

UNIVERSITÉ DE MONS

-

INSTITUT DES BIOSCIENCES – FACULTÉ DES SCIENCES

-

LABORATOIRE DE ZOOLOGIE

Influence d'un stress génétique sur la forme des ailes de Bourdons
(Hymenoptera, Apidae, *Bombus*)

Promoteur :

Dr. Ig. Denis Michez

Co-promoteur :

Dr. Thibaut De Meulemeester

Mémoire de fin d'études

Présenté par **Maxence Gérard**

En vue de l'obtention du grade de

Maitre en Sciences Biologiques

Biologie des organismes et écologie

Finalité approfondie

Année académique 2013 – 2014

M. Gérard. 2014. Influence d'un stress génétique sur la forme des ailes de Bourdons (Hymenoptera, Apidae, *Bombus*).

Résumé du mémoire

Les bourdons, de par leur excellente capacité de pollinisation des Angiospermes, sont un groupe d'une importance capitale au sein de nombreux écosystèmes terrestres des régions tempérées, alpines ou boréales de l'hémisphère nord. Leur déclin au cours des dernières décennies nous alerte quant à l'importance à accorder à leur conservation. Plusieurs facteurs jouent un rôle majeur sur l'abondance et la diversité des bourdons, notamment les connections et la fragmentation de l'habitat. Ce facteur de déclin peut en engendrer d'autres, notamment la dérive génique. Un phénomène de dérive génique peut entraîner une diminution de la richesse allélique, l'apparition de consanguinité et une baisse du degré d'hétérozygotie.

La dérive génique est un facteur à l'importance particulière chez de nombreux Hyménoptères, notamment les bourdons. En effet, ces derniers ont un système de détermination sexuelle (sl-CSD) où les femelles sont diploïdes et hétérozygotes pour ce locus et les mâles sont haploïdes et donc hémizygote pour ce locus. Cependant la production d'un homozygote pour le sl-CSD engendrera un mâle diploïde et stérile. Ces mâles diploïdes, en s'accouplant avec des femelles monandres, peuvent alors entraîner la population dans un vortex d'extinction. En plus d'être stériles, ils diminuent la force de travail de la colonie puisqu'ils sont produits à la place d'ouvrières. Leur proportion pourrait donc être utilisée comme indicateur de la santé génétique d'une population. Ce mémoire a pour objectif de mettre en évidence et de caractériser l'impact de la consanguinité sur la forme de l'aile. Nous nous focaliserons sur deux éléments (i) la discrimination des formes des ailes des individus présentant des degrés de ploïdies et des phénotypes différents chez *Bombus terrestris*, principalement entre mâles haploïdes et diploïdes ; (ii) l'évaluation de la variation de stabilité développementale sur les spécimens diploïdes femelles (de la génération mère et la génération fille) ainsi qu'entre mâles haploïdes et diploïdes par la mesure de l'asymétrie fluctuante entre les deux ailes d'une même paire.

Nous avons expérimentalement augmenté la consanguinité de colonies et nous avons évalué la forme des ailes antérieures de spécimens de bourdons caractérisés par des niveaux différents de consanguinités (parents frères et sœurs *versus* parents non frère et sœur). Au total, 544 photos ont été rassemblées et 18 landmarks (points de repères) ont été digitalisés sur chaque aile antérieure. Des analyses exploratoires (ACP), des analyses discriminantes (ADL) et des analyses d'asymétrie

fluctuante ont été réalisées sur ce jeu de données. En ce qui concerne le caractère diagnostique de la forme de l'aile en fonction du degré de ploïdie et du phénotype sexuel, il s'est révélé significatif chez *Bombus terrestris*. En effet, sur 149 mâles, seul 2 n'ont pas été attribués au bon degré de ploïdie, correspondant à un hit ratio de 98,7%. Par ailleurs, 95,4% des ouvrières ont été correctement identifiées. En ce qui concerne les analyses de stabilités développementales, les mâles diploïdes sont significativement plus asymétriques que les trois autres groupes et sont donc moins stables. La différence d'asymétrie de forme entre les deux générations d'ouvrières n'est pas significative. Cependant, il existe une différence d'asymétrie de taille entre la génération mère et la génération consanguine (cette dernière possède des ailes de taille plus asymétrique).

Mots-clés : *Bombus terrestris* – déclin – mâles diploïdes – forme de l'aile – morphométrie géométrie – stabilité développementale – asymétrie fluctuante

Remerciements

Je tiens à remercier via ces quelques lignes celles et ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration du présent travail

Je remercie le Prof. Pierre RASMONT pour m'avoir accueilli au sein du service de Zoologie. Il a su renforcer mon envie d'étudier la zoologie, dans tous les domaines qui la composent mais aussi ma passion pour cette branche de la Biologie. Avoir un professeur passionné rend les choses passionnantes. Il m'a permis d'avoir régulièrement des réflexions dans et en dehors de la biologie. Merci aussi pour la possibilité qu'il m'a donné d'être élève-assistant en Zoologie et d'encadrer les étudiants durant le stage d'écologie méditerranéenne.

Je remercie tout particulièrement le Dr. Denis MICHEZ pour sa disponibilité, ses conseils judicieux et pour m'avoir soutenu et épaulé ces derniers mois. Pouvoir allier la biologie de la conservation à d'autres outils utilisés en biologie pour aboutir à un travail novateur était un objectif et le projet qu'il m'a permis de réaliser l'a parfaitement rempli.

Je remercie le Dr. Thibaut DE MEULEMEESTER pour m'avoir initié aux techniques de morphométrie géométrique et pour son aide durant la réalisation des différentes analyses statistiques. Merci également de m'avoir permis d'acquérir une expérience à l'étranger et de rencontrer des scientifiques de nationalités diverses et variées. Ces rencontres ont joué un rôle prépondérant dans l'expérience et la vision du monde scientifique que j'ai pu développer.

Un grand merci au Prof. Vincent DEBAT (MNHN, Paris) pour le temps qu'il a consacré à me former à l'analyse de l'asymétrie fluctuante et qui, malgré quelques contretemps, a toujours gardé sa bonne humeur.

Je remercie également le Prof. Denis FOURNIER (ULB, Belgique) pour m'avoir permis d'utiliser le cytomètre en flux du laboratoire d'Ecologie et Biologie de l'Evolution (ULB) et de m'y avoir initié.

Je remercie aussi le Museum Naturalis de Leiden et le Prof J. C. BIESMEIJER pour m'avoir permis l'accès à leur collection ainsi que de participer à plusieurs séjours scientifiques.

Evoquer ces 5 années à l'université équivaut à remercier tout particulièrement 4 autres personnes. Ceux que j'ai le plus souvent côtoyé et avec qui les journées vécues resteront, le mot est faible, inoubliables. Je tiens donc à remercier Jérôme, Lucas, Maxime et Sylvain pour ces nombreux moments, tant à l'université qu'en dehors. Je n'aurai pu rêver mieux pour profiter de ces dernières années d'études.

Je n'oublie pas d'autres membres du laboratoire de zoologie qui ont accompagné mon parcours et avec qui tant de moments ont été partagés. Travailler au laboratoire de zoologie avec

vous est un plaisir. Merci à Dimitri pour sa gentillesse, sa simplicité et l'excellente semaine dans le Var. Merci aussi à Nicolas pour cette semaine dans le Var et ces heures passées lors des travaux pratiques de zoologie, à Maryse et Natalie pour leur bonne humeur et leur humour au chaville ou en dehors, à Thomas pour les discussions qui m'ont permis de réfléchir à l'orientation à choisir dans l'avenir, à Patrick qui m'a aidé à élaborer le mode opératoire d'élevage des bourdons sans oublier les autres membres du laboratoire de Zoologie : Leila, Manu, Pierre-Laurent, Romain et Sarah.

