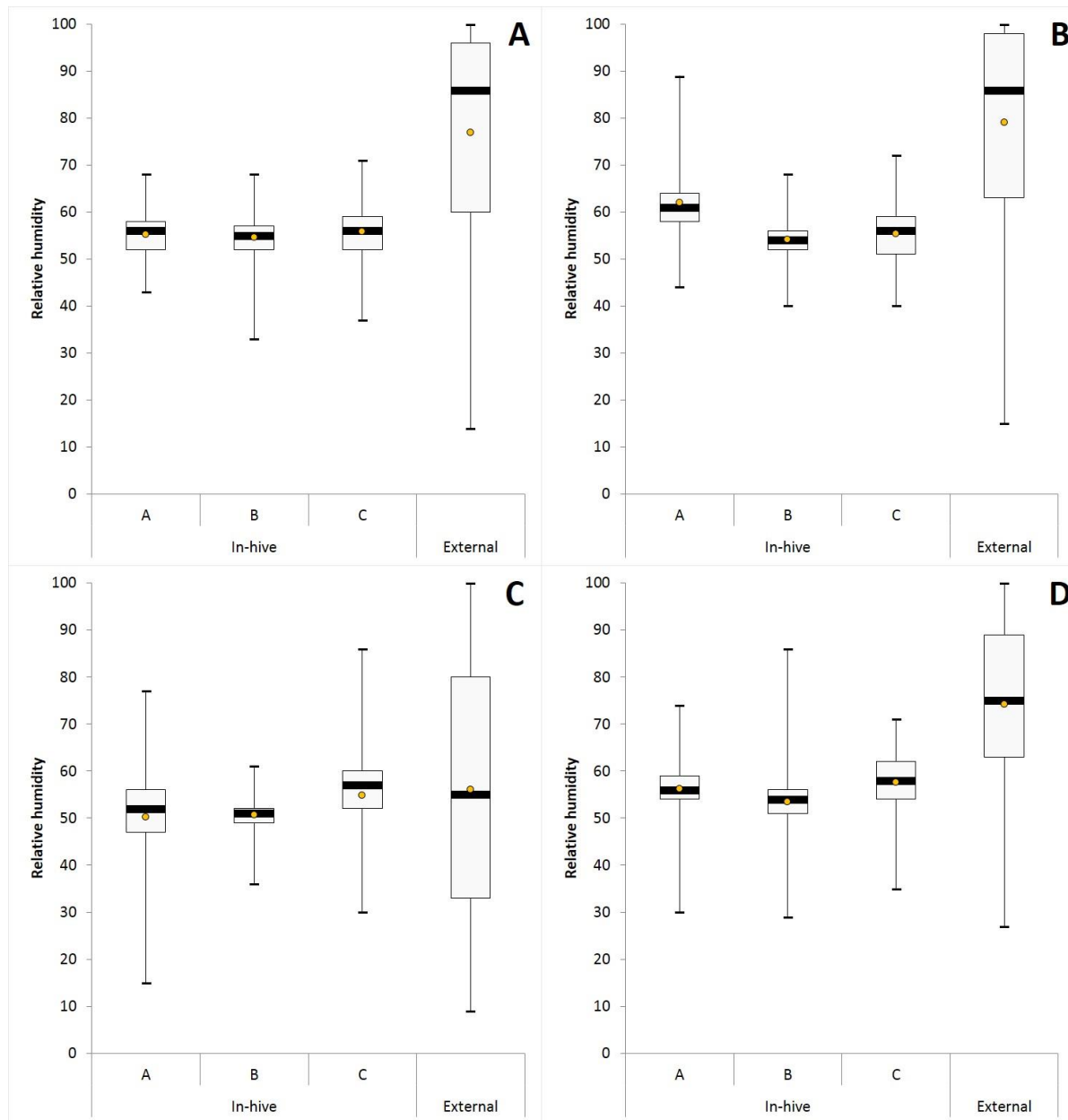


Figure III-S7 : RH levels during summer 2016 for Pontaurmur (A), Rochefort (B), Gimonde (C), and Zavial (D). Box plots: mean (orange point), median (black stripes) with 1st and 3rd quartiles, maximum and minimum values. For each iButton (i.e. A, B, C) of conservation centers, in-hive RH data were calculated using the six beehives, and external RH was calculated using only the external iButton for each conservation center

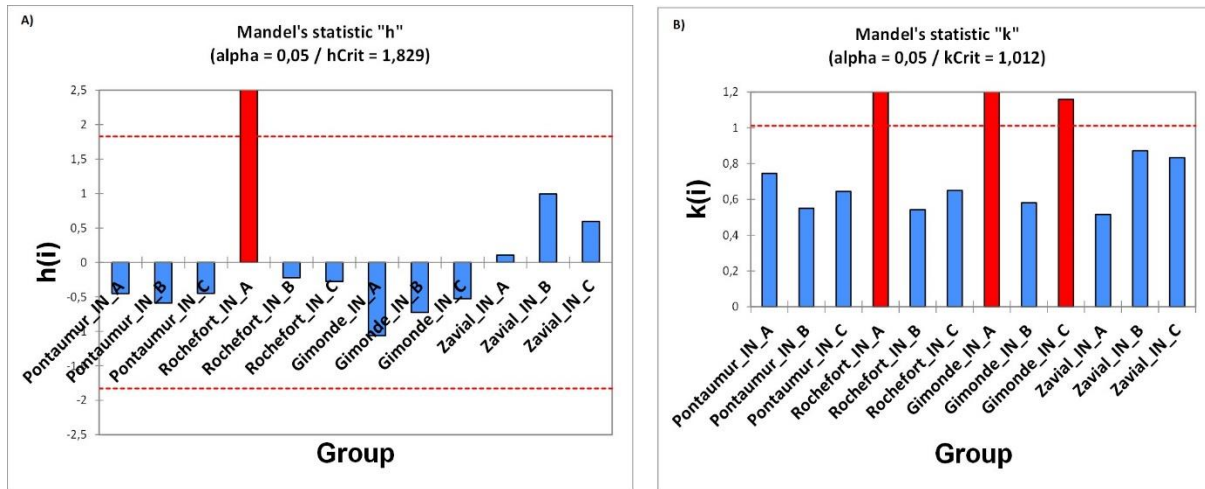


Figure III-S8 : Mandel's graphs showing results of statistical analysis on homogeneity of means (A) and variances (B) of RH measured in hives of the four conservation centers for each iButton (A, B, C) during autumn 2015.

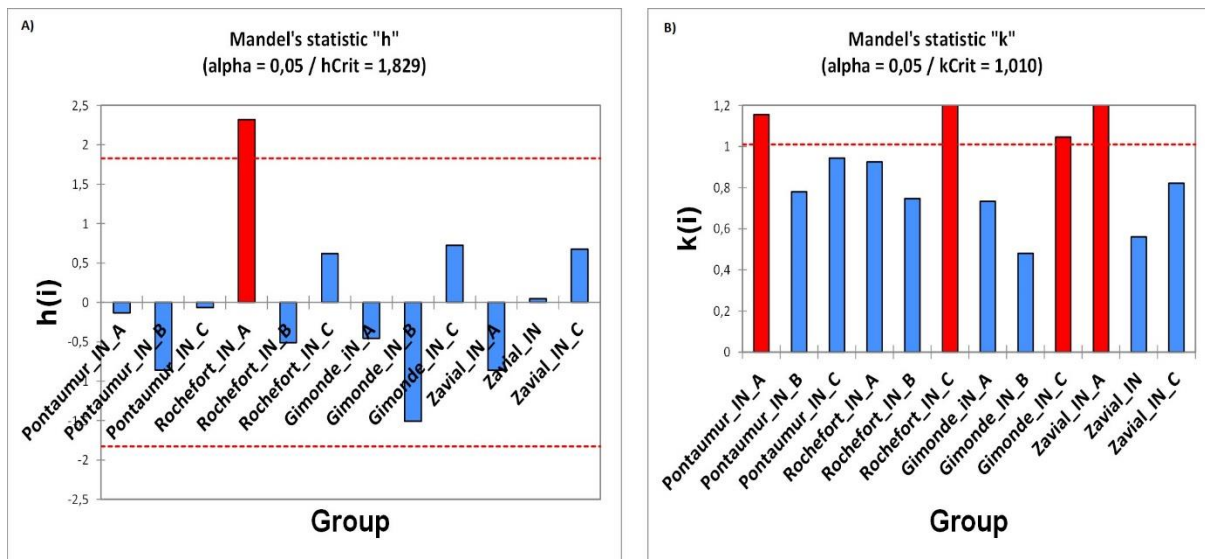


Figure III-S9 : Mandel's graphs showing results of statistical analysis on homogeneity of means (A) and variances (B) of RH measured in hives of the four conservation centers for each iButton (A, B, C) during winter 2016.

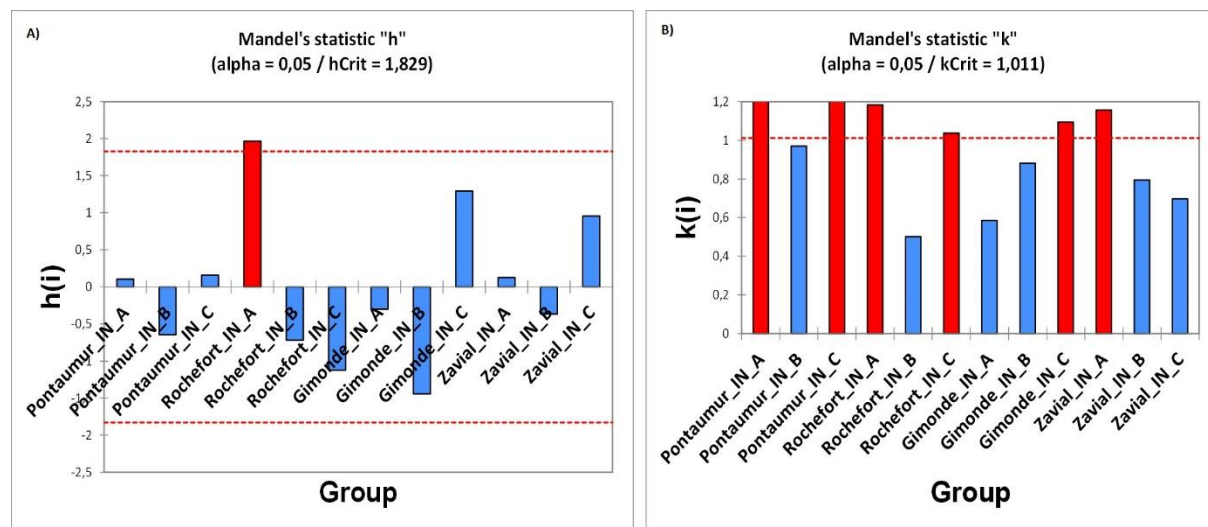


Figure III-S10 : Mandel's graphs showing results of statistical analysis on homogeneity of means (A) and variances (B) of RH measured in hives of the four conservation centers for each iButton (A, B, C) during spring 2016.

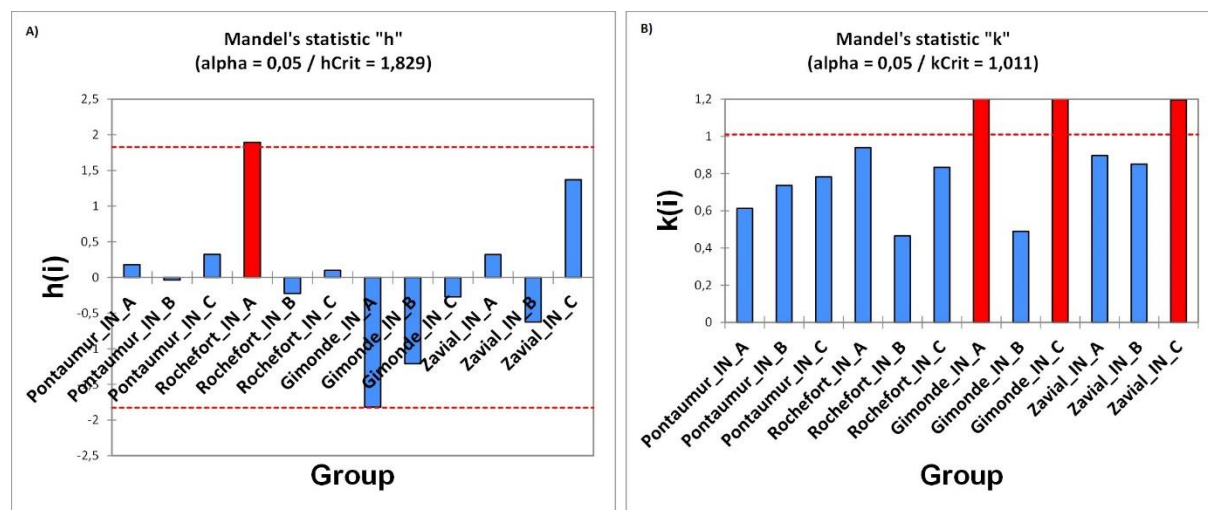


Figure III-S11 : Mandel's graphs showing results of statistical analysis on homogeneity of means (A) and variances (B) of RH measured in hives of the four conservation centers for each iButton (A, B, C) during summer 2016.

Chapitre IV : La charge virale des abeilles est-elle influencée par le temps ou par l'environnement ?

Tous les grands groupes de parasites tels les bactéries, les champignons, les protozoaires et les helminthes, utilisent les insectes comme hôtes. Ces parasites peuvent être influencés par divers facteurs tels que l'environnement ou le comportement de l'hôte, comme par exemple sa capacité à vivre en société. Les virus étant des parasites particulièrement petits, ils sont difficilement identifiables et surtout quantifiables. Chez l'abeille européenne notamment, les virus à ADN sont peu connus, un seul à ce jour a pu être identifié, à savoir le virus filamenteux (FV). Il est intéressant pour les chercheurs et les apiculteurs d'avoir accès à un test peu couteux et rapide qui peut leur donner une information sur la charge virale au sein de leurs colonies d'abeilles. Ici, nous avons cherché à mettre au point un protocole pour faciliter la quantification des virus à ADN de l'abeille européenne. Ce protocole a été mis au point pour quantifier les virus à ADN dans deux compartiments de l'abeille européenne : l'intestin et la tête, grâce à la cytométrie en flux.

Dans un second temps, ce protocole a été appliqué à six ruchers (sites) de nos conservatoires du programme BEEHOPE, pour les mois de juillet, août et septembre 2016. Les données des charges virales ont été analysées afin de comprendre ce qui a le plus d'effet sur la variation de cette charge : l'emplacement géographique ou le temps (i.e. mois). Cette étude, plus concise par rapport aux autres publications rédigées, valide l'intérêt du protocole développé et apporte une première réflexion sur l'effet de l'environnement et du temps sur la structuration des populations de micro-organismes dans nos colonies d'abeilles le long du gradient biogéographique étudié (i.e. du sud du Portugal au nord de la France).

Article 2:

Flow cytometry, an efficient tool to survey the spatio-temporal dynamics of DNA virus load in honeybees.

Iris Eouzan^{1,*}, Jonathan Colombet¹, Hermine Billard¹, Lionel Garnery^{2,3}, M. Alice Pinto⁴, Damien Delalande², Marion Le Henry¹, Sylvie Houte⁵, Andone Estonba⁶, Iratxe Montes⁶, Téséphore Sime-Ngando¹, David G. Biron¹

¹Laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement, UMR CNRS 6023, Université Clermont-Auvergne, Campus Universitaire des Cézeaux, 1 Impasse Amélie Murat, 63178 Aubière cedex, France. ; ²Laboratoire Evolution, Génomes et Spéciation, UMR CNRS 9191, Bâtiment 13, Avenue de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette, France. ; ³Saint Quentin en Yvelines, Université de Versailles, 45 Avenue des Etats-Unis, 78000 Versailles, France.; ⁴Centro de Investigação de Montanha (CIMO), Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Santa Apolónia, 5300-253 Bragança, Portugal.; ⁵Centre d'Etudes Biologique de Chizé, UMR CNRS 7372, Université de la Rochelle, 79360 Villiers-en-Bois, France.; ⁶Department of Genetics, Physical Anthropology and Animal Physiology, University of the Basque Country (UPV/EHU), Barrio Sarriena s/n, 48940 Leioa (Bizkaia), Spain.

1. Abstract

Disturbances of viral community in head and gut of social bees could be linked to sickly colonies and to their decline. We developed and validated a flow cytometry protocol during a survey in six Western European honeybee conservation centers to assess the spatio-temporal dynamics of DNA virus load in bees.

Keywords: flow cytometry, social bees, honeybee, DNA virus, sickly bee colonies

2. Introduction

The bees are key pollinator species in many terrestrial ecosystems, providing pivotal ecosystem services to crops and wild plants (Potts et al., 2010) (Potts et al., 2010). Unfortunately, important declines of wild and domesticated bees have been observed recently in many countries (Potts et al., 2010). The cause is multifactorial, and driven largely by socioeconomic, environmental, and ecological factors (Martin et al., 2012; Potts et al., 2010). For social bees, especially for the domesticated Western honeybee, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae), one of the incriminated factors is viral infection.

Over 24 viruses infecting *A. mellifera* have been discovered to date (de Miranda et al., 2013). Like in many animal viruses, most of the honeybee viruses persist in apiaries as a low-level, occult or

unapparent infection (i.e. no symptoms or pathology) in live individuals. However, overt infections can sometimes occur, which will weaken a colony, or even trigger a collapse (Aubert et al., 2011). The beekeeping community is interested in time- and cost-effective tools for virus diagnosis to be able to examine how and when disturbances of the viral community of social bees may be linked to diseased colonies and to their decline at large scale. Flow cytometry is an efficient, fast and inexpensive method to study and quantify at large scale and landscape level parasites such as DNA viruses. Thus, we developed and validated a flow cytometry protocol during a survey in six Western European conservation centers (figure IV-S1) of honeybees belonging to the M evolutionary branch (*Mellifera*) to assess the spatio-temporal dynamics of DNA virus load in bees.

3. Material and Methods

In each conservation center, six colonies from the sanctuary zone were randomly chosen, and sampled once in July, August and September of 2016. Honeybees were collected from a frame next to the brood area and placed alive in a 50 mL falcon tube. The tubes were stored at -80°C until flow cytometry analysis. We developed a flow cytometry protocol based on (Lepage et al., 2008). From each of the 36 sampled colonies, 27 frozen bees were individually dissected (figure IV-1). The head was cut off and the gut was pulled out of the abdomen, after removal of the sting and the venom bag.

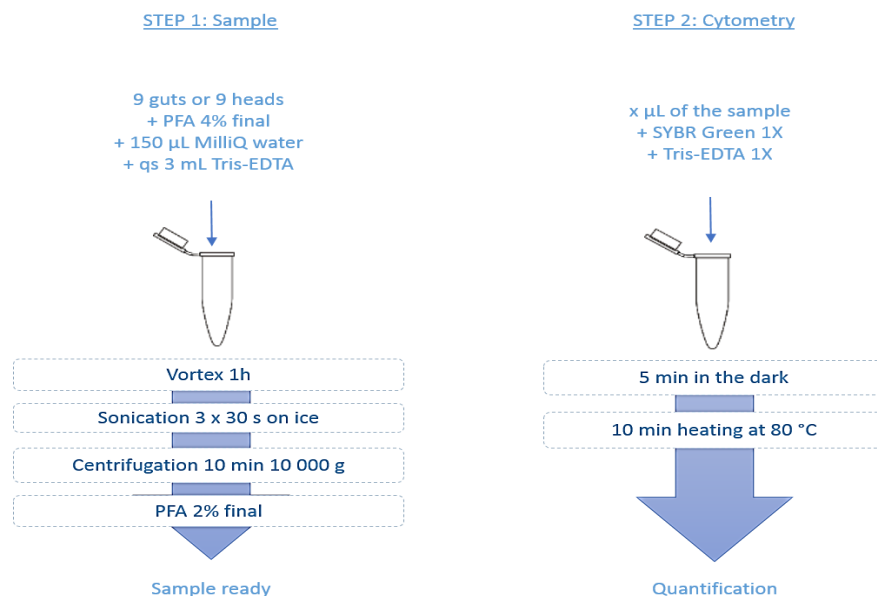


Figure IV-1 : Protocol to estimate the virus load in the guts and heads of the honeybees. This protocol was carried out on the honeybees sampled in July, August and September for each of the six colonies in the six conservation centers.

Three replicates of nine heads and three replicates of nine guts were created per sample, and placed in 15 mL falcon tubes. A volume of 150 μ L MilliQ water, 4% of paraformaldehyde (PFA) and Tris-EDTA was added to each falcon tube until reaching 3 mL. The heads were crushed with a potter. Then the heads and the guts were mixed by vortex for one hour, and sonicated 3 x 30 sec in ice, with 30 sec break between each sonication. All the tubes were centrifuged at 10 000g for 10min, and the supernatant was placed in an eppendorf tube with 2% PFA. Before cytometry analysis, 1, 2 or 20 μ L of the sample, depending on the concentration, was mixed with SYBR Green (1X final) and Tris-EDTA (1X final). The mixture was placed in the dark for 5 min, and then heated at 80°C for 10 min. The quantification was done with FACS Calibur flow cytometer equipped with an air-cooled laser providing 15 mW at 488 nm (Becton Dickinson, Franklin Lake, USA) during 61 sec, with a low flow varying between 10.5 and 12.3 μ L/min. The data were obtained with SSC (side scatter) versus SYBR Green fluorescence (530/30 nm filter, fluorescence channel 1 of the instrument).

The cytograms were analyzed with Cell Quest Pro (Becton Dickinson). The software packages Statistica (Stat Soft Inc.) and XLSTAT (Addinsoft Inc.) were used for the statistical analysis. The data were normalized with a logarithmic transformation. A multiple comparison test was implemented to compare the viral DNA load between conservation centers and sampling months. Two data mining analysis, cluster and MDS, were performed to explore the effect of two factors, geography (conservation center) and time (month), on grouping of the samples. A repeated measured ANOVA followed by a Fisher (LSD) test were done to determine if each factor or their interactions have a significant effect on targeted viruses and which ones induced differences between locations and(or) sampling time.

4. Results and Discussion

The protocol developed herein allowed an efficient isolation of DNA viruses on cytograms regarding the background noise and the elements remained in samples such as bacteria (figure IV-S2). For all samples analyzed, the total abundance of viruses were, on average, one order of magnitude higher in the guts ($7.8 \times 10^5 \pm 5.4 \times 10^5$ virus/mL) than in the heads ($2.0 \times 10^4 \pm 1.1 \times 10^4$ virus/mL), with the highest viral load in the guts sampled in Bilbao in August and September (figure IV-2). The DNA virus load in guts were significantly different (multiple comparison, $p < 0.05$) between locations, excepted for Chizé and Gimonde which were similar. The load appears constant over the months in

the honeybee heads sampled at Champart, Gimonde and Zavial, but was lower in July than in August and/or September at Pontaumur, Chizé and Zavial (multiple comparison, $p < 0.05$).

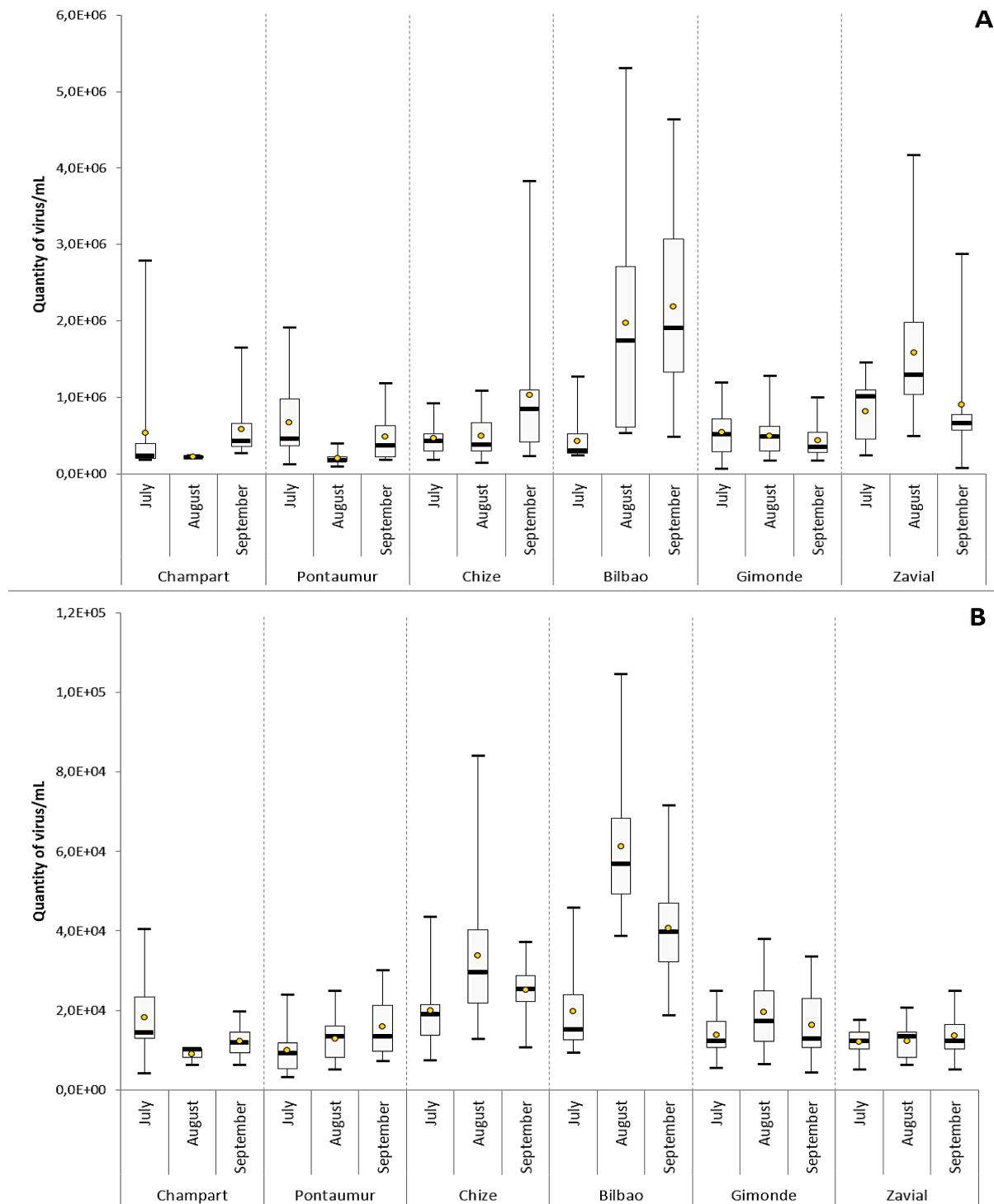


Figure IV-2 : Boxplot representing variance of the virus load in the honeybee's guts (A) and heads (B) in July, August and September in the six conservation centers. Mean virus load is represented by the yellow dots.

The data mining analysis (HC (cluster), figure IV-S3; MDS, figure IV-S4) indicates a grouping of honeybee samples for gut and head compartments according to both location and month. A repeated measured ANOVA test was used to determine the significance of these two factors on virus loads. Both factors had a significant interaction effect ($p < 0.01$) in guts and heads. Overall, the effect of location was higher ($p < 0.001$) and prevailed over the effect of month ($p < 0.05$). Differences between locations were due the higher viral abundances at Bilbao, Chizé and Zavial for gut, and at Bilbao and Chizé for heads (Fisher < 0.05).

The differences due to location can be explained by different factors including climate, landscape, or the presence of other pathogens as microsporidia (Aubert et al., 2011; Bailey et al., 1983). We considered that our proposed protocol provides a robust proxy for health status between honeybee populations, and could also be used for insects in general. Indeed, DNA viruses are widely present in insects and may cause important diseases (Vega and Kaya, 2012). Comparison of virus loads by flow cytometry appears as a useful tool to improve our understanding of the spatio-temporal dynamics of bee viruses in honeybees and in other insects. Moreover, cytometry allows the sorting of certain elements (Macey, 2007), which can be a non-negligible asset for the isolation of particular viruses and their subsequent identification and study with other methods, such as electron microscopy or MinION sequencers. As only one DNA virus has been described in *Apis mellifera* to date, namely the large filamentous virus (de Miranda et al., 2013), our proposed protocol would be useful to explore if other DNA virus are living in honeybee colonies, thereby increasing our ability to address scientific questions related to the environmental issues.

Acknowledgments

We thank the beekeepers and the conservation centers who helped in the sampling. This work was supported in part by the research project BEEHOPE funded by the European call for projects 2013-2014 BiodivERsA / FACCE-JPI from research agencies of France (ANR-14-EBID-0001), Spain (PCIN-2014-090) and Portugal (BiodivERsA / 0002/2014, *Fundação para a Ciência e Tecnologia*). I. Eouzan is financed by a doctoral grant from the Ministry of National Education, Higher Education and Research (France).

5. Supplementary data

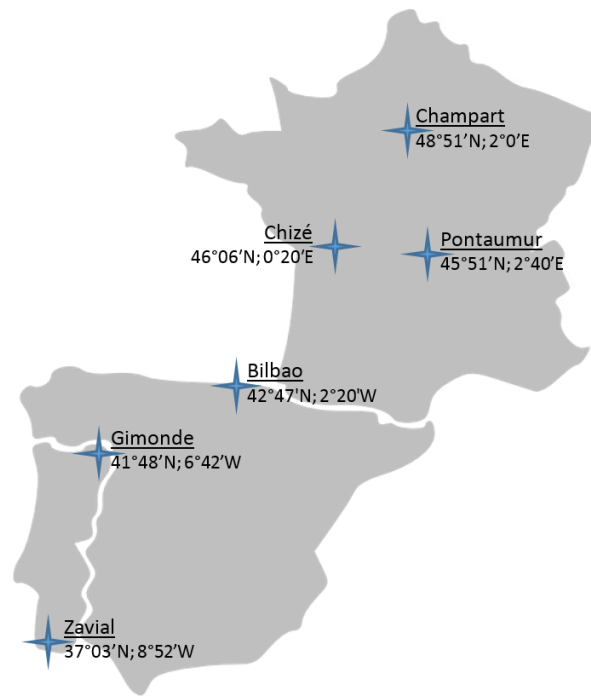


Figure IV-S3 : Sampling locations across France, Spain and Portugal.

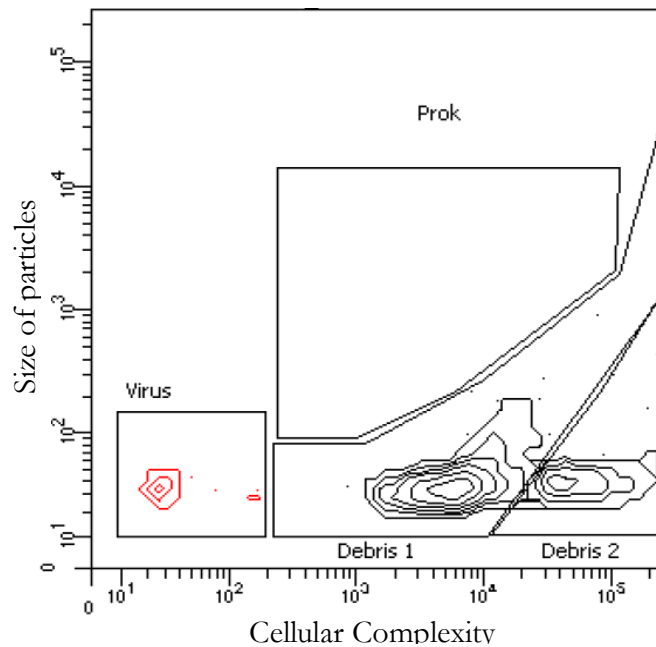


Figure IV-S4 : Example of a cytogram obtained with honeybee samples by using the software Cell Quest Pro (Becton Dickinson), showing the DNA virus populations in red.

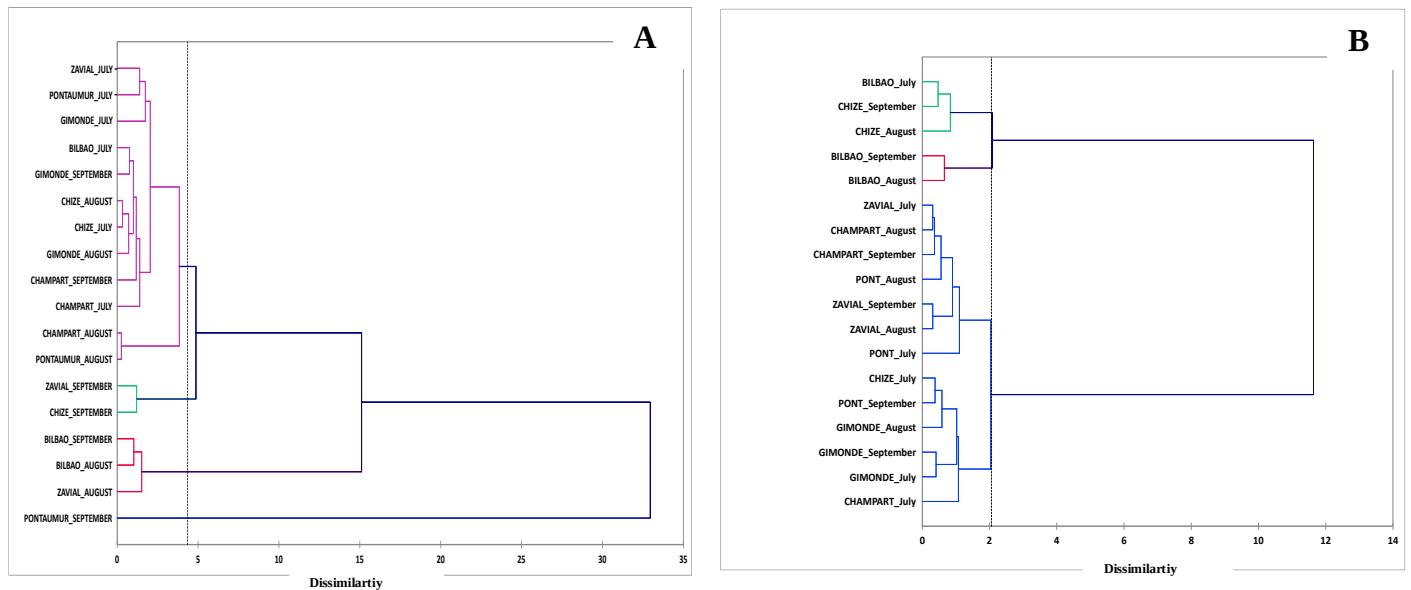


Figure IV-S5 : Dendrogram resulting of the hierarchical clustering analysis for the guts (A) and the heads (B) DNA virus loads done with the matrix of dissimilarities (distance measure: Euclidian; Linkage rule: Ward's method) of all honeybee samples taken in the six conservation centers in July, August and September.