Je remercie également ma maman, mon papa, mon frère pour toutes ces années ainsi que tous mes amis proches.

Je remercie la société Biobest et son directeur scientifique Felix WACKERS pour m'avoir permis l'accès aux bourdons issus de leur élevage.

Je remercie sincèrement tous les membres du jury pour la lecture du présent travail.

Enfin, que toutes les personnes ayant contribué à la réalisation de ce travail et qui n'ont pas été citées ci-dessus sachent que je ne les oublie pas et que je les remercie chaleureusement.

Table des matières

1. Introduction	8
1.1. Impact d'un stress génétique sur le phénotype.....	8
1.2. Déclin des bourdons	12
1.2.1. Ampleur et causes du déclin	12
1.2.2. La dérive génique chez les bourdons.....	13
1.3. Le système haplo-diploïde des abeilles.....	16
1.3.1. Le système haplo-diploïde et le locus CSD.....	16
1.3.2. Les mâles diploïdes chez les abeilles et leurs coûts	18
1.3.3. Les mâles diploïdes de bourdons.....	21
1.4. Objectifs du mémoire	22
2. Matériel et méthodes	23
2.1. Modèle biologique.....	23
2.1.1. Généralités.....	23
2.1.2. Cycle de vie.....	23
2.2. Mode opératoire pour l'élevage de <i>Bombus terrestris</i>	25
2.3. Détermination du degré de ploïdie chez les mâles de <i>Bombus terrestris</i>	28
2.4. Analyse de morphométrie géométrique des ailes.....	31
2.4.2. Mode opératoire pour les analyses morphométriques	36
2.4.3. Discrimination des mâles diploïdes sur base de la forme des ailes	39
2.4.4. Mode opératoire pour l'analyse de l'asymétrie fluctuante	41
3. Résultats.....	43
3.1. Caractère diagnostique de la forme de l'aile chez les mâles de <i>Bombus terrestris</i>	43
3.2. Détermination de l'asymétrie des ailes chez <i>Bombus terrestris</i>	47
3.2.1. Asymétrie des ailes des différents groupes	47
3.2.2. Asymétrie des deux générations d'ouvrières	51
4. Discussion	53
4.1. Caractère diagnostique de la forme de l'aile chez les mâles de <i>Bombus terrestris</i>	53
4.2. Détermination de l'asymétrie des ailes chez <i>Bombus terrestris</i>	54
5. Conclusion	57
6. Perspectives	58
7. Bibliographie.....	59
Annexe 1: tableau des spécimens de seconde génération au laboratoire de Zoologie de l'Université de Mons	73
Annexe 2: tableau des mâles de seconde génération du laboratoire de Zoologie de l'Université de Mons utilisés pour la cytométrie en flux	73

M. GERARD, 2014. Influence d'un stress génétique sur la forme des ailes de Bourdons

Annexe 3: Article soumis à la revue Apidologie sur la discrimination des mâles de *Bombus terrestris* selon leur degré de ploïdie via les techniques de morphométries géométriques.74

1. Introduction

Insectes très courants dans nos régions, les bourdons sont néanmoins mal connus du grand public. Ils jouent pourtant un des rôles majeurs dans de nombreux écosystèmes. En effet, ils font partie des agents pollinisateurs principaux des plantes à fleurs. On compte 250 espèces de bourdons (Williams 1994, Williams 1998, Cameron et al. 2007). Les bourdons sont largement inféodés aux milieux tempérés, alpins ou boréaux de l'hémisphère nord (Goulson 2010). On trouve la plus grande diversité d'espèces dans les montagnes d'Asie centrale et à l'Est du Tibet, où leur distribution peut atteindre 5600m d'altitude dans l'Himalaya (Williams 1994).

Typiquement, ils présentent des patterns de couleurs diversifiés ce qui permet d'identifier certaines espèces. Cependant, au contraire de certains clades comme les oiseaux, d'autres espèces ne peuvent être discriminées que grâce à des traits morphologiques et morphométriques complexes, génétiques, ou chimiques. Cette difficulté lors de l'identification rebute de nombreux amateurs à s'y intéresser.

Le déclin des bourdons date probablement de plus d'un demi-siècle mais son ampleur et sa détection ne sont pas encore parfaitement maîtrisés par les scientifiques. Des nouveaux outils, notamment morphologiques, doivent être rapidement mis en place pour suivre les populations. Un bon diagnostic permettra de mieux conscientiser les pouvoirs publics afin de trouver les solutions nécessaires dans la conservation et la gestion de leurs habitats, au risque de voir certains écosystèmes disparaître.

1.1. Impact d'un stress génétique sur le phénotype

Le **phénotype** et le **génotype** sont deux notions distinctes mais complémentaires. Ces deux termes ont été introduits par Wilhelm Johannsen en 1909 et constituent un paradigme en biologie (Roll-Hansen 2008). Le phénotype résulte du génotype mais aussi de la pression environnementale. La relation entre le génotype et le phénotype n'est pas directe, d'autres facteurs sont à prendre en compte. Comme l'a dit Waddington en 1939: « *the appearance of a particular organ is the product of the genotype and the epigenotype, reacting with the external environment* ».

On distingue classiquement 3 sources de variation du phénotype : la variation d'origine génétique, la variation d'origine environnementale et la variation aléatoire du développement dont l'origine ne peut être attribuée à aucune des deux premières sources (Zakharov 1992, Palmer 1996).

La variabilité phénotypique peut être affectée par des effets déstabilisants (stress environnementaux, mutations, etc.) ainsi que par des effets stabilisants (effets de régulation) (Debat & David 2001). Les variations du phénotype sont plus ou moins rigides ou flexibles et certains mécanismes influencent cette rigidité (Waddington 1942, Schmalhausen 1949). Depuis les 7 dernières décennies, les variations du phénotype ont été caractérisées par 3 grands mécanismes: la canalisation, la plasticité phénotypique et la stabilité développementale.

La **canalisation** est le phénomène qui permet, en dépit des variations environnementales ou du génotype, de maintenir un phénotype pratiquement constant (Waddington 1942, Waddington 1961, Zakharov 1992). Selon certaines études, les mécanismes de canalisation due aux variations environnementales et due aux variations génotypiques sont différents (Stearns et al. 1995, Debat & David 2001). Dans une population, on peut mesurer cette canalisation comme la variance inter-individuelle comparée aux autres populations (Debat et al. 2000). Si un caractère est peu variable, on le considère comme canalisé.

Lorsque l'expression du génotype d'une entité biologique est altérée par des contraintes environnementales, exprimant des phénotypes différents, on parle de **plasticité phénotypique** (Bradshaw 1965). C'est donc la capacité à produire des phénotypes différents en fonction des conditions environnementales dans lesquelles se déroule le développement. On obtient alors un ensemble de phénotypes produits par un seul génotype.

La **stabilité développementale** consiste en une série de mécanismes qui permettent de garder le phénotype constant, malgré une série d'irrégularités développementales aléatoires, dans des conditions génétiques et environnementales données (Palmer & Strobeck 1986, Zakharov 1992). Les deux cotés d'un organisme à symétrie bilatérale sont contrôlés par les mêmes systèmes de gènes et sont exposés aux mêmes conditions environnementales. A partir de ce postulat, on considère que la variation intraindividuelle mesurée sur les 2 cotés symétriques et homologues de l'organisme reflète ces erreurs aléatoires au cours du développement (Palmer & Strobeck 1986). L'**asymétrie fluctuante** (fluctuating asymmetry, AF) est utilisée comme une mesure de l'instabilité développementale. Elle réfère à un état où la symétrie bilatérale est la norme et où les erreurs développementales produisent des asymétries individuelles. Elle résulte donc de la balance entre le bruit développemental et les mécanismes de régulation qui assurent la stabilité développementale (Klingenberg & McIntyre 1998). En règle générale, tous les caractères morphologiques présentent ce type d'asymétrie (**Figure 1**). Dans une population, on peut mesurer cette stabilité développementale comme la variance intra-individuelle comparée aux autres populations (Debat et al. 2000).

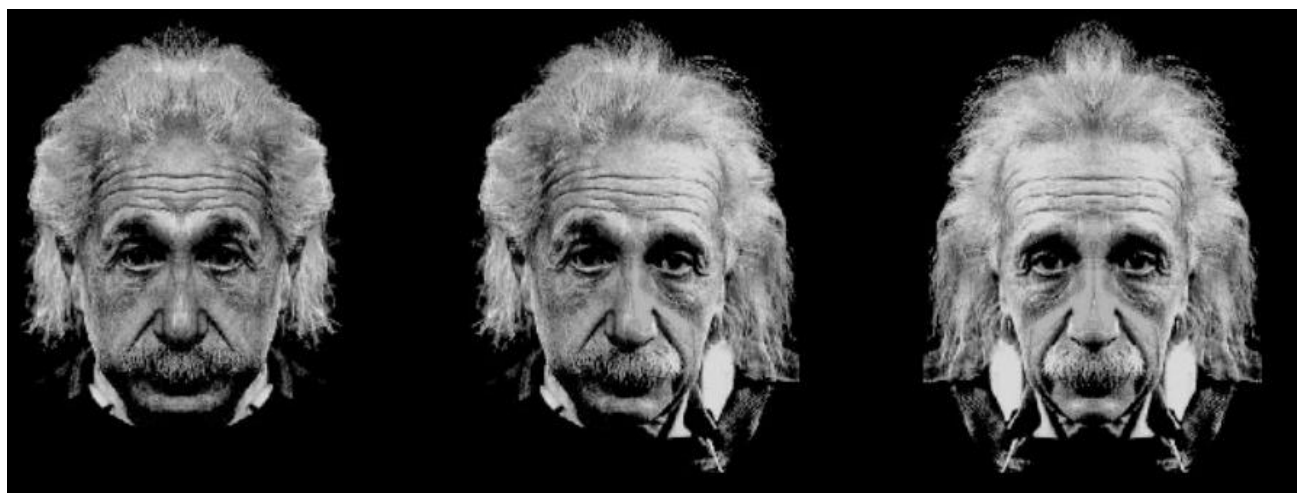


Figure 1: Représentation du visage d'Albert Einstein avec au centre, son visage réel, à gauche, une symétrie parfaite de son côté droit et à droite, une symétrie parfaite de son côté gauche (D. Harrison)

On rencontre 3 grands types d'asymétrie différents. Ils sont mesurés comme la différence entre les mesures du côté droit et celles du côté gauche (**Figure 2**).

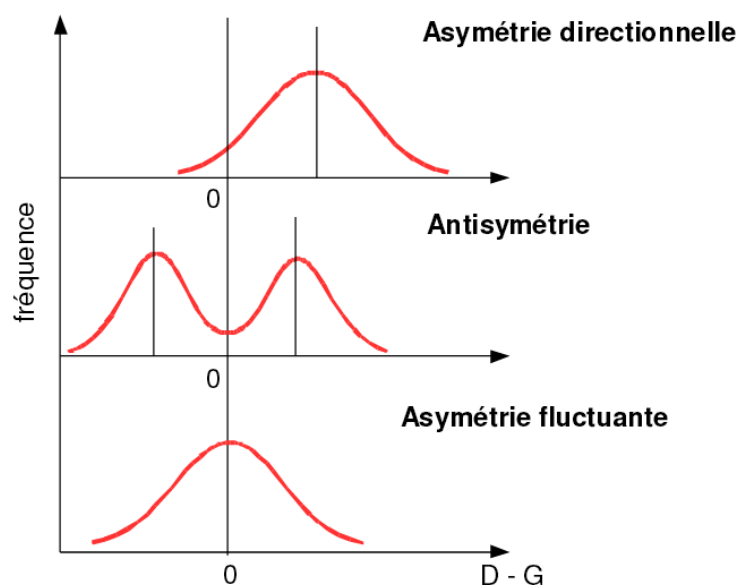


Figure 2: Graphique représentant la fréquence des 3 types d'asymétrie en fonction de la différence entre les mesures du côté droit et du côté gauche (V. Debat).

L'**antisymétrie** est un état où l'asymétrie est la norme mais où l'asymétrie en faveur du côté gauche ou du côté droit est tout aussi commun dans la population (Palmer & Strobeck 1986, Leamy & Klingenberg 2005). On la rencontre par exemple pour les organes internes des vertébrés. Ensuite, on

parle d'**asymétrie directionnelle** lorsque l'asymétrie montre une direction préférentielle. C'est un type d'asymétrie qui est répandu, par exemple au niveau des pinces du crabe violoniste (Pélabon & Hansen 2008). Enfin, l'**asymétrie fluctuante** qui, comme dit précédemment, résulte d'erreurs aléatoires lors du développement.

Les principales hypothèses pour les causes de la variation de la AF sont l'hétérozygotie (bien que cela soit contesté au vue des résultats discordants de certaines études, voir Mitton 1994), la consanguinité, le stress et la co-adaptation génomique (Clarke et al. 1992, Crespi & Vanderkist 1997).

Bien que la relation entre l'asymétrie fluctuante et le fitness d'un individu soit parfois remise en question, plusieurs études ont mis en évidence une corrélation entre ceux-ci (Moller 1994, voir Moller 1997 pour une revue, Ho et al. 2009). Chez plusieurs espèces menacées d'oiseaux kenyans, avec des populations fortement fragmentés, l'asymétrie fluctuante entre le tibia droit et gauche est significative (Lens et al. 1999). Parmi les insectes, la précision du vol diminue lorsque l'asymétrie des ailes augmente (Moller & Swaddle 1997, Clarke 1998, Samejima & Tsubaki 2010). Pinto et al. (2012) ont montré une différence significative entre l'asymétrie d'ailes d'Odonates provenant d'habitats fortement altérés et celle d'habitats préservés, une hypothèse déjà proposée par Moller (1997). L'asymétrie fluctuante peut également avoir un rôle négatif dans la sélection sexuelle (Moller 1992, Bennet et al. 1996).

Tout caractère n'est pas approprié pour évaluer l'AF et en interpréter la stabilité développementale. Idéalement, si on veut interpréter la stabilité développementale, le bon fonctionnement du caractère doit être en relation avec sa symétrie (Clarke 1993). Les caractères sur lesquels l'asymétrie peut avoir un impact considérable au niveau du fitness présentent souvent une part d'asymétrie fluctuante plus faible (Clarke 1998). Ce sont des caractères qui présentent souvent une structure fonctionnelle vitale. D'autres caractères extrêmement labiles ne nécessitent pas une symétrie forte pour leur fonctionnement et peuvent dès lors présenter une asymétrie naturelle importante. Ces caractères ne sont souvent pas liés à une pression de sélection.

1.2. Déclin des bourdons

1.2.1. Ampleur et causes du déclin

Depuis plus d'une dizaine d'années, les abeilles subissent un déclin, particulièrement étudié en Europe et en Amérique du Nord (Biesmeijer et al. 2006, Patiny et al. 2009, Williams & Osborne 2009). Parmi celles-ci, les bourdons constituent le groupe dont le déclin est le plus documenté (Williams 1982, 1986, Colla & Packer 2008, Potts et al. 2010, Brown 2011, Cameron et al. 2011, IUCN 2013). Selon les derniers recensements de l'IUCN en Europe, alors que 35% des espèces de bourdons restent stables et que 10% sont en expansion, 46% des espèces sont en régression (IUCN 2013). Vingt-deux pourcents des espèces de bourdons européennes sont d'ailleurs menacées d'extinction (IUCN, Bumblebee Specialist Group Report 2013).