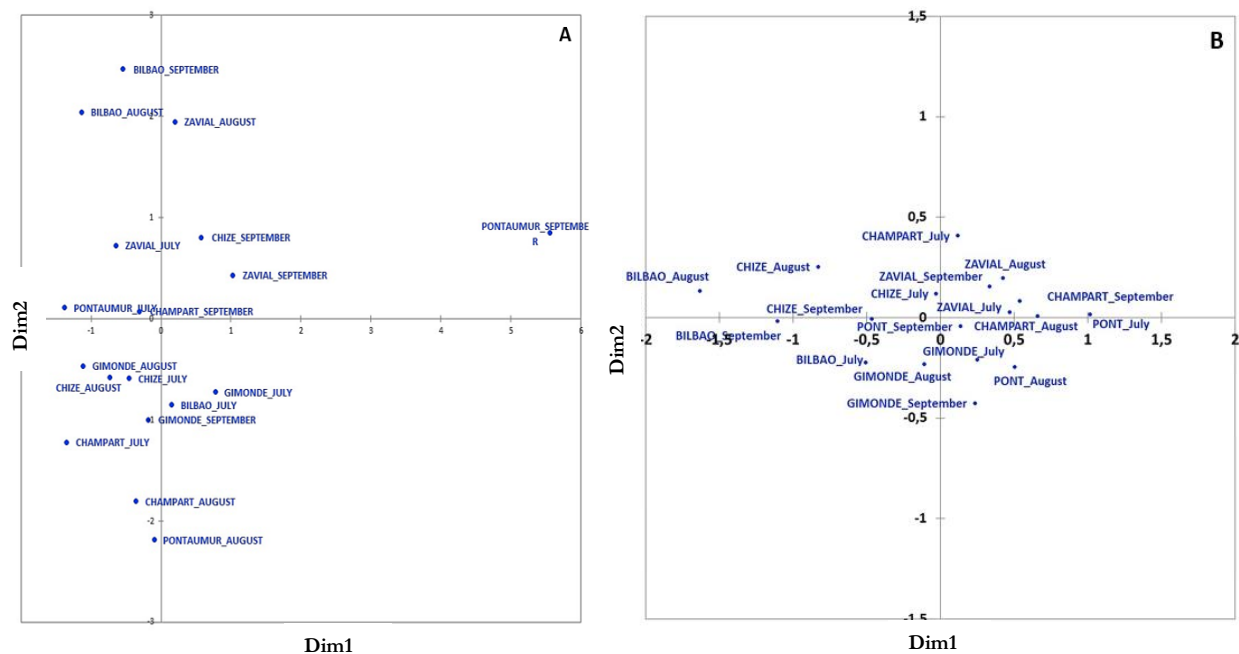


Figure IV-S4 : MDS graphs resulting of the analysis for the gut's (A) and the heads (B) DNA virus loads done with the matrix of dissimilarities (distance measure: Euclidian) of all bee samples taken in the six conservation centers one a month in July, August and September 2016.

Chapitre V : Biogéographie, génétique et temps : quel impact sur la structuration du microbiote des abeilles ?

Le microbiote intestinal correspond à l'ensemble des micro-organismes (archées, bactéries, protistes, champignons mais également virus) se situant dans le tractus digestif de l'animal hôte. Ce microbiote est d'une importance capitale puisqu'il contribue à la santé de l'hôte à travers différents processus tels que la synthèse de vitamines dites essentielles, à la lutte contre certaines maladies, ou encore à la digestion du bol alimentaire. Depuis que le rôle important de ces micro-organismes a été observé, de nombreuses études ont été menées sur des hôtes très diversifiés afin de comprendre quelles fonctions remplissent chacune des espèces et quels sont les facteurs qui influencent le plus la présence de celles-ci.

Ici, nous nous sommes concentrés sur une seule catégorie de micro-organismes : les bactéries. Nous avons réalisé une amplification de l'ARNr 16S contenu dans les intestins des abeilles de nos conservatoires et afin de les analyser grâce à la métagénomique. Après avoir identifié les familles et genres bactériens de nos échantillons, nous avons cherché à comprendre quels paramètres influencent le plus ces communautés bactériennes : la génétique (i.e. l'haplotype des abeilles), la biogéographie (i.e. le climat, le paysage, le conservatoire et le pays) ou le temps (i.e. trois mois consécutifs en été). Les résultats obtenus apportent des résultats intéressants quant à l'effet de chacun de ces paramètres, et ouvre la porte à de nouvelles réflexions permettant de comprendre comment les communautés bactériennes des insectes sociaux se structurent.

Article 3:

**The role of biogeography, genetics and time
in shaping diversity of honeybee gut microbiota**

Iris Eouzan^{1,*}, Ana Marta Muñoz², Arnaud Cougoul³, Lionel Garnery^{4,5}, Maria Alice Pinto⁶, Damien Delalande⁵, Sylvie Houte⁷, Andone Estonba², Iratxe Montes², Patrick Gasqui³, Xavier Bailly³, Télesphore Sime-Ngando¹, David G. Biron¹

¹Laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement, UMR CNRS 6023, Université Clermont Auvergne, Campus Universitaire des Cézeaux, 1 Impasse Amélie Murat, 63178 Aubière cedex, France;

²Department of Genetics, Physical Anthropology and Animal Physiology, University of the Basque Country (UPV/EHU), Barrio Sarriena s/n, 48940 Leioa (Bizkaia), Spain; ³Institut National de la Recherche Agronomique, UMR 346 Épidémiologie des maladies animales et zoonotiques, Saint Genès Champanelle, France; ⁴Laboratoire Evolution, Génomes et Spéciation, UMR CNRS 9191, Bâtiment 13, Avenue de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette, France; ⁵Saint Quentin en Yvelines, Université de Versailles, 45 Avenue des Etats-Unis, 78000 Versailles, France; ⁶Centro de Investigação de Montanha (CIMO), Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Santa Apolónia, 5300-253 Bragança, Portugal; ⁷Centre d'Etudes Biologique de Chizé, UMR CNRS 7372, Université de la Rochelle, 79360 Villiers-en-Bois, France.

1. Abstract

Many studies have been conducted recently to understand the effect of different eco-ethological, environmental or genetic factors on the microbiota communities of many animals. They showed that factors such as diet or environment have a significant effect and contribute through the microbiota to the host health. Here, a metagenomic survey (16s rRNA) was done on the gut microbiota for 36 beehives of the M evolutive lineage (i.e. the black bee and the Iberian bee) along a geographic gradient from southern Portugal to northern France. We analyzed the effect of genetic (i.e. beehive haplotype on DNAMt), environmental (i.e. country, climate, apiary, landscape) and temporal (i.e. three months during summer) factors to decipher which one(s) contribute(s) to the structure and diversity of the bacterial populations present in these honeybee's guts. Our samples contained bacteria mainly belonging to the proteobacteria phylum, represented in large quantities by the genera *Sphingomonas* and *Snodgrassella*, and the French conservatories appeared to have the biggest alpha diversity. Although all factors had a significant effect on bacterial communities' structure, the conservatory, beehive DNAMt haplotype and landscape had the biggest effect. However, when we considered the interactions, the time appeared to increase greatly the effect of the conservatory alone. Our data suggest that diet is

also an important factor. Moreover, these data provide a better understanding of the effect of several factors such as genetics, which are not well addressed in the literature, and open new perspectives to better understand the relationship between the host's environment and its microbiota.

Key words: biogeography, genetics, DNAm, gut microbiota, black bee, Iberian bee

2. Introduction

Animal guts contain diverse microbial communities that are often dominated by bacteria but also include archaea, viruses, protozoa and fungi (Sommer and Bäckhed, 2013). This microbiota has an important role in different processes such as digestion, detoxification of harmful molecules, immunity or resistance to infectious diseases (Engel and Moran, 2013; Flint et al., 2012; Hooper et al., 2012). Studies have been multiplied to understand which factors influence the structuration of gut microbiota. They have so far shown the importance of various factors on gut microbial diversity. In mammals, many studies showed that host's genetics, diet but also geography has a strong influence on ecological and diversity patterns of microbial gut communities in humans (Gupta et al., 2017; Ley et al., 2005, 2006) but also other mammals (Linnenbrink et al., 2013; Ochman et al., 2010; Phillips et al., 2012). It is also the case in animal groups like reptiles (Lankau et al., 2012) or even fishes, in which microbiota patterns also show variations according to the water salinity or the trophic level of the host (Sullam et al., 2012).

Regarding insects, the host's ecology, species, diet, or even sex plays a key role in shaping ecological and diversity patterns of gut microbiota (Jones et al., 2018; Kwong et al., 2017; Santo Domingo et al., 1998; Van Treuren et al., 2015; Yun et al., 2014). Insects are easy to study, as they contain relatively few microbial species compared to mammals (Engel and Moran, 2013). Besides, the microbiota of eusocial insects like honeybees, *Apis mellifera* (Linnaeus 1758) (Hymenoptera, Apidae), has some similarities with that of mammals, while being of simpler composition (Kwong and Moran, 2016). These important pollinators have a digestive tract microbiota composed of highly specialized bacteria including Firmicutes, Actinobacteria, α - and γ -Proteobacteria, that are mainly transmitted by contact between workers in the hive (Anjum et al., 2018; Engel et al., 2012; Kwong and Moran, 2016; Kwong et al., 2017; Martinson et al., 2011; Moran et al., 2012).

Some rare studies have shown that bees' genetic diversity can directly influence the diversity patterns of their microbial gut communities (Mattila et al., 2012), just like geography (Hroncova et al., 2015). To our knowledge, no studies comparing the effects of host's geographic position and its genetic origin along a geographic gradient have been carried out to understand which of these factors most impacts the shaping of the diversity patterns of honeybee microbiota. In our survey, worker honeybees were sampled from 36 different beehives (i.e. six hives by apiary) along a geographic gradient from southern Portugal to northern France, and their microbiota were analyzed thanks to Illumina 16S rRNA sequencing. Genetic analysis on bee workers DNAm were done to determine the evolutive lineage of each beehive and their haplotype, in order to assess the effect of genetic (i.e. beehive DNAm haplotype) and environmental (i.e. country, climate, apiary, landscape) factors. Those factors were analyzed in order to understand which one(s) contribute(s) the most to the structure and diversity of the bacterial populations observed along a geographic gradient of the M evolutive lineage and for two honeybee subspecies, the black bee *Apis apis mellifera* and the Iberian bee *Apis apis iberiensis*.

3. Material and methods

3.1. Sampling

The study was conducted in six conservation centers in West-Europe to study *A. m. mellifera* in France and Spain, and *A. m. iberiensis* in Portugal. The French conservation centers are located at Champart in the region of "Ile-de-France", Pontaumur in the region of "Auvergne-Rhône-Alpes" and Chizé in the region of "Nouvelle-Aquitaine". The Spanish conservation center is located at Bilbao, in the region of "Bizkaia". The Portuguese conservation centers are located at two latitudinal extremes of the country, Gimonde and Zavial, in the regions of "Trás-os-Montes" and "Algarve", respectively (figure V-1).

In each conservation center, six healthy beehives were randomly sampled for this study. The bees were collected directly on a frame near the brood in July, August and September 2016, in a 50 mL falcon tube. About fifty bees were collected in each sampling. The tubes were then frozen at -80°C until DNA extraction, and only one bee per sample was putted in 90° ethanol for DNAm genetic analysis.

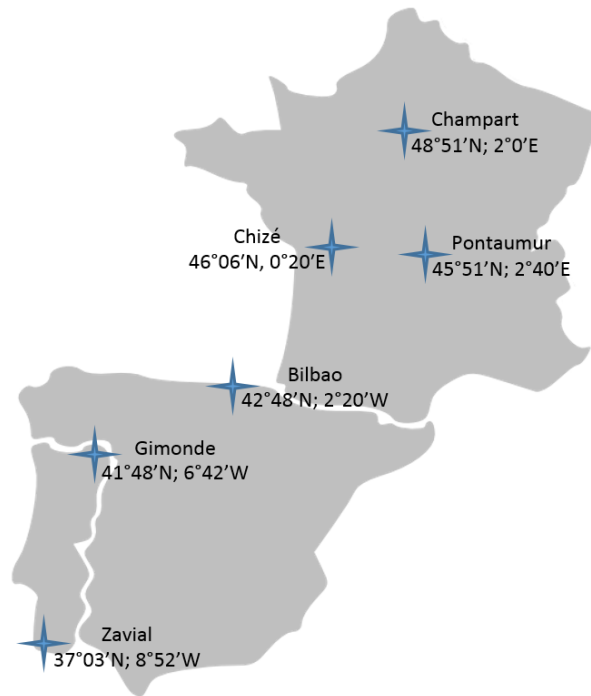


Figure V-1 : Sampling locations across France, Spain and Portugal.

3.2. Environment

We classified our colonies according to three environmental parameters: beekeeping's landscape, climate and country. Pontaumur, Bilbao and Gimonde are “mountain beekeeping”, whereas Chizé and Zavial are “plain beekeeping”. The last one, Champart, was classified as “forest beekeeping”. The climate was defined according to the region where the beehives are. Thus, Champart, Chizé and Bilbao have an oceanic climate, Pontaumur has a continental climate and Gimonde and Zavial are in a Mediterranean climate.

3.3. Genetic analysis

According to morphometric, genetic, physiological and behavioral studies, honeybee subspecies are divided into four evolutionary lineages: A (African), M (West-Mediterranean), C (North-Mediterranean) and O (Turkey and Caucasus) (Miguel et al., 2007, 2011; Ruttner, 1988). Lineage A corresponds to subspecies found in Africa, M to Western European subspecies (i.e. the black bee *A. m. mellifera* and to the Iberian bee *A. m. iberiensis*), group C to the subspecies living in Eastern Europe

(e.g. *A. m. carnica*, *A. m. ligustica*), and group O includes subspecies present in Turkey and the Caucasus (Han et al., 2012). In total, there are currently 26 subspecies of *A. mellifera* (Miguel et al., 2011).

DNAmt is a circular molecule contained in the mitochondria of cells. Unlike nuclear DNA, the transmission of this molecule is only maternal. In the honeybee, the DNAmt has therefore a very strong colony marker power since all workers of a same colony have the same mother, the queen. Thus, the study of a single bee is sufficient to characterize the colony. The maternal transmission of the molecule makes it a particularly suitable marker for the determination of the maternal origin of a colony and of the queen. This test permits to characterize on the one hand the evolutionary lineage (M, A, C and O) of each colony, but also to study the intra-lineage polymorphism among all the haplotypes observed, those that may possibly correspond to local variants.

The intergenic COI-COII region of DNAmt was studied according to the protocol described by (Garnery et al., 1993) to identify the evolutive lineage. The intergenic region, COI-COII is amplified by PCR (Polymerase Chain Reaction) using two primers (E2: 5'-GGCAGAATAAGTGCATTG-3', H2: 5'-CAATATCATTTGATGACC-3') developed by (Garnery et al., 1992). The PCR products are then deposited on 1.4% agarose gel and electrophoresed. Finally, to characterize the beehive haplotype, the amplified products obtained are subjected to a digestion by the restriction enzyme *DraI*. Restricted DNA fragments were separated on 5% and 10% acrylamide gels and stained with ethidium bromide.

3.4. Metagenomic 16s RNA analysis

3.4.1. DNA extraction

Only the bees' guts were used for DNA extraction. For each sample, three replicates of nine bees each were dissected: on ice, the sting was pulled out of the bee with tweezers, and the whole gut was putted in a Tenbroek Potter homogenizer. Each replicate was crushed about twenty times in 1.5 mL phosphate buffer. The obtained supernatant was centrifuged at 8 000 rcf, at 4°C, during 10 min. The Tenbroek Potter homogenizers were washed between each use under water, filled with 2% steranos solution for 30min, rinsed with 90% ethanol and dried before next use. The DNA extraction was made using QIAamp DNA Mini Kit following the manufacturers' guidelines.

3.4.2. Pyrosequencing of the 16S rRNA gene and sequence processing

The 515F-806R primer pair spanning the V4 region of the bacterial 16S rRNA gene, located in the SSU, was used to determine the bacterial community present in the samples. These primers contained in the forward primers a 12 bp barcode sequence to identify each sample (“Earth Microbiome Project”; <http://www.earthmicrobiome.org/>). These primers are used to amplify prokaryotes (but they also amplify mitochondrial and chloroplast DNA), and give a ~291 bp amplicon. The following conditions were used for the V4 region amplification PCR: 0.3 µL Taq polymerase (Go Flexi Promega Taq), 5 µL of Taq Buffer (5x), 2 µL of MgCl₂ (50mM), 2 µL of 2.5 mM dNTPs, 0.5 µL of each primer (10 µM), 1 µL of extracted DNA (15-60 ng/µL), and bidistilled water to reach a total volume of 25 µL. The PCR program was the following: initial denaturing step at 95 °C for 4 min; 35 cycles of 15 secs at 95 °C, 30 sec at 50 °C, 30 sec at 72 °C; and a final elongation step at 72°C for 2 min. The PCR products were then checked on a 1.5% agarose gel stained with ethidium bromide. The CleanPCR kit (Cleanna) was used using magnetic beads for DNA purification of the samples. The quantification of purified DNA was made using Qubit™ v2.0 (ThermoFisher Scientific) and the samples were normalized into an 8 pM pool. The paired-end sequencing of the pool was carried out on an Illumina MiSeq sequencer at the Sequencing and Genotyping Unit of the University of the Basque country (SGIKER) using the kit v2 PE 2 x 150 bp (300 cycles); 10% of PhiX were added as external control of the sequencing process.

3.4.3. Data analysis

The paired-end reads were trimmed with sickle-quality-based-trimming (Sickle v1.33; Joshi & Fass, 2011), and merged using PEAR v0.9.10 (Zhang et al., 2014). Hereafter, the sequences were processed by QIIME v1.9 pipeline (Caporaso et al., 2010). The following scripts were then sequentially run: `split_libraries_fastq.py` for demultiplexing the samples, maximum number of errors in barcode = 0, and quality filtering with a Phred quality score ≥ 20 . Taxonomy was assigned using `pick_open_reference_otus.py`, with default settings, for 97% OTU (operational taxonomic unit) clustering. The chloroplast and mitochondrial sequences and OTUs with frequency lower than 10 were filtered, as well as the samples with less than 5000 reads.

Shannon and Chao1 indexes for the alpha diversity were calculated with R v.3.5.1 software (*phyloseq* package). The OTU-table was normalized using DESeq2 command, before calculating the Bray-Curtis and Unifrac distance matrix at the OTU scale. The beta diversity was represented by a non-metric

multidimensional scaling (NMDS) projection based on the resultant Bray-Curtis matrix (R; *phyloseq* package). Finally, Bray-Curtis and weighted UniFrac distances were used in order to do a NPMANOVA statistical analysis. The Non-parametric MANOVA (NPMANOVA, (Anderson, 2001), also called Adonis in the vegan R package and QIIME) is a non-parametric analyses of variance that has been used to test for differences in microbial community composition. The tested factors for this NPMANOVA analysis were: conservatory, beehive DNAmT haplotype, landscape, country, climate and month. Different models were calculated for these two distances, to combine the effects of some parameters on the microbiota diversity.