Un déclin des bourdons peut entraîner une chute de diversité des plantes à fleurs pour lesquels ils sont les principaux agents pollinisateurs (Kremen et al. 2004, Goulson et al. 2008, Cavaleiro et al. 2013). Une disparition de nombreuses espèces de bourdons aurait également un coût économique non-négligeable au regard des bénéfices qu'ils apportent lors de la pollinisation des fleurs cultivées (Kevan & Phillips 2001, Pimentel et al. 2007, Garibaldi et al. 2013). Ces cultures de plantes à fleurs pollinisées par des insectes constituent d'ailleurs un écosystème terrestre très vulnérable (Klein et al. 2007). Trente-cinq pourcents de notre alimentation est issue de champs ayant bénéficiés de la pollinisation (Klein et al. 2007). De plus, la pollinisation des insectes augmente de 75% la production des cultures et les bourdons sont les principaux pollinisateurs de ces plantes cultivées (Klein et al. 2007).

Différents facteurs primaires jouent un rôle négatif majeur sur l'abondance et la diversité des bourdons: la perte et la fragmentation d'habitat, la compétition avec les espèces invasives, le développement de parasites et des maladies, les changements climatiques, le changement de pratiques agricoles ainsi que l'utilisation de pesticides (Brown & Paxton 2009, Patiny et al. 2009, revue dans Winfree 2010). La colonisation de la Nouvelle-Zélande par *Bombus terrestris* constitue un exemple concret d'une espèce potentiellement invasive, conséquence de sa commercialisation pour l'amélioration de pratiques agricoles (Schmid-Hempel et al. 2007). Aux USA, ce sont des colonies de *Bombus impatiens* et de *Bombus occidentalis* qui sont commercialisées. Elles contiennent souvent une quantité de parasites (tel *Nosema bombi* et *Crithidia bombi*) plus élevée que les populations sauvages. En contact avec les populations sauvages, ces parasites peuvent avoir un

impact important sur les espèces natives (Brown et al. 2003).

Quelques traits éthologiques propres aux bourdons les rendent particulièrement vulnérables à l'extinction. Citons notamment le fait qu'ils aient besoin de 3 types d'habitat au cours de leur cycle de vie, des habitats qui peuvent s'avérer différents. Un premier pour butiner, un second pour nidifier et un troisième pour hiverner. Tout en pouvant être des lieux différents, ces habitats doivent cependant être proches à cause de la relativement faible capacité de dispersion d'un bourdon. La diminution des sites de nidification accentue l'impact de cette contrainte (Goulson et al. 2008).

Ces facteurs primaires entraînent également des facteurs extrinsèques de déclin, notamment des facteurs génétiques comme la diminution de la richesse allélique ou des phénomènes de consanguinité. Ces facteurs sont souvent sous-estimés bien qu'ils puissent jouer un rôle important chez les bourdons (Zayed 2009).

1.2.2. La dérive génique chez les bourdons

En règle générale, le succès d'une population ou d'une espèce est déterminé par sa capacité à être positivement sélectionnée au cours du temps. Différents phénomènes de sélection impactent sur la fréquence allélique, que ce soit négativement ou positivement. Dans le cas d'une population de taille importante et en contact avec d'autres populations via un flux génique, c'est la sélection naturelle qui détermine majoritairement les caractères génotypiques transmis aux générations suivantes (Frankham et al. 2002, Raven et al. 2007). Cependant, l'isolement d'une population peut influencer sa croissance et sa survie par l'absence d'apport d'allèles provenant de populations extérieures et donc l'augmentation des risques stochastiques d'extinction. Cet isolement a d'autant plus d'impact que la population est petite. En effet, lorsque la taille d'une population diminue, un autre processus intervient de manière significative : **la dérive génique** (Frankham et al. 2002, Raven et al. 2007).

Encadré 1. Vocabulaire relatif à la dérive génique et son impact chez les bourdons

Dépression consanguine : Réduction de fitness de la descendance produite par un accouplement consanguin et les effets négatifs sous-jacents.

Dérive génique : Changement de fréquence allélique dans une population à la suite d'un phénomène aléatoire.

Haplodiploïdie : Système de détermination sexuelle où les mâles, haploïdes se développent d'œufs non-fertilisés et les femelles, diploïdes, se développent d'œufs fertilisés.

Mâle diploïde : Dans le cadre des abeilles, un mâle diploïde est engendré lorsqu'un individu est homozygote pour le locus sl-CSD. Ils sont souvent stériles ou non-viables.

Mortalité femelle : Diminution de la proportion d'ouvrières dans une colonie en conséquence de la production de mâles diploïdes. Elle engendre une réduction de la force de travail.

Sl-CSD : Locus simple (Single locus Complementary Sex Determiner) qui intervient dans la détermination du sexe chez de nombreux Hyménoptères.

Vortex d'extinction des mâles diploïdes : Vortex dans lequel des facteurs extrinsèques comme la fragmentation d'habitat mènent à la diminution de taille d'une population, l'augmentation de la production de mâles diploïdes et en conséquence, du risque d'extinction d'une population.

Lorsqu'une petite population est isolée, la probabilité de perdre une part des allèles de la population de base est importante (**Figure 3**). Cette dérive génique a un effet particulièrement significatif dans deux cas : lorsque des effets fondateurs surviennent ou en conséquence d'un goulot d'étranglement. Dans le cas de l'effet fondateur, une partie d'une population migre, stoppant tout flux génique avec la population initiale. Dans cette fraction d'individus, la diversité allélique est probablement plus faible que dans la population de base : certains allèles peuvent avoir disparu, d'autres peuvent être surreprésentés. Dans le cas d'un goulot d'étranglement, la population ne se déplace pas mais des facteurs environnementaux ou une épidémie par exemple l'ont considérablement réduite. De ce fait, les allèles sélectionnés auront une fréquence supérieure à celle de leur population initiale tandis que d'autres auront disparu (Raven et al. 2007).

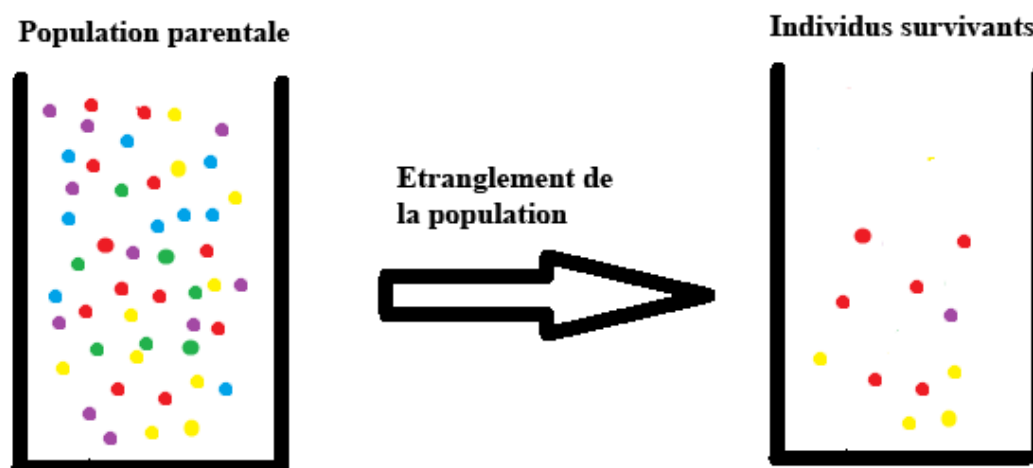


Figure 3: Etranglement d'une population entraînant une dérive génique. Les différentes couleurs représentent différents allèles portés par des individus différents. Seuls certains allèles seront sélectionnés au hasard pour la génération suivante.

Un autre risque qui pèse sur une population de faible taille est la consanguinité (« *inbreeding* ») et l'expression d'allèles délétères qu'elle peut entraîner. Les coûts engendrés par cette consanguinité sont appelés « **dépression consanguine** ». L'ampleur de cette dépression est souvent plus grande lorsque l'espèce ne subit habituellement pas d'accouplement consanguin (accouplements de type « *outbreeding* ») et que la population subit un stress (Armbruster & Reed 2005). Dans des populations consanguines, les allèles délétères avec un faible effet sélectif seront fixés (Keller & Waller 2002). Au contraire, la consanguinité d'une population peut parfois avoir certains effets positifs. En effet, elle va rapidement exposer à la sélection des mutations récessives létales, ce qui va les éliminer même chez de petites populations isolées. On observe d'ailleurs des espèces d'Hyménoptères avec un taux de consanguinité extrêmement élevé, comme c'est le cas chez la guêpe *Ancistrocerus antilope* ou la fourmi *Plagiolepis pygmaea* (Chapman & Stewart 1996, Thurin & Aron 2009).

Chez les abeilles, plusieurs études mettent en évidence l'influence de la fragmentation d'une population sur la richesse génétique de celle-ci (Ellis et al. 2006, Davis et al. 2010). Chez *Colletes floralis*, une espèce d'abeille solitaire rare, des analyses moléculaires montrent une grande différenciation génétique entre les différentes populations isolées (Davis et al. 2010). Ellis et al. (2006) ont mis en évidence une différence significative de diversité allélique entre les populations fragmentées britanniques de *Bombus sylvarum* et les populations françaises où le flux génique était possible. Des études basées sur d'autres espèces de bourdons ont également mis en avant la relation entre la rareté d'une espèce et la réduction de la diversité génétique, voir la différenciation génétique élevée entre les différentes populations d'une même espèce (Lozier & Cameron 2009, Charman et al. 2010, Cameron et al. 2011). Un flux génique faible n'est cependant pas une constante chez les

espèces d'abeilles en déclin (Estoup et al. 1996, Lozier et al. 2011).

Enfin, chez les espèces d'abeilles eusociales, seule une petite part de la population est capable de se reproduire. La contrainte génétique qui pèse sur ces espèces s'accroît au regard des espèces solitaires. Cet impact est d'autant plus fort puisque les espèces sont haplo-diploïdes : elles possèdent moins de copies de gènes en comparaison d'une population diploïde de même taille.

1.3. Le système haplo-diploïde des abeilles

1.3.1. Le système haplo-diploïde et le locus CSD

Comme chez tous les Hyménoptères, la détermination sexuelle chez les abeilles se fait par un système d'**haplodiploïdie**. Environ 20% des animaux utilisent ce système de détermination sexuelle (Bull 1983). Les Hyménoptères femelles se développent à partir d'œufs fécondés et ont donc une quantité « $2n$ » d'ADN. Elles sont par conséquent diploïdes. Les mâles se développent à partir d'œufs non-fécondés et ont donc une quantité « n » d'ADN. Ils sont par conséquent haploïdes. C'est le mode de reproduction présent chez les Hyménoptères, où les mâles se développent parthénogénétiquement à partir d'œufs non-fertilisés (Cook & Crozier 1995, Van Wilgenburg et al. 2006).

Un unique locus intervient lors de la détermination sexuelle de certains Hyménoptères (dont probablement la majeure partie des Apidae): le **sl-CSD** (single-locus Complementary Sex Determiner) (Whiting 1933, Whiting 1943, Crozier 1971). Le sl-CSD est un caractère présumé ancestral chez les Hyménoptères (Crozier 1977, Asplen et al. 2009, Zayed 2009). Les femelles sont hétérozygotes pour ce locus alors que les mâles haploïdes sont hémizygotes. Cependant, si un homozygote pour cet allèle est produit, un **mâle diploïde** sera engendré (Duchateau et al. 1994) (**Figure 4**). Malgré le séquençage du sl-CSD chez *Apis mellifera*, son fonctionnement d'un point de vue moléculaire n'est pas encore compris (Beye et al. 2003, Beye 2004).

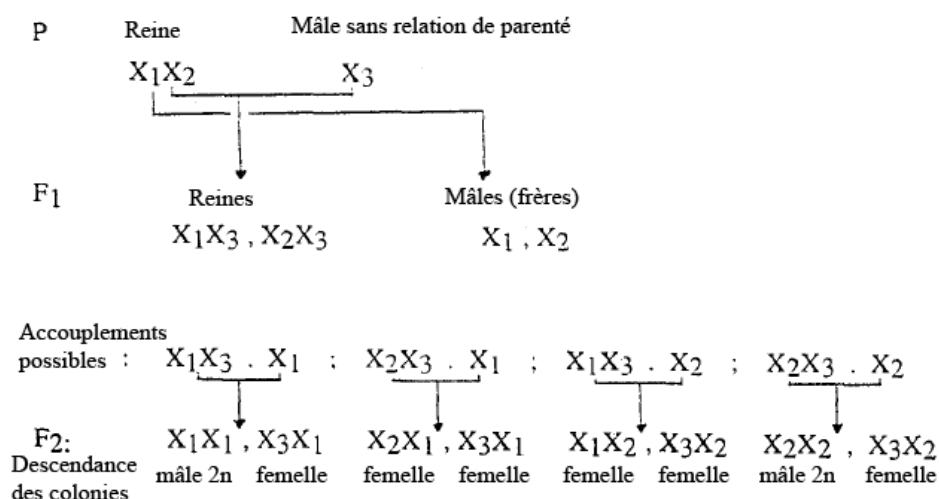


Figure 4 : généalogie de *Bombus terrestris* présentant les allèles sexuels des accouplements frères/sœurs et leur descendance (Duchateau et al. 1994).

On pensait que l'haploïdie des mâles permettait la purge des allèles récessifs et de ce fait, préservait les espèces haplo-diploïdes d'un risque d'extinction pour causes génétiques (Hedrick & Parker 1997, Luna & Hawkins 2004). En effet, les allèles récessifs délétères non-exprimés dans une femelle hétérozygote sont exprimés chez les mâles haploïdes et donc éliminés sous l'effet de la sélection. Cependant, le sl-CSD apporte un fardeau génétique dans les petites populations lorsqu'il est homozygote (Zayed & Paker 2005).

Pour les espèces haplodiploïdes sans sl-CSD (ex. présence d'un ml-CSD), l'effet de la dépression par consanguinité est moindre puisque le système purge les allèles délétères sans le coût de production de mâles diploïdes (Gerloff & Schmid-Hempel 2005). De manière générale, on remarque que les espèces dont le sexe est déterminé par un sl-CSD montrent une proportion de femelles plus faible dans leurs populations ainsi qu'une taille effective de colonie réduite (Zayed 2004).

Chez certaines espèces d'Hyménoptères, on note pourtant un faible pourcentage de mâles diploïdes malgré le taux de consanguinité très élevé. Plusieurs hypothèses permettent d'expliquer ces observations: une mortalité élevée des mâles diploïdes lors des stades pré-imaginaux, une barrière au niveau du sperme contenant l'allèle commun du locus CSD lors de sa rencontre avec l'ovule, la présence d'un ml-CSD ou la reconnaissance d'individus portant le même allèle (Paxton et al. 2000, Ruf et al. 2013).

Chez certaines espèces, l'accouplement entre un mâle diploïde fertile et une femelle peut engendrer la production de femelles triploïdes due à un sperme diploïde (Ayabe et al. 2004, Darvill et al. 2012).