4. Results

4.1. Genetic analysis

Thanks to the mitochondrial DNA analysis, we were able to classify our bee colonies into ten different DNAmT haplotypes, belonging to three lineages: A, C and M (table V-1). Five bee colonies (in Champart and Chizé) appeared to be C lineage, whereas Gimonde and Zavial have only A lineage. The Portugal is a South-North cline with unparalleled levels of haplotype diversity and complexity specific to this country and to the M lineage resulting from the coexistence of African (A) and western European (M) lineages (Cánovas et al., 2011; Franck et al., 1998). Some haplotypes were found in more than one conservatory (C1, M4, A1), whereas the others only appeared in one sanctuary and for some of them only in one colony (M11, M17, A2).

Table V-1 : Information about each conservatory, and used for the statistical analysis.

<u>Conservatory</u>	<u>Country</u>	<u>Climate</u>	<u>Landscape</u>	<u>Haplotypes</u>					
				<u>Hive 1</u>	<u>Hive 2</u>	<u>Hive 3</u>	<u>Hive 4</u>	<u>Hive 5</u>	<u>Hive 6</u>
Champart	France	Oceanic	Forest	C1	C1	C1	C1	M4	M11
Pontaumur	France	Continental	Mountain	M66'	M4	M4'	M4'	M4'	M66'
Chizé	France	Oceanic	Plain	/	M4	C1	M4	M4	M17
Bilbao	Spain	Oceanic	Mountain	M7	M4	M4	M4	M4	M7
Gimonde	Portugal	Mediterranean	Mountain	A2	A11	A1	A11	A1	A1
Zavial	Portugal	Mediterranean	Plain	A1	A1	A1	A1	A1	A1

4.2. Composition of the honeybee gut microbiota for the geographic gradient studied

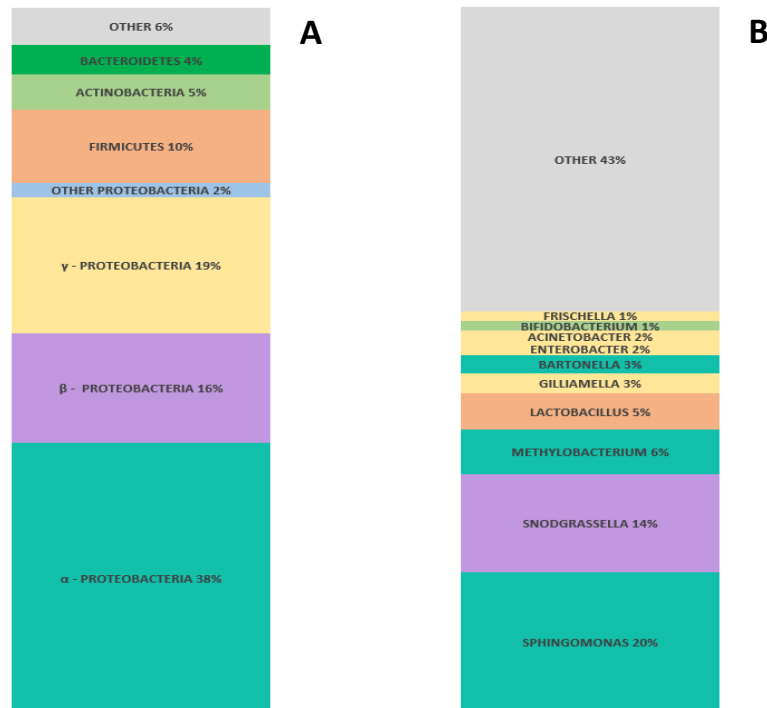


Figure V-2 : Classification phyla-wise (A) and genera-wise (B) of the bacteria found in *A. mellifera* guts of the M evolutive lineage along the geographic gradient from southern Portugal to northern France. The “other” category is represented by phyla and genus that each represent less than 1% of the samples.

The sequencing allowed us to isolate and identify 3 267 OTUs belonging to 24 bacteria phyla and 473 distinct genera. The identified bacteria belong for the great majority to the proteobacteria (75%), firmicutes (10%), actinobacteria (5%) and bacteroidetes (4%) phylum, the other phyla being represented by less than 1% of the bacteria (figure V-2). Among those phyla, the proteobacteria are represented in majority by *Sphingomonas* (20%), *Snodgrassella* (14%), *Methylobacterium* (6%), *Gilliamella* (3%), *Bartonella* (3%), *Enterobacter* (2%), *Acinetobacter* (2%) and *Frischella* (1%), whereas the firmicutes and the actinobacteria are mostly represented by *Lactobacillus* (5%) and *Bifidobacterium* (1%), respectively (figure V-2).

4.3. Alpha and beta diversity

The alpha diversity was calculated using Shannon and Chao1 indexes (figure V-3). The French conservatories (Champart, Pontaurmur and Chizé) have a bigger OTU diversity than the Spanish and Portuguese colonies according to Shannon index. When the singletons are taken into account, the estimated number of species appears lower for Champart, according to Chao1 index.

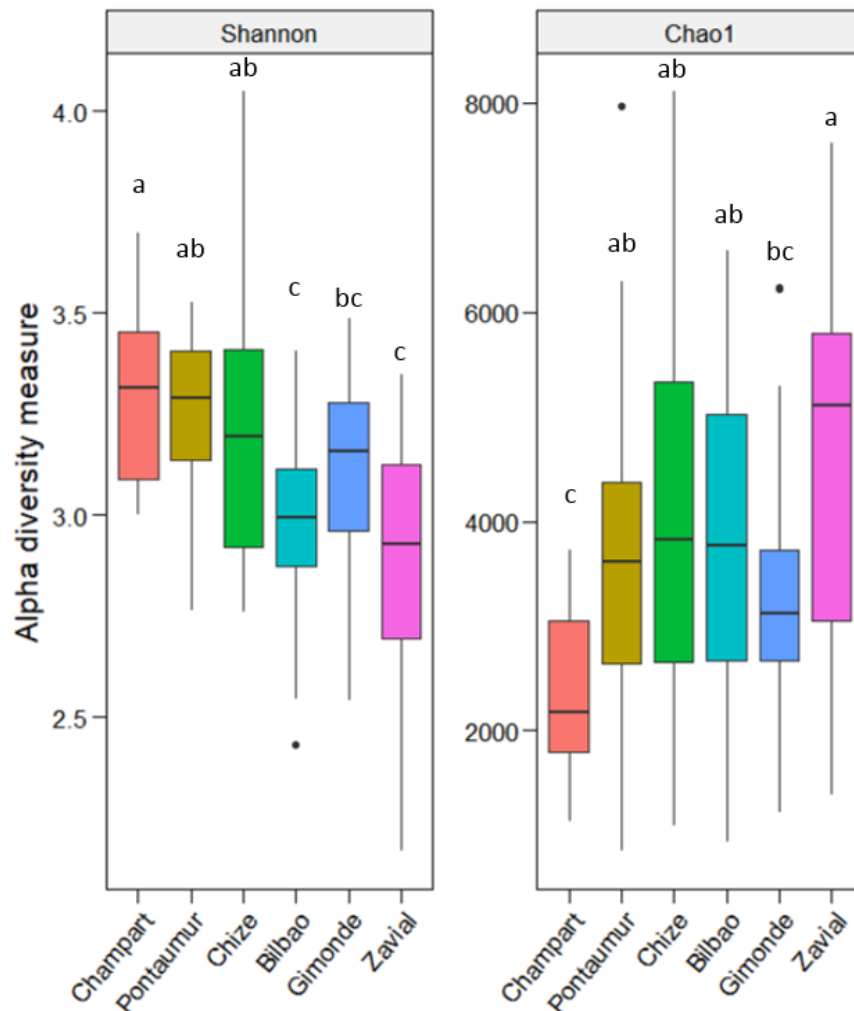


Figure V-3 : Boxplots for the Shannon and Chao1 indexes for the six apiaries (sites) studied and belonging to the M evolutive lineage of the European bee along the geographic gradient from southern Portugal to northern France. For each apiary, data of all six beehives taken one time during three months were putted together. The letters indicate the significance of the differences, plots without letters in common being significantly different (Tukey HSD, $p < 0.05$).

The beta diversity was calculated with the Bray-Curtis matrix and represented with a NMDS projection in figure V-4. Chizé appears to have the biggest diversity variation, whereas Champart has the lowest.

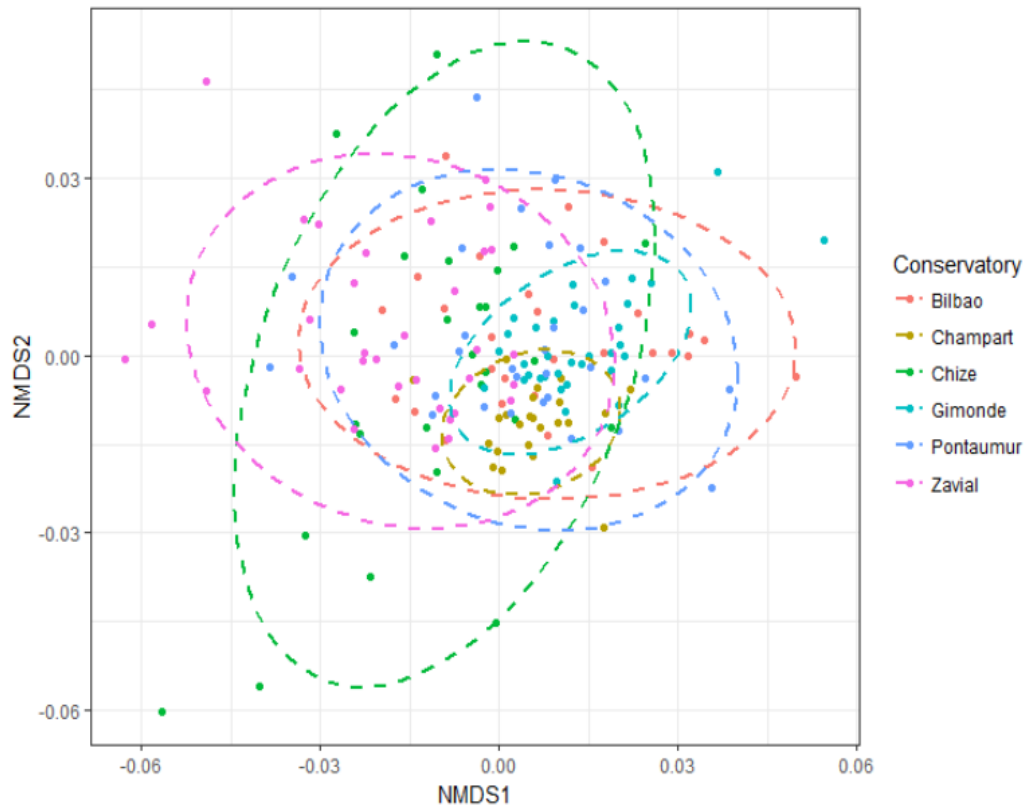


Figure V-4 : NMDS projection of the Bray-Curtis matrix. For each studied apiary (site), the NMDS analysis was done by putting together the data of all six beehives taken one time during three months.

4.4. Comparison of the effects of biogeography and genetic on the microbiota diversity

The NPMANOVA analysis was done using Bray-Curtis and UniFrac distances. The global data were explained for 28% (Bray-Curtis) and 45% (UniFrac) by two axes. The results, calculated on the whole matrixes, are given in table V-2.

Table V-2 : NPMANOVA results for unifactorial and multifactorial analysis made with Bray-Curtis and UniFrac distances. The significance is indicated when $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) or $p < 0.001$ (***).

		Bray-Curtis distance R2 (percent and significance)		UniFrac distance R2 (percent and significance)	
Unifactorial analysis	Conservatory (6 modalities)	17% ***		27% ***	
	DNAMt haplotype (10 modalities)	12% ***		15% ***	
	Landscape (3 modalities)	10% ***		17% ***	
	Country (3 modalities)	6% ***		7% ***	
	Climate (3 modalities)	5% ***		5% ***	
	Month (3 modalities)	2% **		2% *	
model 1:	Conservatory	17.5% ***	Global 19.4% ***	27.4% ***	Global 29.6% ***
	+ Month	2.3% ***		3.0% ***	
model 2:	Conservatory	17.5% ***	Global 29.6% ***	27.4% ***	Global 40.9% ***
	+ Month	2.3% ***		3.0% ***	
	+ Month x Conservatory	10,1% ***		11.3% ***	
model 3:	Conservatory	10.5% ***	Global 24.7% ***	17.2% ***	Global 34.9% ***
	+ Month	2.3% ***		3.0% ***	
	+ DNAMt haplotype	5.3% **		5.3% **	
model 4:	Landscape	11.1% ***	Global 17.7% ***	18.9% ***	Global 26.2% ***
	+ Climate	5.0% ***		5.7% ***	
	+ Month	2.4% ***		3.2% **	
model 5:	Landscape	11.1% ***	Global 26.5% ***	18.9% ***	Global 35.8% ***
	+ Climate	5.0% ***		5.7% ***	
	+ Month	2.4% ***		3.2% ***	
	+ Month x Landscape	4,0% ***		4.2% ***	
	+ Month x Climate	4.7% ***		5.1% ***	
model 6:	Landscape	8.5% ***	Global 23.5% ***	14.0% ***	Global 32.2% ***
	+ Climate	0.7%		0.4%	
	+ Month	2.4% ***		3.2% ***	
	+ DNAMt haplotype	5.7% ***		6.0% **	

The unifactorial analyzes show that the conservatory explains most the variability of the bacterial communities (17% for Bray-Curtis, 27% for UniFrac). Only climate, country and month explain less than 10% of variability. However, all the factors are significant (NPMANOVA, $p < 0.05$ %, R function Adonis).

Some confounding factors could not be putted together with conservatory: landscape, country and climate. Thus, different models were created, to take them into account separately and to test the interactions. Three models were created with the conservatory, and three with landscape, climate and

country instead. By adding the interactions, we better explain the diversity, especially the interaction month * conservatory which explains about 30% of the total variability in the case of Bray-Curtis and 41% for weighted UniFrac. Globally, analyzes realized with UniFrac distances explain the greatest variability regarding to Bray-Curtis.

5. Discussion

In this study, many factors were taken into account: conservatory, DNAm haplotype, landscape, country, climate and time (three consecutive months during summer). The DNAm genetic data provide a first information on the diversity and purity of honeybee colonies inside the conservatories in which local bee imports are prohibited, as well as transhumance. This DNAm analysis should be completed by microsatellite DNA analysis to determine the population structure in each conservatory, and also the introgression level by non-native honeybee sub-species for the geographic area studied (Miguel et al., 2007). Thus, the high proportion of C1 haplotypes in the Champart conservatory, and less in the conservatory of Chizé, suggest the presence of apiaries with C lineage around a preservation centers, for instance *A. mellifera ligustica* or *A. mellifera carnica*, honeybees whose import into France are common (Chávez-Galarza et al., 2017; Franck et al., 2000).

In addition, the strong presence of the C lineage in France has been described many times, as well as that of lineage A in the Iberian region (Franck et al., 1998). The haplotype A1, very present in our conservatories of Portugal, is present in the populations of the subspecies *A. m. sicula*, a hybrid bee with a strong presence in Sicily (Franck et al., 2000). This haplotype is also the only one detected in the hives of Zavial, a haplotype very present in the south of the country where there are only two haplotypes: A1 and A2 (Chávez-Galarza et al., 2017). On the contrary, the northern part of the country has much more genetic diversity, a phenomenon that we see in the conservatory of Gimonde (Chávez-Galarza et al., 2017). This low diversity in Zavial is also reflected by the diversity of microbial communities, since this conservatory, as the one of Bilbao, has a relatively low specific diversity compared to others. However, diversity increases when the OTUs that are weakly present (i.e. singletons) are taken into account. This phenomenon explains the classification obtained, which includes a large number of genera representing less than 1% of the samples.

Among the genera present in larger quantities, we found bacteria belonging to the core microbiota of social bees, namely *Bartonella*, *Frischella*, *Snodgrassella*, *Gilliamella*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* and

Sphingomonas (Graystock et al., 2017; Kwong and Moran, 2016). These bacterial groups are particularly necessary for various functions such as immune defense against pathogens, decomposition of carbohydrates or degradation of pollen walls (Engel et al., 2012). According to our results, the shaping of these populations is related to all analyzed factors, the main one being their location at the conservatory scale, the DNAm haplotype, the landscape and the time alone (i.e. month) having a less structuring effect. The environment close to the honeybees seems therefore primordial, a phenomenon reinforced by the weak effect of the climate in our models, and which could be reflected by the food. Indeed, the feeding of bees has a direct effect on their microbiota, either by nectar or by pollen (Anderson et al., 2013; Colman et al., 2012; Saraiva et al., 2015; Yun et al., 2014). Other factors such as altitude or the presence of parasites could also have an impact. Indeed, numerous studies have shown the significant impact of parasites such as *Nosema* (Corby-Harris et al., 2016; Cordes et al., 2012; El Khoury et al., 2018; Hubert et al., 2016), *Varroa destructor* (Hubert et al., 2016, 2017), or other pathogens (Cariveau et al., 2014) on the bacterial communities of the intestinal tract of the honeybee.

Regarding the time (i.e. the month), when the interactions between the factors are taken into account, the month greatly increases the effect of the conservatory alone. These two parameters are therefore closely related despite the chosen period, which takes into account only three consecutive months. July, August and September are important months for the colony's structure, which prepares for the winter by storing reserves and giving birth to the winter bees in September (Clément, 2015). These reserves vary according to the availability of the plants, which vary according to the geographical location but according to the months because of the blooms in particular which vary very quickly. In our data, the evolution of microbial communities is strongly linked to their immediate environment, namely the conservatory and the landscape: the diet could therefore have a great influence in structuring the microbiota. These data are of significant health interest, as the displacement of colonies over a short distance or the development of colonies carrying a DNAm haplotype of interest could favor certain microbiota communities, a key factor of immunity (Fagundes et al., 2012; Koch and Schmid-Hempel, 2011), thereby increasing resistance to certain pathogens.