La présence d'individus triploïdes a été confirmée par des analyses cytologiques en 2004 chez *Apis mellifera* mais aussi chez certains bourdons (Ayabe et al. 2004, Takahashi et al. 2008, Darvill et al. 2012). Les œufs de femelles triploïdes sont rarement viables : souvent, les ouvrières ne nourrissent pas ces larves. Les mâles triploïdes sont quant à eux plus petits que les mâles diploïdes et haploïdes (Ayabe et al. 2004). Le fait de trouver une femelle triploïde dans une population indique directement que l'espèce produit des mâles diploïdes viables et fertiles. Cependant, les colonies triploïdes semblent souvent très petites (Ayabe et al. 2004).

1.3.2. Les mâles diploïdes chez les abeilles et leurs coûts

Selon les derniers recensements (van Wilgenburg et al. 2006, Heimpel & de Boer 2008, Zayed 2009, Darvill et al. 2012), plus de 80 espèces d'Hyménoptères produisent des mâles diploïdes dont 27 espèces d'abeilles (**Tableau 1**). Des femelles triploïdes ont été trouvées chez 17 espèces d'Hyménoptères (Darvill et al. 2012). Contrairement aux colonies de bourdons, les colonies d'*Apis mellifera* et celles de nombreuses fourmis éliminent les mâles diploïdes durant les stades larvaires (Woyke 1963). Chez *Apis mellifera*, c'est par cannibalisme que les larves sont éliminées. Cependant, ces mâles diploïdes ne sont reconnus que durant les 72 premières heures suivant leur éclosion (Herrmann et al. 2005). Au contraire, chez *Bombus*, *Lasioglossum zephyrum*, *Melipona quadrifasciata* ou *Solenopsis invicta*, les mâles diploïdes atteignent l'âge adulte (Duchateau & Marien 1995).

Tableau 1 : Hyménoptères Apoïdes où des mâles diploïdes ont été mis en évidence. D'après Zayed (2009)

Espèces	Référence
Famille: Andrenidae	
<i>Andrena scotica</i>	Paxton et al., 2000
Famille: Halictidae	
<i>Augochlorella striata</i>	Packer and Owen, 1990
<i>Halictus poeyi</i>	Zayed and Packer, 2001
<i>Lasioglossum leucozonium</i>	Zayed et al., 2007
<i>Lasioglossum zephyrum</i>	Kukuk and May, 1990
Famille: Megachilidae	
<i>Megachile rotundata</i>	McCorquodale and Owen, 1994
Famille: Apidae	
<i>Apis cerana</i>	Woyke, 1979
<i>Apis mellifera</i>	Adams et al., 1977; and others
<i>Bombus atratus</i>	Plowright and Pallett, 1979
<i>Bombus florilegus</i>	Takahashi et al., 2008
<i>Bombus impatiens</i>	Zayed et al. Unpublished
<i>Bombus muscorum</i>	Darvill et al., 2006
<i>Bombus sylvarum</i>	Ellis et al., 2006
<i>Bombus terrestris</i>	Duchateau et al., 1994
<i>Eufriesca magrettii</i>	Lopez-Urbe et al., 2007
<i>Euglossa imperialis</i>	Zayed et al., 2004
<i>Euglossa mandibularis</i>	Takahashi et al., 2001
<i>Euglossa meriana</i>	Roubik et al., 1996
<i>Euglossa piliventris</i>	Lopez-Urbe et al., 2007
<i>Euglossa sapphirina</i>	Roubik et al., 1996
<i>Euglossa tridentata</i>	Roubik et al., 1996
<i>Eulaema cingulata</i>	Lopez-Urbe et al., 2007
<i>Melipona compressipes</i>	Kerr, 1987
<i>Melipona scutellaris</i>	Cavalho, 2001
<i>Melipona quadrifasciata</i>	Camargo, 1979
<i>Scaptotrigona postica</i>	Paxton et al., 2003
<i>Trigona carbonaria</i>	Green and Oldroyd, 2002

La production de mâles diploïdes peut avoir un coût génétique important pour une population (Revue dans Zayed 2009). Une partie de la progéniture femelle, si elle est homozygote pour le sl-CSD, sera perdue puisque des mâles diploïdes seront produits à leur place. On dit donc qu'ils augmentent la **mortalité femelle** (Zayed 2009). Cette mortalité femelle va diminuer le taux de croissance d'une population, d'autant plus si la survie de la colonie est une fonction du nombre d'ouvrières (Zayed 2009). Cette augmentation de la mortalité de la colonie a été démontrée empiriquement tant lors

d'études en laboratoire (Plowright & Pallett 1979) que lors d'études de terrain (Ross & Fletcher 1986).

Zayed & Packer (2005) proposent la notion de **vortex des mâles diploïdes** qui peut mener à l'extinction d'une population (**Figure 5**). Dans ce vortex, des facteurs extrinsèques (par exemple la fragmentation d'habitat) diminuent la taille de la population. Cette diminution entraîne la perte de diversité allélique du sl-CSD et favorise les accouplements consanguins, ce qui engendre l'augmentation de la production de mâles diploïdes, qui à son tour abouti à renforcer la diminution du taux de croissance de cette population. Ce vortex accentue donc la réduction de la taille de la population déjà basse. Le risque d'extinction d'une population entraînée dans ce vortex est plus grand chez les espèces dont les mâles diploïdes sont stériles (ou engendrent une descendance non-viable) que chez les espèces où les mâles sont eux-mêmes non viables puisque ces premiers se reproduiront avec une femelle monandre (Zayed 2009). Le sl-CSD semble être un **acteur majeur dans les phénomènes d'extinction** des Hyménoptères mais son rôle est cependant rarement pris en compte (Zayed & Packer 2005).

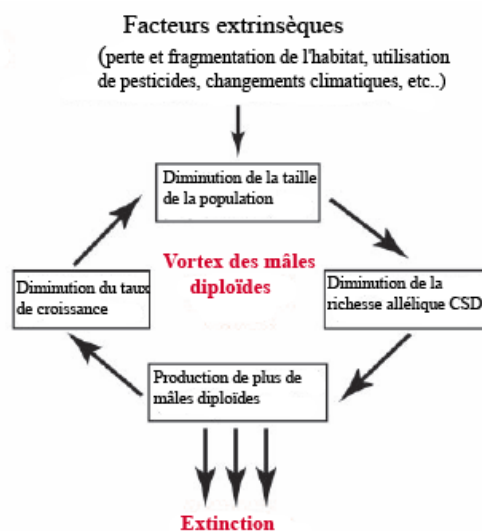


Figure 5: Vortex des mâles diploïdes. D'après Zayed & Packer 2005.

La proportion de mâles diploïdes dans une population a été utilisée comme **indicateur de la santé génétique d'une population** d'abeilles pollinisatrices, notamment dans les populations d'Euglosses au Brésil et au Panama (Roubik et al. 1996, Zayed et al. 2004). Dans ces populations, le taux de mâles diploïdes était particulièrement élevé par rapport à la taille de la population estimée par comptage d'individus. La taille de cette population estimée par comptage était sous-estimée. Une estimation de celle-ci par des analyses de diversité génétique et le ratio mâles diploïdes/mâles

haploïdes est plus appropriée.

1.3.3. Les mâles diploïdes de bourdons

Contrairement à la plupart des autres Hyménoptères (Armitage et al. 2010, Kureck et al. 2013), la taille des mâles diploïdes de *Bombus terrestris* est significativement inférieure à celle des mâles haploïdes (Duchateau & Marien 1995). Morphologiquement, les mâles diploïdes de *Bombus terrestris* ont de plus petites testicules que les haploïdes et produisent beaucoup moins de spermatozoïdes (et possèdent donc une plus faible fertilité) (Duchateau & Marien 1995). De plus, les spermatozoïdes des mâles diploïdes sont plus courts que ceux des mâles haploïdes (130,4µm contre 151µm) (Duchateau & Marien 1995).

Les mâles diploïdes se reproduisent à un âge plus précoce que les mâles haploïdes (12 jours pour les diploïdes contre 16 jours pour les haploïdes) et meurent plus tôt également. La réponse immunitaire est plus forte chez les ouvrières que chez les mâles haploïdes, elle-même plus forte que pour les mâles diploïdes (Gerloff et al. 2003).

Le succès de fondation d'une colonie est moindre lorsqu'il existe un lien de parenté lors de l'accouplement entre un mâle et une reine, tout comme le succès de l'hivernation. Le nombre d'ouvrières est environ 2 fois plus petit dans les colonies consanguines avec mâles diploïdes que dans les colonies non-consanguines (**Figure 3**) (Gerloff & Schmid-Hempel 2005). Le nombre d'œufs pondus dans ces colonies consanguines est également plus faible (Beekman et al. 1999). La production de mâles diploïdes dans une colonie de bourdons diminue donc sa capacité de pollinisation et a une influence significative sur le succès global de la colonie (Duchateau et al. 1994). Cependant, un accouplement consanguin n'entraîne pas obligatoirement la production de mâles diploïdes. Gerloff & Schmid-Hempel (2005) ont obtenu des mâles diploïdes dans 49% de leurs colonies consanguines (**Figure 3**).

Certaines études ont tenté de quantifier la présence de mâles diploïdes et d'estimer le taux de consanguinité dans des populations sauvages. Au Japon, dans les populations d'une espèce rare et insulaire de bourdon (*Bombus florigelus*), 28% des mâles étaient des mâles diploïdes (Takahashi et al. 2008). Dans les populations britanniques d'un bourdon rare à petites populations (*Bombus muscorum*), 5% des mâles collectés étaient des mâles diploïdes, un taux similaire pour ses 3 sous-espèces (Darvill et al. 2006).

1.4. Objectifs du mémoire

La consanguinité est un facteur qui peut être déterminant lors du déclin d'une population. Son évaluation est donc un élément clé pour la biologie de la conservation. Chez les Hyménoptères dont la détermination sexuelle est généralement basée sur le sl-CSD, elle augmente la probabilité de production de mâles diploïdes, qui à leur tour augmentent le risque de déclin. La proportion de ces mâles dans une population pourrait donc être utilisée comme indicateur de la santé génétique de cette population car elle est directement liée à la diversité allélique du sl-CSD. Une détection rapide et précoce de l'augmentation de la proportion des mâles diploïdes permettrait d'engager des politiques de conservation particulières afin de préserver la biodiversité.

Cependant, le degré de ploïdie des mâles de bourdons et la diversité génétique des populations ne sont jusqu'à présent détectés que par des outils biomoléculaires (Darvill et al. 2006, Maebe et al. 2013). Ceux-ci sont efficaces mais présentent certaines limites. Ces techniques nécessitent notamment des chercheurs expérimentés et des équipements particuliers, ont toujours un coût non-négligeable, et restent des techniques invasives qui endommagent les spécimens analysés. De plus, elles requièrent généralement un ADN de bonne qualité qui ne peut être extrait que d'échantillons bien conservés et plus ou moins récents. Ces limites rendent donc difficile l'évaluation d'un stress génique d'une population.

Le but de ce mémoire est dans un premier temps de mesurer l'impact de la consanguinité sur la forme de l'aile des mâles de *Bombus terrestris*. L'hypothèse est que la forme de l'aile est influencée par le degré de ploïdie, entraînant une différence de forme d'aile entre les mâles haploïdes et diploïdes.

Dans un second temps, l'effet de la consanguinité sur la stabilité développementale sera testée sur la forme de l'aile antérieure. La stabilité développementale est évaluée par la mesure de l'asymétrie fluctuante (AF) entre l'aile gauche et droite. Cette mesure est réalisée sur les individus de *Bombus terrestris* de 2 générations différentes pour mettre d'une part en évidence : (i) la variation de AF entre les ouvrières de la génération mère et celles de la génération fille consanguine et d'autre part, (ii) la variation de AF en fonction du degré de ploïdie des mâles. Ces résultats permettront d'évaluer l'influence d'un stress génétique sur un caractère phénotypique.

2. Matériel et méthodes

2.1. Modèle biologique

2.1.1. Généralités

L'espèce sur laquelle se base ce mémoire est *Bombus terrestris* (**Figure 6**). C'est une des espèces les plus communes de bourdons. Elle appartient à l'ordre des Hyménoptères, à la famille des Apidae, à la tribu des Bombini et au sous-genre *Bombus sensu stricto*. *Bombus terrestris* est d'origine Ouest-Paléarctique centrée sur la méditerranée dont la répartition s'étend de Helsinki au Nord et jusque l'Altaï à l'Est (Rasmont et al. 2008, Williams et al. 2012). Elle a été introduite au Japon, en Tasmanie ou encore au Chili pour la pollinisation de cultures en serre. Dans toutes ces régions, cette espèce s'est établie et est parfois invasive (Goulson et al. 2008).



Figure 6 : *Bombus terrestris*. Source : Hanssens Bart (www.observations.be)

Bombus terrestris est une des espèces les plus facile à élever en condition de laboratoire, elle présente un succès élevé lors de l'oviposition (Yoneda et al. 2008). Comme la grande majorité des bourdons, *B. terrestris* est une espèce monandre. Dans la nature, aucun cas de polyandrie n'a été confirmé par la génétique chez ces individus (Duvoisin et al. 1999).

2.1.2. Cycle de vie

A la différence de l'abeille domestique, les bourdons ont en général un cycle annuel et sont des insectes eusociaux primitifs car la reine est solitaire durant une partie du cycle de la colonie (**Figure 7**). L'organisation de la colonie comporte trois castes, dont une caste non-reproductive, les ouvrières

(Alford 1975, Goulson 2010).

La sortie d'hibernation d'une reine se produit durant la fin de l'hiver ou le début du printemps. A ce moment, la reine cherche un site de nidification, dans ou sur le sol selon les espèces (un nid à l'abandon d'un rongeur par exemple). Elle y fabrique un pain de pollen sur lequel elle va pondre la première couvée. Après environ 4 jours, une larve éclot de l'œuf et se nourrit de pollen. Le cycle de développement d'une ouvrière prend environ 1 mois (Alford 1975, Goulson 2010). Les ouvrières du premier couvain s'occupent alors de la récolte de pollen et de nectar ainsi que du nourrissage des futures larves. A partir d'une certaine taille, la colonie commence à produire des sexués (mâles haploïdes issus d'œufs non-fertilisés et nouvelles reines). Les mâles sont produits plus tôt que les femelles fécondes. Ils prennent en moyenne 26 jours pour passer de l'œuf au stade imago et sont fertiles 5 jours après leur émergence. Les reines prennent environ 30 jours à se développer (Duchateau & Velthuis 1988, Amin et al. 2012).