6. Conclusion

Many studies have recently been conducted to understand the effect of different eco-ethological, environmental or genetic factors on the microbiota communities of many animals (Colman et al., 2012; Gupta et al., 2017; Lankau et al., 2012; Ley et al., 2005, 2006; Phillips et al., 2012; Santo Domingo

et al., 1998; Sullam et al., 2012; Yun et al., 2014). These publications agree that factors such as diet and environment have a significant effect and contribute via the microbiota to the health of the host (Hamdi et al., 2011; Hooper et al., 2012; Ley et al., 2005). Regarding our results, although all factors had a significant effect on bacterial communities' structure, the conservatory, beehive DNAm haplotype and landscape had the biggest effect. Furthermore, the time appeared to increase greatly the effect of the conservatory, bringing these two factors to be the most significant effect when putted together. Our results bring new elements for social bees, whose microbiota is very close to that of bees (Kwong et al., 2017). They make it possible to better understand the effect of several factors such as genetics, which is not much discussed in the literature, but also time. Our results also suggest that many other factors are involved in the structuring of microbial communities, like diet.

Authors' contributions

D.G.B. and L.G. conducted the whole BEEHOPE project. D.G.B., I.E. and J.L.S. collected the data in Pontaumur and conducted the data analysis for all sites studied. T.S.N., I.M., A.E. and S.H. worked on the BEEHOPE project conception and set up. F.F. worked in 2015 on the project and prepared the data analyses that were then used in 2016. M.A.P set up the apiaries in Zavial and Gimonde with C.J.N. and collected the data monthly in these two conservatories. D.D. and L.G. actively participated to the project by taking care of the bees and collecting the data in Rochefort. A.C., P.G. and X.B. helped with the statistical analysis. I.E. and D.G.B. wrote the manuscript. All authors revised and approved the manuscript.

Ethic statement

The study was conducted in six conservation centers created in France, Spain and Portugal to preserve the two native M-lineage subspecies. The conservation apiaries were deployed in private lands after obtaining permission from the owners, and to conduct experiments by them on their sites. This field study granted by a European program, BioDIVERSA ERANET, in favor of preservation and protection of biodiversity, did not involve endangered or protected species. For all locations in France, Spain and Portugal, no specific permission was required, as the apiaries were outside of Natural Parks. We only had to comply for Portugal with the general regulations about distance between apiaries, which is 800 m from the closest apiary (Decree Law n.o 203/2005).

Competing interests

We have no competing interests.

Funding

This work was supported in part by the research project BEEHOPE funded by the European call for projects 2013-2014 BiodivERsA / FACCE-JPI from research agencies of France (ANR-14-

EBID-0001), Spain (PCIN-2014-090) and Portugal (BiodivERsA / 0002/2014). I. Eouzan is financed by a doctoral grant from the Ministry of National Education, Higher Education and Research (France).

Acknowledgements

We thank Noel Mallet, Claude Grenier, Jean-Charles Labat, Céline Robert, Paulo Ventura, Miguel Vilas-Boas, Jonathan Gaboulaud, Cécile Ribout, Jean-François Odoux, Egoitz Galarza and Hélène Legout, who all helped us in the BEEHOPE project.

Discussion et perspectives

1. Bilan de l'ensemble des chapitres de cette thèse

Ce manuscrit de thèse s'articule autour d'articles qui ont pour objectif de présenter chacun un élément de réponse à ma problématique générale : quels sont les effets de facteurs génétiques, biogéographiques et temporels sur la structuration du microbiote de la lignée évolutive M de l'abeille européenne *Apis mellifera* ?

Le premier article était nécessaire afin de bien comprendre l'un des facteurs abiotiques pouvant avoir un impact important sur la santé et le développement de l'abeille européenne et donc d'un superorganisme en général : l'hygrométrie dans le nid (ici la ruche). En effet, si l'on veut comprendre comment les différents facteurs biotiques et abiotiques d'une colonie d'abeilles interagissent, il est nécessaire d'appréhender et connaître l'importance et l'impact de chaque facteur individuellement. Or, l'humidité dans les ruches de l'abeille européenne est un facteur peu étudié. En effet, bien que la capacité d'une colonie à réguler la température au sein de son nid ait été le sujet de beaucoup de publications (Bollazzi and Roces, 2010; Doull, 1976; Heinrich, 1974; Heusner and Stussi, 1964; Jones and Oldroyd, 2006), l'humidité a été moins étudiée en partie car les outils techniques n'étaient pas appropriés pour la mesurer (Buxton, 1932).

Les moyens actuels permettent de mesurer l'humidité avec une précision de $\pm 1\%$. Cela a permis de nombreuses études récentes, montrant la capacité de divers insectes sociaux à réguler l'humidité de leur environnement collectif et l'importance de ce facteur pour leur survie (Buxton, 1932; Cabrera et al., 2015; Doull, 1976; Potts et al., 1984; Woodrow, 1935). Cependant, aucune étude de ce type n'avait à ce jour été menée sur l'abeille européenne *in situ* le long d'un gradient géographique d'une lignée évolutive avec des prises de mesures horaires et analysées à l'échelle d'une journée, d'une saison et d'une année. Le premier article (pages 39-66) de ma thèse permet d'apporter des informations importantes sur la capacité d'hygrorégulation de l'abeille européenne, et ceci pour deux de ses sous-espèces (i.e. l'abeille noire et l'abeille ibérique). En effet, les données que nous avons récoltées ont montré que les abeilles de ces deux sous-espèces maintiennent l'humidité de leur ruche très stable toute l'année, entre 50 et 60 % environ, y compris en hiver lorsque le couvain est absent. Ces données sont légèrement inférieures à l'humidité préférentielle des ouvrières, située aux alentours de 75% (Ellis

et al., 2008). Cependant, l'humidité reste toute l'année au-dessus du seuil nécessaire à l'éclosion du couvain (Doull, 1976). L'humidité de la ruche est un facteur qui pourra être pris en compte, par exemple lors de la réalisation d'autres études *in situ*, notamment sur la santé et le développement d'une colonie d'*A. mellifera*. En effet, des relations ont déjà été établies entre l'humidité et la température dans les ruches (Frouz, 2000), ou encore entre l'humidité et certains parasites. En effet, les variations d'humidité et de température dans l'environnement de l'abeille européenne peuvent impacter la reproduction et le développement du *Varroa* et de microsporidies (*Nosema ceranae*, *Nosema apis*) (Chen et al., 2012; Kraus and Velthuis, 1997).

Par la suite, le deuxième article (pages 69 - 74) se focalise sur les virus à ADN présents dans le microbiote de l'abeille européenne. Les virus d'*A. mellifera* sont variés, 24 espèces sont actuellement connues (de Miranda et al., 2013). Cependant, bien que les virus à ARN de l'abeille européenne soient bien documentés dans la littérature, très peu d'informations sont connues sur les virus à ADN peuplant les colonies de l'abeille européenne. A ce jour, une seule espèce a été identifiée : le virus filamenteux (FV, filamentous virus). La communauté des apiculteurs est intéressée par des outils de diagnostic de virus efficaces, rapides et peu coûteux, permettant de déterminer comment les perturbations de la communauté virale de l'abeille européenne peuvent être liées à des colonies malades et au déclin de l'espèce à grande échelle. La cytométrie en flux est une méthode efficace, rapide et peu coûteuse, permettant d'étudier et de quantifier à grande échelle les parasites tels que les virus à ADN.

Nous avons donc développé un protocole permettant d'utiliser cet outil afin de pouvoir déterminer les charges virales dans les colonies d'abeilles. En effet, la PCR est une approche ciblée et ne permet pas de connaître la charge virale globale d'un organisme en une seule analyse, ni de prendre en compte des organismes inconnus potentiellement présents dans les échantillons. La cytométrie en flux s'est donc révélée être une approche intéressante en raison de son faible coût, sa rapidité, sa facilité d'utilisation et son potentiel exploratoire (i.e. prise en compte de toutes les espèces de virus détectables et identification par la suite à l'aide d'un microscope à balayage électronique ou un séquenceur à ADN (ex. : MinION)) (Ateya et al., 2008). Le protocole a été adapté et développé dans le troisième article (pages 77 - 91).

Dans un second temps, ce protocole a été appliqué à des colonies d'abeilles des conservatoires impliqués dans le projet BioDIVERSA/ERANET « BEEHOPE », afin de déterminer la répartition spatio-temporelle des charges virales dans les têtes et les intestins des colonies de l'abeille noire et de l'abeille ibérique le long d'un gradient géographique du sud du Portugal au nord de la France. La comparaison de l'effet de la localisation (à l'échelle du rucher) et du temps (sur trois mois consécutifs) a montré que les deux paramètres influencent bien cette répartition, mais que la localisation a un effet plus fort. La charge virale est un élément important à prendre en compte pour notre vaste étude car les agents viraux sont des composants très envahissants et en grande partie imprévisibles de l'écologie microbienne des abeilles mellifères, qui ont donc un impact direct sur les communautés bactériennes d'un hôte (Anderson et al., 2011). Les bactériophages représentent par ailleurs les classes d'organismes les plus abondantes et les plus diverses présentes dans toute communauté microbienne et ont la capacité de réguler l'abondance microbienne (Shapiro et al., 2010). La charge virale peut de ce fait être directement liée à la santé des abeilles et au développement de certains microorganismes, qu'ils soient positifs ou négatifs pour l'hôte.

Le troisième et dernier article présenté dans cette thèse regroupe plusieurs facteurs afin de comprendre lequel d'entre eux a le plus d'impact sur la structuration des populations de bactéries présentes dans les intestins des abeilles étudiées le long d'un gradient géographique de la lignée évolutive M (i.e. l'abeille noire et l'abeille ibérique) du sud du Portugal au nord de la France. Cette analyse est intéressante, car elle s'inscrit dans la continuité de plusieurs analyses récentes qui étudient en même temps l'effet de plusieurs facteurs sur le microbiote intestinal d'un hôte (Colman et al., 2012; Gupta et al., 2017; Linnenbrink et al., 2013; Sullam et al., 2012; Van Treuren et al., 2015; Yun et al., 2014). En effet, les populations de microorganismes sont extrêmement instables et varient rapidement lorsqu'un paramètre du milieu est modifié. Les communautés se structurent selon leur environnement, et peuvent varier d'un individu à l'autre pour diverses raisons. Etant donné le nombre de facteurs biotiques et abiotiques qui peuvent avoir une influence sur ces communautés, il devient difficile de comprendre quels facteurs les affectent le plus et lesquels sont moins impactant.

Ici, nous avons pu étudier six facteurs, à savoir la génétique (i.e. la lignée évolutive de chaque colonie et leur haplotype à l'aide de l'ADNmt), le temps (i.e. trois mois durant l'été), l'habitat (i.e. le type de paysage apicole, le climat, le pays et le conservatoire). Nos données ont montré un effet principal du conservatoire. Cependant, cette analyse s'est révélée très intéressante car le temps, qui

joue un rôle faible à lui tout seul (en expliquant seulement 2% de la structuration), a beaucoup d'influence sur l'effet du conservatoire lorsque l'interaction entre ces deux facteurs est prise en compte (jusqu'à 41% de la structuration expliquée). Ce chapitre montre de ce fait la complexité des interactions qui lient les différents paramètres de l'environnement et ouvre la porte sur une réflexion plus profonde. Si la composante du temps, pourtant constituée ici seulement de trois mois consécutifs, interagit autant avec un facteur comme le conservatoire, qu'en serait-il d'une durée plus longue, avec une analyse par exemple se déroulant sur une année complète ? Quel facteur, dans le conservatoire, a créé cette grosse différence par rapport aux autres ? Est-ce la qualité de la nourriture ainsi que suggéré dans l'article présenté ici ? Ou le type de fleurs butinées par les abeilles ? Les pesticides auraient-ils également un impact ? Dans ce cas, quelle serait la part que prendrait le traitement au *Varroa*, donc le placement d'un acaricide directement dans la ruche, réalisé chaque année par la quasi-majorité des apiculteurs ? Ces interrogations sont autant de questions que ce sujet de thèse met en lumière.

En effet, il est important de bien comprendre l'aspect innovant qu'apporte un travail comme celui qui est présenté ici. Jusqu'à récemment, les analyses toxicologiques et environnementales étaient réalisées pour la plupart en prenant les facteurs individuellement. Or, il a été admis depuis que la nature est un environnement comprenant beaucoup de facteurs qui interagissent constamment ensemble. Ainsi, il est dorénavant nécessaire d'être capable de prendre en compte un maximum de facteurs de l'environnement afin de comprendre ce qui se passe et comment les facteurs interagissent. C'est dans ce cadre qu'une première grande analyse est actuellement en cours, afin de rassembler davantage de données du projet BEEHOPE et d'établir les liens, positifs comme négatifs, qui lient différents facteurs biotiques et abiotiques dont les données ont été obtenues dans le cadre de ma thèse et par le projet BEEHOPE. L'objectif d'une telle étude est d'obtenir un réseau d'inter-actants, qui permettra d'avoir une vue globale sur les interactions qui ont lieu entre les facteurs, et de comprendre la part de chaque facteur sur la présence ou l'absence de certaines communautés bactériennes mais également de pathogènes. Par ailleurs, Champart et Rochefort sont deux conservatoires qui sont situés à la même latitude car tous les deux dans le secteur de Gif-sur-Yvette, mais dont le paysage est différent (i.e. respectivement forêt et grande culture). Ainsi, les données récoltées sur ces deux conservatoires pourraient permettre de comprendre l'impact de l'environnement proche, indépendamment de la latitude, sur la structuration des communautés bactériennes dans la ruche ou l'apparition de certains pathogènes.

Le projet BEEHOPE ayant permis d'obtenir une quantité importante de données sur les colonies d'abeilles de la lignée évolutive M (i.e. l'abeille noire, l'abeille ibérique) et leur environnement, de nombreuses valorisations sont attendues à la suite de ma thèse pour publier l'ensemble de ces données et de répondre progressivement à la vaste problématique de ce projet. Les données principales, récoltées dans le cadre de ma thèse et en cours d'analyse, sont présentées ci-dessous.

2. Perspectives à court terme suite aux travaux de ma thèse

Le projet BEEHOPE est un projet qui a permis de récolter une quantité considérable d'éléments concernant quarante-deux ruches issues de sept conservatoires de France, d'Espagne et du Portugal. Ma thèse n'avait pas pour vocation de présenter l'ensemble des données collectées dans le cadre de cette grande étude mais de présenter les premières analyses qui ont pu être réalisées en lien direct avec ma thèse et ainsi que celles qui en découleront. Cette partie de la discussion a pour objectif de présenter l'ensemble des éléments qui ont été relevés durant ces trois années de ce travail de doctorat et qui ouvrent les portes à de belles perspectives, à commencer par l'intégration de ces données à de futures analyses et valorisations.

2.1. Température dans les ruches

La collecte des données de température s'est faite de la même façon que celle des données d'hygrométrie présentées dans le premier article. En effet, les thermo-hygroboutons utilisés dans cette étude ont collecté simultanément l'humidité relative et la température, avec une précision de $\pm 1^\circ\text{C}$. Ces données ont donc été récoltées automatiquement toutes les heures dans l'ensemble des quarante-deux ruches, à trois emplacements dans la ruche mais également à l'extérieur. Le choix a été fait de ne pas présenter la température dans le premier article, afin de concentrer l'article sur une seule information et hypothèse (i.e l'hygrorégulation) : la capacité des abeilles à réguler l'humidité dans leur ruche durant toute l'année. Cependant, les températures obtenues ont été analysées et comparées aux données d'humidité sur une année complète (voir en annexe, par exemple, les résultats du conservatoire de Pontaumur ici en Auvergne, figure A1). La température est un facteur important pour les insectes sociaux car leur développement et leur survie en dépendent directement (Chown and Nicolson, 2004; Jones and Oldroyd, 2006). De nombreuses études ont déjà montré que les abeilles ne font pas exception à cette règle et maintiennent la température de leur ruche entre 32 et 36 °C, notamment lorsqu'il y a du couvain, afin de permettre aux œufs de se développer correctement (Doull,

1976; Jones and Oldroyd, 2006; Jones et al., 2004; Stabentheiner et al., 2010). Par ailleurs, la température a un impact sur le développement de certains pathogènes comme les microsporidies (*Nosema ceranae*, *Nosema apis*) (Chen et al., 2012; Higes et al., 2010). Les informations de températures ayant été obtenues sur une longue période, elles pourront notamment permettre des études complémentaires, comme déterminer quel impact le réchauffement climatique peut avoir sur les colonies d'abeilles (i.e. leur capacité à réguler l'humidité, leur microbiote, ...).

2.2. Virus à ARN et autres agents pathogènes

A travers le deuxième article, nous avons étudié la charge virale des abeilles en ciblant l'analyse sur les virus à ADN. En effet, les virus à ADN sont de taille supérieure aux virus à ARN (Aubert et al., 2011), qui sont par conséquent moins visibles en cytométrie en flux. Cependant, la majorité des virus de l'abeille sont des virus à ARN, de la famille des Picornaviridae et d'une taille avoisinant 30 nm de diamètre (Chen and Siede, 2007). Dans le cadre de ma thèse, nous avons ciblé les sept virus les plus connus et considérés comme participant au déclin actuellement observé chez les abeilles mellifères : ABPV, BQCV, CBPV, DWV, IAPV, KBV et SBV.

Les virus ABPV, KBV et IAPV forment tous les trois un ensemble appelé complexe AKI, puisqu'ils appartiennent tous les trois à la famille des Dicistroviridae et sont souvent difficiles à différencier (de Miranda et al., 2010). Ces trois virus sont mondialement répartis et responsables d'infections généralement asymptomatiques. Ils peuvent cependant être impliqués dans la mort de colonies s'ils sont associés au *Varroa* (Aubert et al., 2011; Di Prisco et al., 2011; Tentcheva et al., 2004). Le virus du DWV est également un virus beaucoup associé au *Varroa*, causant des dommages parfois irréversibles dans les colonies (Dainat et al., 2012b). D'une façon générale, ces sept virus sont connus pour être parfois liés à la présence de parasites tels que *Nosema*, ou pour influencer directement le microbiote de l'abeille (Aubert et al., 2011).

D'autres pathogènes ont également été analysés par PCR (ADN 16S), à savoir les loques européenne et américaine, *Nosema apis* et *N. ceranae*. Ces pathogènes particulièrement virulents sont présents dans le monde entier et sujets à de nombreuses analyses. *N. ceranae* et *N. apis* sont des microsporidies responsables de la nosémose, une maladie qui affecte le tube digestif et peut provoquer des diarrhées et dans certains cas de fortes mortalités dans les colonies (Bailey, 1955). Les loques sont quant à elles des maladies provoquées par des bactéries (i.e. *Melissococcus plutonius* et *Paenibacillus alvei*

pour la loque européenne et *Paenibacillus larvae* pour la loque américaine) qui sont présentes dans le monde entier. Ces maladies provoquent toutes deux de fortes mortalités chez les larves d'abeilles, avec une incidence plus grave pour la loque américaine qui est particulièrement infectieuse (Forsgren, 2010; Genersch, 2010). Les données obtenues suite à l'analyse des abeilles de nos sept conservatoires par RT-PCR et par PCR sont présentées en annexe (figure A2) et feront l'objet d'une ou plusieurs valorisations, par exemple pour réaliser un réseau d'inter-actants regroupant ces données avec l'ensemble des autres données disponibles à ce jour.

Conclusion générale

Ce projet de recherche a mis en lumière des informations importantes concernant l'abeille européenne. Dans un premier temps, nous avons démontré les capacités d'une colonie d'abeilles à réguler de façon stable l'humidité dans sa ruche, que ce soit à l'échelle d'une journée, d'une saison ou d'une année complète. Dans un second temps, un protocole permettant de quantifier rapidement et à faible coût les virus à ADN des abeilles, présents dans la tête comme dans l'intestin, a été développé. Ce protocole a été testé sur les abeilles de nos conservatoires, ce qui a permis de constater que la charge virale varie préférentiellement selon l'emplacement du conservatoire, tandis que le temps a un effet moindre. Enfin, le troisième article présente une analyse des communautés bactériennes de l'abeille afin de comprendre quels paramètres de la ruche (i.e. biogéographie, génétique ou temps) influencent le plus cette structure. Ce travail a mis en lumière l'importance de l'environnement proche des abeilles, notamment à l'échelle du rucher, qui impacte non seulement la charge virale mais également la structuration des communautés bactériennes. La prise en compte d'un plus grand nombre de facteurs biogéographiques dans la dernière étude suggère que l'alimentation pourrait jouer un rôle important pour le microbiote en général des abeilles. Par ailleurs, ces études rappellent l'importance de prendre en compte les interactions entre les facteurs, qui peuvent avoir bien plus d'impact que la simple somme de l'effet de chacun de ces paramètres pris indépendamment. D'autres paramètres ont été collectés dans le cadre de mon travail et permettront prochainement de réaliser une analyse qui prendra en compte un plus grand nombre de facteurs, notamment la température ou encore les virus à ARN. L'ensemble de ces travaux permettront de mieux comprendre à long terme l'effet de facteurs clés sur le développement de certaines communautés de micro-organismes, afin de permettre une meilleure gestion des colonies dans les conservatoires d'abeilles locales.

Références

- Abou-Shaara, H.F., Al-Ghamdi, A.A., and Mohamed, A.A. (2012). Tolerance of two honey bee races to various temperature and relative humidity gradients. *Env Exp Biol* 10, 133–138.
- Abou-Shaara, H.F., Owayss, A.A., Ibrahim, Y.Y., and Basuny, N.K. (2017). A review of impacts of temperature and relative humidity on various activities of honey bees. *Insectes Sociaux* 64, 455–463.
- Aizen, M.A., and Harder, L.D. (2009). The Global Stock of Domesticated Honey Bees Is Growing Slower Than Agricultural Demand for Pollination. *Curr. Biol.* 19, 915–918.
- Alaux, C., Brunet, J.-L., Dussaubat, C., Mondet, F., Tchamitchan, S., Cousin, M., Brillard, J., Baldy, A., Belzunces, L.P., and Le Conte, Y. (2010). Interactions between *Nosema* microspores and a neonicotinoid weaken honeybees (*Apis mellifera*). *Environ. Microbiol.* 12, 774–782.
- Amiri, E., Meixner, M., Nielsen, S.L., and Kryger, P. (2015). Four categories of viral infection describe the health status of honey bee colonies. *PLoS ONE* 10, e0140272.
- Anderson, M.J. (2001). A new method for non-parametric multivariate analysis of variance: non-parametric MANOVA for ecology. *Austral Ecol.* 26, 32–46.
- Anderson, K.E., Sheehan, T.H., Eckholm, B.J., Mott, B.M., and DeGrandi-Hoffman, G. (2011). An emerging paradigm of colony health: microbial balance of the honey bee and hive (*Apis mellifera*). *Insectes Sociaux* 58, 431–444.
- Anderson, K.E., Sheehan, T.H., Mott, B.M., Maes, P., Snyder, L., Schwan, M.R., Walton, A., Jones, B.M., and Corby-Harris, V. (2013). Microbial Ecology of the Hive and Pollination Landscape: Bacterial Associates from Floral Nectar, the Alimentary Tract and Stored Food of Honey Bees (*Apis mellifera*). *PLoS ONE* 8, e83125.
- Anjum, S.I., Shah, A.H., Aurongzeb, M., Kori, J., Azim, M.K., Ansari, M.J., and Bin, L. (2018). Characterization of gut bacterial flora of *Apis mellifera* from north-west Pakistan. *Saudi J. Biol. Sci.* 25, 388–392.
- Annoscia, D., Del Piccolo, F., and Nazzi, F. (2012). How does the mite *Varroa destructor* kill the honeybee *Apis mellifera*? Alteration of cuticular hydrocarbons and water loss in infested honeybees. *J. Insect Physiol.* 58, 1548–1555.
- ANSES (2016). Recherche et quantification du virus de la paralysie chronique (CBPV) par RT-PCR en temps réel. ANSES/SOP/ANA-I1.MOA.13 - Version 3.
- Arias, M.C., and Sheppard, W.S. (2005). Phylogenetic relationships of honey bees (Hymenoptera:Apinae:Apini) inferred from nuclear and mitochondrial DNA sequence data. *Mol. Phylogenet. Evol.* 37, 25–35.
- Aristote, L. (1964). Histoire des animaux (Paris: Les Belles Lettres).

- Ateya, D.A., Erickson, J.S., Howell, P.B., Hilliard, L.R., Golden, J.P., and Ligler, F.S. (2008). The good, the bad, and the tiny: a review of microflow cytometry. *Anal. Bioanal. Chem.* *391*, 1485–1498.
- Aubert, M.F.A., European Commission, Directorate General for Research, and Directorate E--Biotechnologies, A., Food (2011). *Virology and the honey bee* (Mytholmroyd, UK: Northern Bee Books).
- Aubertot, J.-N., Barbier, J.-M., Carpentier, A., Gril, J.-J., Guichard, L., Lucas, P., Savary, S., Voltz, M., and Savini, I. (2005). Réduire l'utilisation des pesticides et en limiter les impacts environnementaux. Rapp. L'expertise Réalis. Par L'INRA Cemagref À Demande Ministère L'agriculture Pêche MAP Ministère L'écologie Dév. Durable MEDD Déc.
- Aufauvre, J., Biron, D.G., Vidau, C., Fontbonne, R., Roudel, M., Diogon, M., Viguès, B., Belzunces, L.P., Delbac, F., and Blot, N. (2012). Parasite-insecticide interactions: a case study of *Nosema ceranae* and fipronil synergy on honeybee. *Sci. Rep.* *2*.
- Aufauvre, J., Misme-Aucouturier, B., Viguès, B., Texier, C., Delbac, F., and Blot, N. (2014). Transcriptome Analyses of the Honeybee Response to *Nosema ceranae* and Insecticides. *PLoS ONE* *9*, e91686.
- Ayton, S., Tomlinson, S., Phillips, R.D., Dixon, K.W., and Withers, P.C. (2016). Phenophysiological variation of a bee that regulates hive humidity, but not hive temperature. *J. Exp. Biol.* *219*, 1552–1562.
- Bailey, L. (1955). The epidemiology and control of *Nosema* disease of the honeybee.pdf. *Ann. Appl. Biol.* *43*, 379–389.
- Bailey, L. (1983). *Melissococcus pluton*, the cause of European foulbrood of honey bees (*Apis* spp.). *J. Appl. Bacteriol.* *55*, 65–69.
- Bailey, L., Ball, B.V., and Perry, J.N. (1983). Association of viruses with two protozoal pathogens of the honey bee. *Ann. Appl. Biol.* *103*, 13–20.
- Bollazzi, M., and Roces, F. (2010). The thermoregulatory function of thatched nests in the South American grass-cutting ant, *Acromyrmex heyeri*. *J. Insect Sci.* *10*, 1–17.
- Boncrisiani, H., Underwood, R., Schwarz, R., Evans, J.D., Pettis, J., and vanEngelsdorp, D. (2012). Direct effect of acaricides on pathogen loads and gene expression levels in honey bees *Apis mellifera*. *J. Insect Physiol.* *58*, 613–620.
- Breeze, T.D., and Potts, S.G. (2012). *The Decline of England's Bees* (London: Friends of the earth).
- Bromenshenk, J.J., Henderson, C.B., Wick, C.H., Stanford, M.F., Zulich, A.W., Jabbour, R.E., Deshpande, S.V., McCubbin, P.E., Seccomb, R.A., Welch, P.M., et al. (2010). Iridovirus and Microsporidian Linked to Honey Bee Colony Decline. *PLoS ONE* *5*, e13181.
- Buxton, P.A. (1932). Vol. VII OCTOBER 1932. In *Biological Reviews and Biological Proceedings of the Cambridge Philosophical Society*, (University Press).

- Cabrera, V.M.S., Sánchez, A., and Cesar, A.T. (2013). Stability of temperature, relative humidity and dew point inside *Melipona eburnea* (Apidae: Meliponini) colonies. *Rev. Cienc. Agropecu.* 1, 62–71.
- Cabrera, V.M.S., Sánchez, A., and Cesar, A.T. (2015). Stability of temperature, relative humidity and dew point inside *Melipona eburnea* (Apidae: Meliponini) colonies. *Rev. Cienc. Agropecu.* 1, 62–71.
- Cánovas, F., de la Rúa, P., Serrano, J., and Galián, J. (2011). Microsatellite variability reveals beekeeping influences on Iberian honeybee populations. *Apidologie* 42, 235–251.
- Caporaso, J.G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F.D., Costello, E.K., Fierer, N., Peña, A.G., Goodrich, J.K., Gordon, J.I., et al. (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods* 7, 335–336.
- Cariveau, D.P., Powell, J.E., Koch, H., Winfree, R., and Moran, N.A. (2014). Variation in gut microbial communities and its association with pathogen infection in wild bumble bees (*Bombus*). *ISME J.* 8, 2369–2379.
- Chansigaud, V. (2015). *La nature à l'épreuve de l'homme* (Paris: Delachaux et Niestlé).
- Chávez-Galarza, J., Garnery, L., Henriques, D., Neves, C.J., Loucif-Ayad, W., Jonhston, J. S., and Pinto, M. A. (2017). Mitochondrial DNA variation of *Apis mellifera iberiensis*: further insights from a large-scale study using sequence data of the tRNA^{Leu}-cox2 intergenic region. *Apidologie* 48, 533–544.
- Chen, Y.P., and Siede, R. (2007). Honey Bee Viruses. In *Advances in Virus Research*, (Elsevier), pp. 33–80.
- Chen, Y.-W., Chung, W.-P., Wang, C.-H., Solter, L.F., and Huang, W.-F. (2012). *Nosema ceranae* infection intensity highly correlates with temperature. *J. Invertebr. Pathol.* 111, 264–267.
- Cheng, C., Gao, X., Feng, B., Sheen, J., Shan, L., and He, P. (2013). Plant immune response to pathogens differs with changing temperatures. *Nat. Commun.* 4.
- Chown, S.L., and Nicolson, S.W. (2004). *Insect physiological ecology: mechanisms and patterns* (Oxford: Oxford Univ. Press).
- Clément, H. (2010). *Créer son rucher* (Paris: Editions France Loisir).
- Clément, H. (2015). *Le traité rustica de l'apiculture* (Rustica).
- Cole, L.M., Nicholson, R.A., and Casida, J.E. (1993). Action of phenylpyrazole insecticides at the GABA-gated chloride channel. *Pestic. Biochem. Physiol.* 46, 47–54.
- Colin, M.-E., and Belzunces, L.P. (1992). Evidence of synergy between prochloraz and deltamethrin in *apis mellifera* L.: a convenient biological approach. *Pestic. Sci.* 36, 115–119.
- Colman, D.R., Toolson, E.C., and Takacs-Vesbach, C.D. (2012). Do diet and taxonomy influence insect gut bacterial communities? *Mol. Ecol.* 21, 5124–5137.

- Cooper, P.D., Schaffer, W.M., and Buchmann, S.L. (1985). Temperature regulation of honey bees (*Apis mellifera*) foraging in the Sonoran desert. *J. Exp. Biol.* *114*, 1–15.
- Corby-Harris, V., Snyder, L., Meador, C.A.D., Naldo, R., Mott, B., and Anderson, K.E. (2016). *Parasaccharibacter apium*, gen. nov., sp. nov., Improves Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Resistance to *Nosema*. *J. Econ. Entomol.* *109*, 537–543.
- Cordes, N., Huang, W.-F., Strange, J.P., Cameron, S.A., Griswold, T.L., Lozier, J.D., and Solter, L.F. (2012). Interspecific geographic distribution and variation of the pathogens *Nosema bombi* and *Critidia* species in United States bumble bee populations. *J. Invertebr. Pathol.* *109*, 209–216.
- Cox-Foster, D.L., Conlan, S., Holmes, E.C., Palacios, G., Evans, J.D., Moran, N.A., Quan, P.-L., Briese, T., Hornig, M., Geiser, D.M., et al. (2007). A Metagenomic Survey of Microbes in Honey Bee Colony Collapse Disorder. *Science* *318*, 283–287.
- Crane, E. (1983). *The archaeology of beekeeping* (London: Duckworth).
- Cutler, G.C., and Scott-Dupree, C.D. (2007). Exposure to Clothianidin Seed-Treated Canola Has No Long-Term Impact on Honey Bees. *J. Econ. Entomol.* *100*, 765–772.
- Dainat, B., vanEngelsdorp, D., and Neumann, P. (2012a). Colony collapse disorder in Europe: CCD in Europe. *Environ. Microbiol. Rep.* *4*, 123–125.
- Dainat, B., Evans, J.D., Chen, Y.P., Gauthier, L., and Neumann, P. (2012b). Dead or Alive: Deformed Wing Virus and *Varroa destructor* Reduce the Life Span of Winter Honeybees. *Appl. Environ. Microbiol.* *78*, 981–987.
- Damiani, N., Gende, L.B., Bailac, P., Marcangeli, J.A., and Eguaras, M.J. (2009). Acaricidal and insecticidal activity of essential oils on *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) and *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Parasitol. Res.* *106*, 145–152.
- Dams, L.R. (1978). Bees and Honey-Hunting Scenes in the Mesolithic Rock Art of Eastern Spain. *Bee World* *59*, 45–53.
- Darchen, R. (1973). La thermorégulation et l'écologie de quelques espèces d'abeilles sociales d'Afrique (Apidae, Trigonini et *Apis mellifica* var. *adansonii*). *Apidologie* *4*, 341–370.
- De La Rua, P., Serrano, J., and Galian, J. (1998). Mitochondrial DNA variability in the Canary Islands honeybees (*Apis mellifera* L.). *Mol. Ecol.* *7*, 1543–1547.
- Di Prisco, G., Pennacchio, F., Caprio, E., Boncristiani, H.F., Evans, J.D., and Chen, Y. (2011). *Varroa destructor* is an effective vector of Israeli acute paralysis virus in the honeybee, *Apis mellifera*. *J. Gen. Virol.* *92*, 151–155.
- Doull, K.M. (1976). The effects of different humidities on the hatching of the eggs of honeybees. *Apidologie* *7*, 61–66.
- El Khoury, S., Rousseau, A., Lecoœur, A., Cheaib, B., Bouslama, S., Mercier, P.-L., Demey, V., Castex, M., Giovenazzo, P., and Derome, N. (2018). Deleterious Interaction Between Honeybees (*Apis*

mellifera) and its Microsporidian Intracellular Parasite *Nosema ceranae* Was Mitigated by Administering Either Endogenous or Allochthonous Gut Microbiota Strains. *Front. Ecol. Evol.* 6.

Ellis, M.B., Nicolson, S.W., Crewe, R.M., and Dietemann, V. (2008). Hygropreference and brood care in the honeybee (*Apis mellifera*). *J. Insect Physiol.* 54, 1516–1521.

Engel, P., and Moran, N.A. (2013). The gut microbiota of insects – diversity in structure and function. *FEMS Microbiol. Rev.* 37, 699–735.

Engel, P., Martinson, V.G., and Moran, N.A. (2012). Functional diversity within the simple gut microbiota of the honey bee. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 11002–11007.

Engel, P., James, R.R., Koga, R., Kwong, W.K., McFrederick, Q.S., and Moran, N.A. (2013). Standard methods for research on *Apis mellifera* gut symbionts. *J. Apic. Res.* 52, 1–24.

Epstein, P.R., Diaz, H.F., Elias, S., Grabherr, G., Graham, N.E., Martens, W.J., Mosley-Thompson, E., and Susskind, J. (1998). Biological and physical signs of climate change: focus on mosquito-borne diseases. *Bull. Am. Meteorol. Soc.* 79, 409–417.

Estoup, A., Garnery, L., Solignac, M., and Cornuet, J.-M. (1995). Microsatellite variation in honey bee (*Apis mellifera* L.) populations: hierarchical genetic structure and test of the infinite allele and stepwise mutation models. *Genetics* 140, 679–695.

Evans, J.D., and Spivak, M. (2010). Socialized medicine: Individual and communal disease barriers in honey bees. *J. Invertebr. Pathol.* 103, S62–S72.

Fagundes, C.T., Amaral, F.A., Teixeira, A.L., Souza, D.G., and Teixeira, M.M. (2012). Adapting to environmental stresses: the role of the microbiota in controlling innate immunity and behavioral responses: Microbiota and response to ambient stresses. *Immunol. Rev.* 245, 250–264.

Fahrenholz, L., Lamprecht, I., and Schrick, B. (1989). Thermal investigations of a honey bee colony: thermoregulation of the hive during summer and winter and heat production of members of different bee castes. *J. Comp. Physiol. B* 159, 551–560.

Faucon, J.-P., Clement, M.C., and Martel, A.C. (2008). Mortalités de colonies d'abeilles (*Apis mellifera*) au cours de l'hiver 2005-2006 en France : enquête sur le plateau de Valensole et enquête sur 18 ruchers de différents départements.

Flint, H.J., Scott, K.P., Louis, P., and Duncan, S.H. (2012). The role of the gut microbiota in nutrition and health. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 9, 577–589.

Forsgren, E. (2010). European foulbrood in honey bees. *J. Invertebr. Pathol.* 103, S5–S9.

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

Franck, P., Garnery, L., Celebrano, G., Solignac, M., and Cornuet, J.-M. (2000). Hybrid origins of honeybees from Italy (*Apis mellifera ligustica*) and Sicily (*A. m. sicula*). *Mol. Ecol.* 9, 907–921.

- Frazier, M., Caron, D., and vanEngelsdorp, D. (2011). A field guide to Honey Bees and their maladies (Pennsylvania: PennState Extension).
- Fries, I. (1988). Comb replacement and Nosema disease (*Nosema apis* Z.) in honey bee colonies. *Apidologie* 19, 343–354.
- Fries, I. (1996). *Nosema ceranae* n. sp. (Microspora, Nosematidae), morphological and molecular characterization of a microsporidian parasite of the Asian honey bee *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae).pdf. *Eur. J. Protistol.* 32, 356–365.
- Frouz, J. (2000). The effect of nest moisture on daily temperature regime in the nests of *Formica polyctena* wood ants. *Insectes Sociaux* 47, 229–235.
- Garnery, L., Cornuet, J.-M., and Solignac, M. (1992). Evolutionary history of the honey bee *Apis mellifera* inferred from mitochondrial DNA analysis. *Mol. Ecol.* 1, 145–154.
- 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* L. *Experientia* 1016–1021.
- Garnery, L., Mosshine, E.H., Oldroyd, B.P., and Cornuet, J.M. (1995). Mitochondrial DNA variation in Moroccan and Spanish honey bee populations. *Mol. Ecol.* 4, 465–472.
- Garnery, L., Franck, P., Baudry, E., Vautrin, D., Cornuet, J.-M., and Solignac, M. (1998a). Genetic diversity of the west European honey bee (*Apis mellifera mellifera* and *A. m. iberica*). I. Mitochondrial DNA. *Genet. Sel. Evol.* 30, 31–47.
- Garnery, L., Franck, P., Baudry, E., Vautrin, D., Cornuet, J.-M., and Solignac, M. (1998b). Genetic diversity of the west European honey bee (*Apis mellifera mellifera* and *A. m. iberica*). II. Microsatellite loci. *Genet. Sel. Evol.* 30, 49–74.
- Genersch, E. (2010). American Foulbrood in honeybees and its causative agent, *Paenibacillus larvae*. *J. Invertebr. Pathol.* 103, S10–S19.
- Graystock, P., Rehan, S.M., and McFrederick, Q.S. (2017). Hunting for healthy microbiomes: determining the core microbiomes of *Ceratina*, *Megalopta*, and *Apis* bees and how they associate with microbes in bee collected pollen. *Conserv. Genet.* 18, 701–711.
- Gupta, V.K., Paul, S., and Dutta, C. (2017). Geography, Ethnicity or Subsistence-Specific Variations in Human Microbiome Composition and Diversity. *Front. Microbiol.* 8.
- Hamdi, C., Balloi, A., Essanaa, J., Crotti, E., Gonella, E., Raddadi, N., Ricci, I., Boudabous, A., Borin, S., Manino, A., et al. (2011). Gut microbiome dysbiosis and honeybee health: Gut microbiome dysbiosis and honeybee health. *J. Appl. Entomol.* 135, 524–533.
- Han, F., Wallberg, A., and Webster, M.T. (2012). From where did the Western honeybee (*Apis mellifera*) originate? *Ecol. Evol.* 2, 1949–1957.

- Hansen, H., and Brødsgaard, C.J. (1999). American foulbrood: a review of its biology, diagnosis and control. *Bee World* 80, 5–23.
- Heather, J.M., and Chain, B. (2016). The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics* 107, 1–8.
- Heinrich, B. (1971). Temperature regulation of the sphinx moth, *Manduca sexta*. *J. Exp. Biol.* 54, 141–152.
- Heinrich, B. (1974). Thermoregulation in Endothermic Insects. *Science* 185, 747–756.
- Heusner, A., and Stussi, T. (1964). Métabolisme énergétique de l'abeille isolée : Son rôle dans la thermorégulation de la ruche.pdf. *Insectes Sociaux* 11, 239–266.
- Higes, M., García-Palencia, P., Botías, C., Meana, A., and Martín-Hernández, R. (2010). The differential development of microsporidia infecting worker honey bee (*Apis mellifera*) at increasing incubation temperature: *Nosema apis* infection is inhibited at high temperature. *Environ. Microbiol. Rep.* 2, 745–748.
- Himmer, A. (1932). Die Temperaturverhältnisse bei den sozialen Hymenopteren. *Biol. Rev.* 7, 224–253.
- Holmstrup, M., Bindesbøl, A.-M., Oostingh, G.J., Duschl, A., Scheil, V., Köhler, H.-R., Loureiro, S., Soares, A.M.V.M., Ferreira, A.L.G., Kienle, C., et al. (2010). Interactions between effects of environmental chemicals and natural stressors: A review. *Sci. Total Environ.* 408, 3746–3762.
- Holt, H.L., Aronstein, K.A., and Grozinger, C.M. (2013). Chronic parasitization by *Nosema* microsporidia causes global expression changes in core nutritional, metabolic and behavioral pathways in honey bee workers (*Apis mellifera*). *BMC Genomics* 14, 799.
- Hooper, L.V., Littman, D.R., and Macpherson, A.J. (2012). Interactions Between the Microbiota and the Immune System. *Science* 336, 1268–1273.
- Hroncova, Z., Havlik, J., Killer, J., Doskocil, I., Tyl, J., Kamler, M., Titera, D., Hakl, J., Mrazek, J., Bunesova, V., et al. (2015). Variation in Honey Bee Gut Microbial Diversity Affected by Ontogenetic Stage, Age and Geographic Location. *PLoS ONE* 10, e0118707.
- Hubert, J., Kamler, M., Nesvorna, M., Ledvinka, O., Kopecky, J., and Erban, T. (2016). Comparison of *Varroa destructor* and Worker Honeybee Microbiota Within Hives Indicates Shared Bacteria. *Microb. Ecol.* 72, 448–459.
- Hubert, J., Bicianova, M., Ledvinka, O., Kamler, M., Lester, P.J., Nesvorna, M., Kopecky, J., and Erban, T. (2017). Changes in the Bacteriome of Honey Bees Associated with the Parasite *Varroa destructor*, and Pathogens *Nosema* and *Lotmaria passim*. *Microb. Ecol.* 73, 685–698.
- Hughes, L. (2000). Biological consequences of global warming: is the signal already apparent. *Trends Ecol. Evol.* 15, 56–61.

- Human, H., Nicolson, S.W., and Dietemann, V. (2006). Do honeybees, *Apis mellifera scutellata*, regulate humidity in their nest? *Naturwissenschaften* 93, 397–401.
- Invernizzi, C., Abud, C., Tomasco, I.H., Harriet, J., Ramallo, G., Campá, J., Katz, H., Gardiol, G., and Mendoza, Y. (2009). Presence of *Nosema ceranae* in honeybees (*Apis mellifera*) in Uruguay. *J. Invertebr. Pathol.* 101, 150–153.
- Johnson, R. (2007). Recent honey bee colony declines. (Library of congress Washington DC congressional research service).
- Jones, J.C., and Oldroyd, B.P. (2006). Nest thermoregulation in social insects. In *Advances in Insect Physiology*, (Elsevier), pp. 153–191.
- Jones, J.C., Myerscough, M.R., Graham, S., and Oldroyd, B.P. (2004). Honey bee nest thermoregulation: diversity promotes stability. *Science* 305, 402–404.
- Jones, J.C., Fruciano, C., Hildebrand, F., Al Toufalilia, H., Balfour, N.J., Bork, P., Engel, P., Ratnieks, F.L., and Hughes, W.O. (2018). Gut microbiota composition is associated with environmental landscape in honey bees. *Ecol. Evol.* 8, 441–451.
- Kleijn, D., Winfree, R., Bartomeus, I., Carvalheiro, L.G., Henry, M., Isaacs, R., Klein, A.-M., Kremen, C., M'Gonigle, L.K., Rader, R., et al. (2015). Delivery of crop pollination services is an insufficient argument for wild pollinator conservation. *Nat. Commun.* 6, 7414.
- Koch, H., and Schmid-Hempel, P. (2011). Socially transmitted gut microbiota protect bumble bees against an intestinal parasite. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 19288–19292.
- Kralj, J., and Fuchs, S. (2010). *Nosema* sp. influences flight behavior of infected honey bee (*Apis mellifera*) foragers. *Apidologie* 41, 21–28.
- Kraus, B., and Velthuis, H.H.W. (1997). High humidity in the honey bee (*Apis mellifera* L.) brood nest limits reproduction of the parasitic mite *Varroa jacobsoni* Oud. *Naturwissenschaften* 84, 217–218.
- Kwong, W.K., and Moran, N.A. (2016). Gut microbial communities of social bees. *Nat. Rev. Microbiol.* 14, 374–384.
- Kwong, W.K., Medina, L.A., Koch, H., Sing, K.-W., Soh, E.J.Y., Ascher, J.S., Jaffé, R., and Moran, N.A. (2017). Dynamic microbiome evolution in social bees. *Sci. Adv.* 3.
- Lankau, E.W., Hong, P.-Y., and Mackie, R.I. (2012). Ecological drift and local exposures drive enteric bacterial community differences within species of Galápagos iguanas: Galapagos iguana enteric community drivers. *Mol. Ecol.* 21, 1779–1788.
- Lepage, P., Colombet, J., Marteau, P., Sime-Ngando, T., Dore, J., and Leclerc, M. (2008). Dysbiosis in inflammatory bowel disease: a role for bacteriophages? *Gut* 57, 424–425.
- Ley, R.E., Backhed, F., Turnbaugh, P., Lozupone, C.A., Knight, R.D., and Gordon, J.I. (2005). Obesity alters gut microbial ecology. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 11070–11075.

- Ley, R.E., Peterson, D.A., and Gordon, J.I. (2006). Ecological and Evolutionary Forces Shaping Microbial Diversity in the Human Intestine. *Cell* 124, 837–848.
- Linnaeus, C. (1758). *Systema naturæ per regna tria naturæ, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis, tomus I* (Holmiæ: Editio duodecima, reformata).
- Linnenbrink, M., Wang, J., Hardouin, E.A., Künzel, S., Metzler, D., and Baines, J.F. (2013). The role of biogeography in shaping diversity of the intestinal microbiota in house mice. *Mol. Ecol.* 22, 1904–1916.
- Macey, M. (2007). *Flow Cytometry* (Humana Press).
- Mackowiak, C. (2009). Le déclin de l'abeille domestique, *Apis mellifera* en France. Université Henri Poincaré.
- Magnus, R.M., Tripodi, A.D., and Szalanski, A.L. (2014). Mitochondrial DNA Diversity of Honey Bees (*Apis mellifera*) from Unmanaged Colonies and Swarms in the United States. *Biochem. Genet.* 52, 245–257.
- Martin, S.J., Highfield, A.C., Brettell, L., Villalobos, E.M., Budge, G.E., Powell, M., Nikaido, S., and Schroeder, D.C. (2012). Global Honey Bee Viral Landscape Altered by a Parasitic Mite. *Science* 336, 1304–1306.
- Martín-Hernández, R., Botías, C., Barrios, L., Martínez-Salvador, A., Meana, A., Mayack, C., and Higes, M. (2011). Comparison of the energetic stress associated with experimental *Nosema ceranae* and *Nosema apis* infection of honeybees (*Apis mellifera*). *Parasitol. Res.* 109, 605–612.
- Martinson, V.G., Danforth, B.N., Minckley, R.L., Rueppell, O., Tingek, S., and Moran, N.A. (2011). A simple and distinctive microbiota associated with honey bees and bumble bees: the microbiota of honey bees and bumble bees. *Mol. Ecol.* 20, 619–628.
- Mattila, H.R., Rios, D., Walker-Sperling, V.E., Roeselers, G., and Newton, I.L.G. (2012). Characterization of the Active Microbiotas Associated with Honey Bees Reveals Healthier and Broader Communities when Colonies are Genetically Diverse. *PLoS ONE* 7, e32962.
- Mayack, C., and Naug, D. (2009). Energetic stress in the honeybee *Apis mellifera* from *Nosema ceranae* infection. *J. Invertebr. Pathol.* 100, 185–188.
- McMenamin, A.J., and Genersch, E. (2015). Honey bee colony losses and associated viruses. *Curr. Opin. Insect Sci.* 8, 121–129.
- Meikle, W.G., Weiss, M., Maes, P.W., Fitz, W., Snyder, L.A., Sheehan, T., Mott, B.M., and Anderson, K.E. (2017). Internal hive temperature as a means of monitoring honey bee colony health in a migratory beekeeping operation before and during winter. *Apidologie* 48, 666–680.
- Melamed, M.R. (2001). Chapter 1 A brief history of flow cytometry and sorting. In *Methods in Cell Biology*, (Elsevier), pp. 3–17.

- Michener, C.D., and Grimaldi, D.A. (1988). The oldest fossil bee: Apoid history, evolutionary stasis, and antiquity of social behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *85*, 6424–6426.
- Miguel, I., Iriondo, M., Garnery, L., Sheppard, W.S., and Estonba, A. (2007). Gene flow within the M evolutionary lineage of *Apis mellifera*: role of the Pyrenees, isolation by distance and post-glacial recolonization routes in the western Europe. *Apidologie* *38*, 141–155.
- Miguel, I., Baylac, M., Iriondo, M., Manzano, C., Garnery, L., and Estonba, A. (2011). Both geometric morphometric and microsatellite data consistently support the differentiation of the M evolutionary branch.pdf. *Apidologie* *42*, 150–161.
- de Miranda, J.R., Cordonì, G., and Budge, G. (2010). The Acute bee paralysis virus–Kashmir bee virus–Israeli acute paralysis virus complex. *J. Invertebr. Pathol.* *103*, S30–S47.
- de Miranda, J.R., Bailey, L., Ball, B.V., Blanchard, P., Budge, G.E., Chejanovsky, N., Chen, Y.-P., Gauthier, L., Genersch, E., de Graaf, D.C., et al. (2013). Standard methods for virus research in *Apis mellifera*. *J. Apic. Res.* *52*, 1–56.
- Möckel, N., Gisder, S., and Genersch, E. (2011). Horizontal transmission of deformed wing virus: pathological consequences in adult bees (*Apis mellifera*) depend on the transmission route. *J. Gen. Virol.* *92*, 370–377.
- Monceau, K., Bonnard, O., and Thiéry, D. (2014). *Vespa velutina*: a new invasive predator of honeybees in Europe. *J. Pest Sci.* *87*, 1–16.
- Moran, N.A., Hansen, A.K., Powell, J.E., and Sabree, Z.L. (2012). Distinctive Gut Microbiota of Honey Bees Assessed Using Deep Sampling from Individual Worker Bees. *PLoS ONE* *7*, e36393.
- Mullin, C.A., Frazier, M., Frazier, J.L., Ashcraft, S., Simonds, R., vanEngelsdorp, D., and Pettis, J.S. (2010). High Levels of Miticides and Agrochemicals in North American Apiaries: Implications for Honey Bee Health. *PLoS ONE* *5*, e9754.
- Mustafa, S.G., Spiewok, S., Duncan, M., Spooner-Hart, R., and Rosenkranz, P. (2014). Susceptibility of small honey bee colonies to invasion by the small hive beetle, *Aethina tumida* (Coleoptera, Nitidulidae). *J. Appl. Entomol.* *138*, 547–550.
- Neumann, P., and Carreck, N.L. (2010). Honey bee colony losses. *J. Apic. Res.* *49*, 1–6.
- Neumann, P., and Elzen, P.J. (2004). The biology of the small hive beetle (*Aethina tumida*, Coleoptera: Nitidulidae): Gaps in our knowledge of an invasive species. *Apidologie* *35*, 229–247.
- Noyes, P.D., McElwee, M.K., Miller, H.D., Clark, B.W., Van Tiem, L.A., Walcott, K.C., Erwin, K.N., and Levin, E.D. (2009). The toxicology of climate change: Environmental contaminants in a warming world. *Environ. Int.* *35*, 971–986.
- Ochman, H., Worobey, M., Kuo, C.-H., Ndjango, J.-B.N., Peeters, M., Hahn, B.H., and Hugenholtz, P. (2010). Evolutionary Relationships of Wild Hominids Recapitulated by Gut Microbial Communities. *PLoS Biol.* *8*, e1000546.

Pachauri, R.K., Allen, M.R., Barros, V.R., Broome, J., Cramer, W., Christ, R., Church, J.A., Clarke, L., Dahe, Q., and Dasgupta, P. (2014). Climate change 2014: synthesis report. Contribution of Working Groups I, II and III to the fifth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC).

Panek, J. (2015). Etude des interactions hôte-parasite dans le cadre d'infections par des microsporidies, un groupe de champignons parasites intracellulaires obligatoires. Université Blaise Pascal.

Pesson, P., and Louveaux, J. (1984). Pollinisation et productions végétales (Paris: Editions Quae).

Pettis, J.S., and Delaplane, K.S. (2010). Coordinated responses to honey bee decline in the USA. *Apidologie* 41, 256–263.

Pettis, J.S., Lichtenberg, E.M., Andree, M., Stitzinger, J., Rose, R., and vanEngelsdorp, D. (2013). Crop Pollination Exposes Honey Bees to Pesticides Which Alters Their Susceptibility to the Gut Pathogen *Nosema ceranae*. *PLoS ONE* 8, e70182.

Phillips, C.D., Phelan, G., Dowd, S.E., McDonough, M.M., Ferguson, A.W., Delton Hanson, J., Siles, L., Ordóñez-Garza, N., San Francisco, M., and Baker, R.J. (2012). Microbiome analysis among bats describes influences of host phylogeny, life history, physiology and geography: microbiome analysis among bats. *Mol. Ecol.* 21, 2617–2627.

Potts, L.R., Francke, O.F., and Cokendolpher, J.C. (1984). Humidity preferences of four species of fire ants (Hymenoptera: Formicidae: *Solenopsis*). *Insectes Sociaux* 31, 335–340.

Potts, S.G., Biesmeijer, J.C., Kremen, C., Neumann, P., Schweiger, O., and Kunin, W.E. (2010). Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends Ecol. Evol.* 25, 345–353.

Quarles, W. (2008). Pesticides and Honey Bee Colony Collapse Disorder. *IPM Pract.* 30, 1–10.

Raffiudin, R., and Crozier, R.H. (2007). Phylogenetic analysis of honey bee behavioral evolution. *Mol. Phylogenet. Evol.* 43, 543–552.

Ruttner, F. (1988). Biogeography and Taxonomy of Honeybees (Berlin: Springer Verlag).

Sanger, F., Air, G.M., Barrell, B.G., Brown, N.L., Coulson, A.R., Fiddes, J.C., Hutchison III, C.A., Slocombe, P.M., and Smith, M. (1977). Nucleotide sequence of bacteriophage ϕ X174 DNA. *Nature* 265, 687.

Santo Domingo, J.W., Kaufman, M.G., Klug, M.J., Holben, W.E., Harris, D., and Tiedje, J.M. (1998). Influence of diet on the structure and function of the bacterial hindgut community of crickets. *Mol. Ecol.* 7, 761–767.

Saraiva, M.A., Zemolin, A.P.P., Franco, J.L., Boldo, J.T., Stefenon, V.M., Triplett, E.W., de Oliveira Camargo, F.A., and Roesch, L.F.W. (2015). Relationship between honeybee nutrition and their microbial communities. *Antonie Van Leeuwenhoek* 107, 921–933.

Schäfer, M.O., Ritter, W., Pettis, J.S., and Neumann, P. (2011). Concurrent parasitism alters thermoregulation in honey bee (Hymenoptera: Apidae) winter clusters. *Ann. Entomol. Soc. Am.* *104*, 476–482.

Seeley, T.D., and Visscher, P. (1985). Survival of honeybees in cold climates: the critical timing of colony growth and reproduction. *Ecol. Entomol.* *10*, 81–88.

Shafer, A.B., Williams, G.R., Shutler, D., Rogers, R.E., and Stewart, D.T. (2009). Cophylogeny of *Nosema* (Microsporidia: Nosematidae) and bees (Hymenoptera: Apidae) suggests both cospeciation and a host-switch. *J. Parasitol.* *95*, 198–203.

Shapiro, O.H., Kushmaro, A., and Brenner, A. (2010). Bacteriophage predation regulates microbial abundance and diversity in a full-scale bioreactor treating industrial wastewater. *ISME J.* *4*, 327–336.

Van der Sluijs, J.P., Simon-Delso, N., Goulson, D., Maxim, L., Bonmatin, J.-M., and Belzunces, L.P. (2013). Neonicotinoids, bee disorders and the sustainability of pollinator services. *Curr. Opin. Environ. Sustain.* *5*, 293–305.

Sommer, F., and Bäckhed, F. (2013). The gut microbiota — masters of host development and physiology. *Nat. Rev. Microbiol.* *11*, 227–238.

Southwick, E.E., and Heldmaier, G. (1987). Temperature control in honey bee colonies. *BioScience* *37*, 395–399.

Stabentheiner, A., Kovac, H., and Brodschneider, R. (2010). Honeybee colony thermoregulation – Regulatory mechanisms and contribution of individuals in dependence on age, location and thermal stress. *PLoS ONE* *5*, e8967.

Suchail, S.V., Guez, D., and Belzunces, L.P. (2001). Discrepancy between acute and chronic toxicity induced by imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera*. *Environ. Toxicol. Chem.* *20*, 2482–2486.

Sullam, K.E., Essinger, S.D., Lozupone, C.A., O'Connor, M.P., Rosen, G.L., Knight, R., Kilham, S.S., and Russell, J.A. (2012). Environmental and ecological factors that shape the gut bacterial communities of fish: a meta-analysis: fish gut bacterial communities. *Mol. Ecol.* *21*, 3363–3378.

Tentcheva, D., Gauthier, L., Zappulla, N., Dainat, B., Cousserans, F., Colin, M.E., and Bergoin, M. (2004). Prevalence and Seasonal Variations of Six Bee Viruses in *Apis mellifera* L. and *Varroa destructor* Mite Populations in France. *Appl. Environ. Microbiol.* *70*, 7185–7191.

Texier, C., Vidau, C., Viguès, B., El Alaoui, H., and Delbac, F. (2010). Microsporidia: a model for minimal parasite–host interactions. *Curr. Opin. Microbiol.* *13*, 443–449.

Thomas, M.B., and Blanford, S. (2003). Thermal biology in insect-parasite interactions. *Trends Ecol. Evol.* *18*, 344–350.

Trapp, S., and Pussemier, L. (1991). Model calculations and measurements of uptake and translocation of carbamates by bean plants. *Chemosphere* *22*, 327–339.

- Van Treuren, W., Ponnusamy, L., Brinkerhoff, R.J., Gonzalez, A., Parobek, C.M., Juliano, J.J., Andreadis, T.G., Falco, R.C., Ziegler, L.B., Hathaway, N., et al. (2015). Variation in the Microbiota of Ixodes Ticks with Regard to Geography, Species, and Sex. *Appl. Environ. Microbiol.* *81*, 6200–6209.
- VanEngelsdorp, D., and Meixner, M.D. (2010). A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. *J. Invertebr. Pathol.* *103*, S80–S95.
- VanEngelsdorp, D., Evans, J.D., Saegerman, C., Mullin, C., Haubruge, E., Nguyen, B.K., Frazier, M., Frazier, J., Cox-Foster, D., Chen, Y., et al. (2009). Colony Collapse Disorder: A Descriptive Study. *PLoS ONE* *4*, e6481.
- Vega, F.E., and Kaya, H.K. (2012). *Insect pathology* (Academic Press).
- Vidau, C., Alaoui, H.E., Biron, D.G., and Delbac, F. (2011a). Mais où sont passées les abeilles ? *Biofutur* *327*, 56–59.
- Vidau, C., Diogon, M., Aufauvre, J., Fontbonne, R., Viguès, B., Brunet, J.-L., Texier, C., Biron, D.G., Blot, N., El Alaoui, H., et al. (2011b). Exposure to Sublethal Doses of Fipronil and Thiacloprid Highly Increases Mortality of Honeybees Previously Infected by *Nosema ceranae*. *PLoS ONE* *6*, e21550.
- Villalobos, E.M. (2016). The mite that jumped, the bee that traveled, the disease that followed. *Science* *351*, 554–556.
- Walsh, P.S., Metzger, D.A., and Higuchi, R. (1991). Chelex 100 as a Medium for Simple Extraction of DNA for PCR-Based Typing from Forensic Material. *BioTechniques* *10*, 506–513.
- Weidenmüller, A., Kleineidam, C., and Tautz, J. (2002). Collective control of nest climate parameters in bumblebee colonies. *Anim. Behav.* *63*, 1065–1071.
- Wilfert, L., Long, G., Leggett, H.C., Schmid-Hempel, P., Butlin, R., Martin, S.J.M., and Boots, M. (2016). Deformed wing virus is a recent global epidemic in honeybees driven by *Varroa* mites. *Science* *351*, 594–597.
- Willmer, P., and Stone, G. (1997). Temperature and water relations in desert bees. *J. Therm. Biol.* *22*, 453–465.
- Winfrey, R., Aguilar, R., Vázquez, D.P., LeBuhn, G., and Aizen, M.A. (2009). A meta-analysis of bees' responses to anthropogenic disturbance. *Ecology* *90*, 2068–2076.
- Woodrow, A.W. (1935). Some effects of relative humidity on the length of life and food consumption of honeybees. *J. Econ. Entomol.* *28*, 565–568.
- Wu, J.Y., Anelli, C.M., and Sheppard, W.S. (2011). Sub-Lethal Effects of Pesticide Residues in Brood Comb on Worker Honey Bee (*Apis mellifera*) Development and Longevity. *PLoS ONE* *6*, e14720.
- Wu, J.Y., Smart, M.D., Anelli, C.M., and Sheppard, W.S. (2012). Honey bees (*Apis mellifera*) reared in brood combs containing high levels of pesticide residues exhibit increased susceptibility to *Nosema* (Microsporidia) infection. *J. Invertebr. Pathol.* *109*, 326–329.

Yang, X., and Cox-Foster, D.L. (2005). Impact of an ectoparasite on the immunity and pathology of an invertebrate: evidence for host immunosuppression and viral amplification. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 7470–7475.

Yun, J.-H., Roh, S.W., Whon, T.W., Jung, M.-J., Kim, M.-S., Park, D.-S., Yoon, C., Nam, Y.-D., Kim, Y.-J., Choi, J.-H., et al. (2014). Insect Gut Bacterial Diversity Determined by Environmental Habitat, Diet, Developmental Stage, and Phylogeny of Host. *Appl. Environ. Microbiol.* *80*, 5254–5264.

Zhang, J., Kobert, K., Flouri, T., and Stamatakis, A. (2014). PEAR: a fast and accurate Illumina Paired-End reAd mergeR. *Bioinformatics* *30*, 614–620.

Zheng, H.-Q., Gong, H.-R., Huang, S.-K., Sohr, A., Hu, F.-L., and Chen, Y.P. (2015). Evidence of the synergistic interaction of honey bee pathogens *Nosema ceranae* and Deformed wing virus. *Vet. Microbiol.* *177*, 1–6.

Annexes

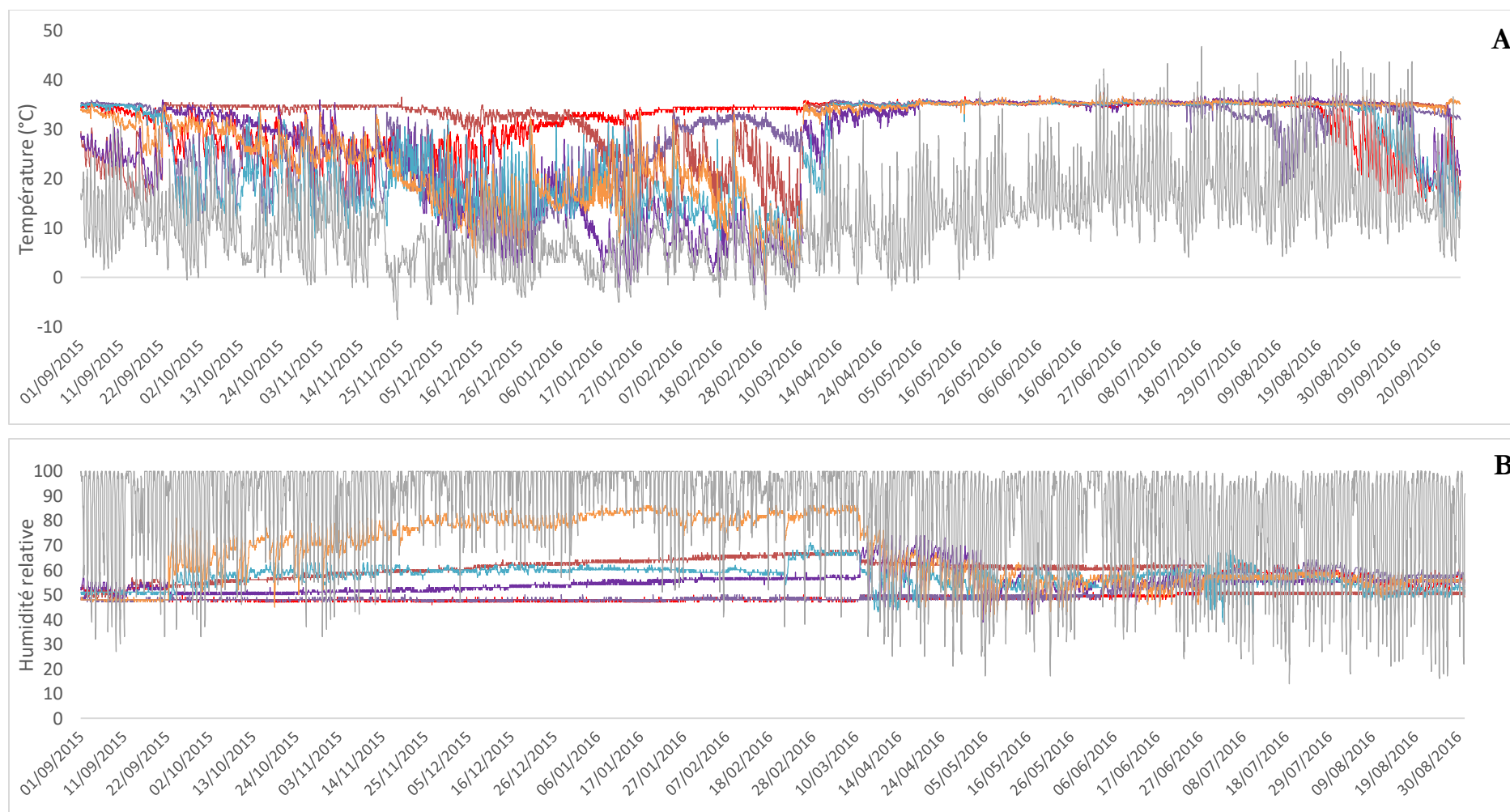


Figure A1 : Comparaison de la température (A) et de l'humidité relative (B) sur une année dans les ruches de Pontaumur. Les données sont celles du thermo-hygrobouton B et s'étalent de la période du 1^{er} septembre 2015 au 31 août 2016. Les courbes des six ruches sont en couleur, tandis que les courbes de la température et de l'humidité relative de l'extérieur sont en gris.

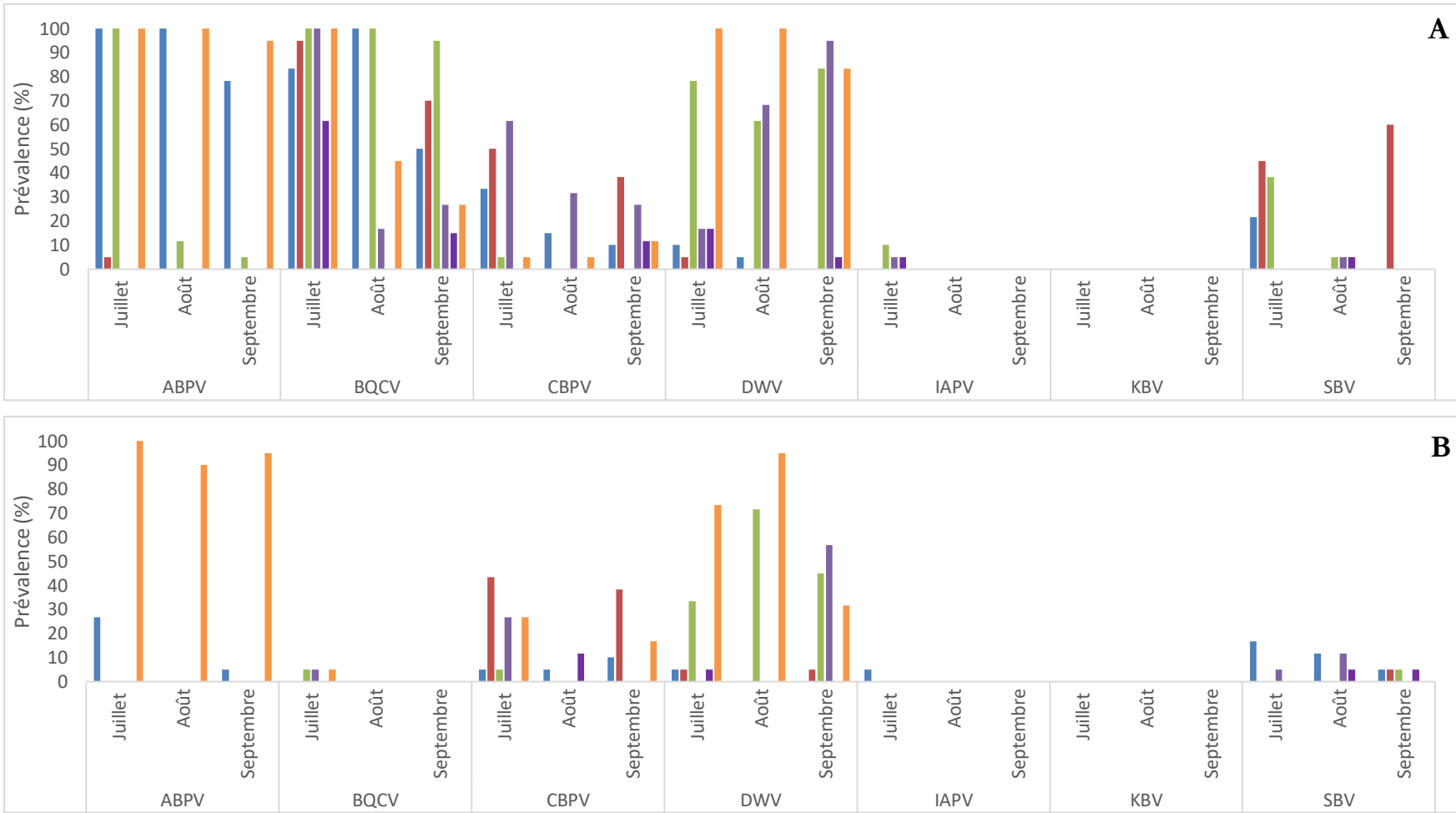


Figure A2 : Prévalence des sept virus recherchés par RT-PCR dans les intestins (A) et les têtes (B) des abeilles conservatoires de Pontaurmur (bleu), Champart (orange), Chizé (gris), Bilbao (jaune), Gimonde (violet) et Zavial (vert). La prévalence a été calculée sur les six ruches, à raison de trois répétitions de neuf abeilles dans chaque ruche.