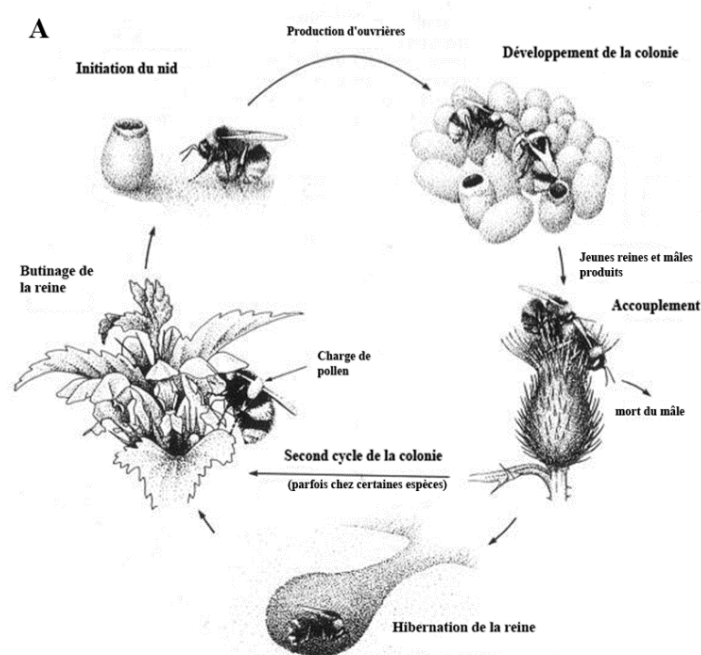


Figure 7: cycle de vie des bourdons du genre *Bombus*. Source : <http://www.bumblebee.org>

Les reines nouvellement écloses quittent le nid en vue de l'accouplement environ 3 jours après leur émergence, tout comme les mâles. Après l'accouplement, les nouvelles reines cherchent un endroit pour hiberner jusqu'au printemps suivant tandis que les mâles, les ouvrières et l'ancienne reine meurent (Alford 1975, Goulson 2010). Cette entrée en hibernation n'est pas sous le contrôle de facteurs physico-chimiques mais sous le contrôle hormonal (Roseler 1985). En conditions naturelles, la diapause peut durer de 6 à 9 mois. Les reines ont besoin d'une grande réserve en graisse. En effet,

les reines de moins de 0,6g ne survivent pas à l'hibernation (Beekman et al. 1998).

2.2. Mode opératoire pour l'élevage de *Bombus terrestris*

Des élevages de *B. terrestris* sont mis en place au sein du laboratoire de Zoologie (UMons) suivant le protocole décrit dans Lhomme et al. (2013). Les colonies sont fournies par la firme Biobest N.V. (Westerlo, Belgique) (**Figure 8**). Les colonies de *B. terrestris* sont élevées dans des pièces climatisées entre 28 et 30°C et avec une humidité relative de 60%, contrôlée par un humidificateur. Une lumière rouge est installée dans la salle d'élevage, ce qui permet une manipulation plus aisée des bourdons puisque ceux-ci ne perçoivent pas cette longueur d'onde. Les colonies sont nourries tous les trois jours avec des "candies" composés de pollen de saule (grains décongelés) associé à un mélange de sucre et d'eau (Biogluc pink ®) de sorte à obtenir une pâte malléable et assez solide (Roseler 1985). Ces candies sont stockés au congélateur jusqu'à leur utilisation. Sous la colonie se trouve également un récipient de Biogluc pink ® qui, en plus d'être un mélange d'eau et de sucre, contient des antibiotiques, un colorant rose et des vitamines.



Figure 8: Colonie de *Bombus terrestris* fournie par la firme Biobest N.V. (Photographie : M. Gérard).

Afin de produire des colonies consanguines, des accouplements entre frères et sœurs sont forcés. Puisque les ouvrières produisent également des mâles, les mâles qui émergent 27 jours après la mort de la reine ne sont plus sélectionnés pour éviter de prendre un mâle qui ne soit pas le frère d'une reine émergente. L'accouplement est réalisé 3 à 6 jours après l'émergence des reines car 10 jours

après l'émergence, l'accouplement a rarement lieu (Roseler 1985). Cet accouplement se fait à une température d'environ 25°C et dans une cage de vol d'une taille de 65 x 37 x 45cm. Il se déroule en lumière naturelle. Dans cette cage, on met une reine pour 2 à 3 mâles car la présence de plusieurs mâles semble les stimuler à prendre rapidement l'initiative de s'accoupler. Le couple est isolé pour ne pas être perturbé durant l'accouplement. Chaque mâle utilisé pour la reproduction est tué et conservé. Les autres individus de la colonie sont tués et conservés dans de l'éthanol.

Une fois les reines fécondées, elles sont isolées durant 7 jours avec un candy *ad libitum* puis placées en hibernation dans une boîte d'allumettes et avec un morceau de papier humidifié pour y garantir une humidité élevée. La durée de la diapause des reines a une influence très forte sur leur survie, l'optimal de diapause en conditions d'élevage se trouve entre 1 et 3 mois. Au-delà, la probabilité pour une reine de rester en vie décroît. Beekman *et al.* (1998) montrent que l'association d'une température d'hibernation de 5°C et une durée d'hibernation de 2 mois est la combinaison la plus efficace.

Après 2 mois d'une hibernation, les reines subissent une narcose au CO₂ pour induire l'ovogenèse et la ponte des œufs (Karsil & Gurel 2013). Pour cette narcose, les reines sont placées dans un seau durant 30 minutes avec un apport en CO₂ constant. Après cette narcose, les reines sont placées dans des cages de vol de 40x30x30 cm et à température ambiante (25°C) durant une semaine. Les reines sont exposées à une photopériode de 8h de lumière et 16h d'obscurité durant les 3 premiers jours dans la cage de vol, puis subissent un traitement de réveil de 24h de lumière. C'est le traitement qui montre le plus grand taux de réussite au sortir de l'hibernation (Yoon et al. 2010).

Trois à six jours après que les reines soient redevenues actives, on les transfère dans une pièce climatisée, dans une microcolonie en plastique de taille 16x11x7 cm (Roseler 1985). Pour l'initiation d'une colonie, les reines fécondées sont mises en présence de cocons contenant de jeunes pupes et 2 ouvrières de *B. terrestris*. Dans la nature, les reines de bourdons commencent à pondre les œufs dans des coupoles de cire. L'ajout d'un cocon contenant une puce mâle est plus efficace pour la ponte des œufs par la reine, d'autant plus efficace lorsqu'il est placé de manière horizontale (Kwon et al. 2003).

Le début de la ponte commence la plupart du temps 7-8 jours après la mise en présence des ouvrières. Lorsque les ouvrières sont trop vieilles, c'est à dire vers 5 jours, on les retire pour les remplacer par de nouvelles ouvrières. Cela permet d'empêcher d'atteindre le point de compétition (Roseler 1985). La probabilité que les reines fondent une colonie plus de 6 semaines après la sortie d'hibernation est faible (Gerloff & Schmid-Hempel 2005).

Les différentes étapes d'élevage au Laboratoire de Zoologie se succèdent selon les dates précisées dans le **tableau 2**. En plus de ces spécimens, le jeu de données est complété par des mâles haploïdes et diploïdes issus d'élevages réalisés par la société Biobest N.V.. Ces individus permettent d'avoir des spécimens issus de colonies mères différentes et donc de ne pas avoir les biais dus à un élevage issu d'une seule colonie.

Tableau 2. Calendrier de l'élevage de *Bombus terrestris* au Laboratoire de Zoologie de Mons

<i>24 octobre 2012</i>	Les colonies Biobest N.V. sont reçues.
<i>26 novembre</i>	Les premiers sexués émergent.
<i>5 décembre</i>	Les accouplements sont réalisés. Les accouplements ont duré entre 20 et 30 minutes. Seize mâles se sont accouplés avec les 11 reines issues de la colonie mère.
<i>12 décembre</i>	Les 11 reines fécondées sont mises en hibernation dans la chambre froide à 4°C du laboratoire de Biologie Marine (Prof. Igor Eeckaut).
<i>27 février 2013</i>	La sortie d'hibernation est réalisée. Une des 11 reines n'a pas survécu à l'hibernation.
<i>1^{er} mars</i>	La narcose au CO ₂ se réalise sur les 10 reines restantes.
<i>2-29 avril</i>	Les premières ouvrières et mâles émergent des microcolonies. Des individus émergent jusqu'au 29 avril, date à laquelle tous les individus des colonies sont tués et les mâles conservés à -80°C.

Un arbre récapitulatif permet de donner un aperçu des spécimens étudiés (**Figure 9**).

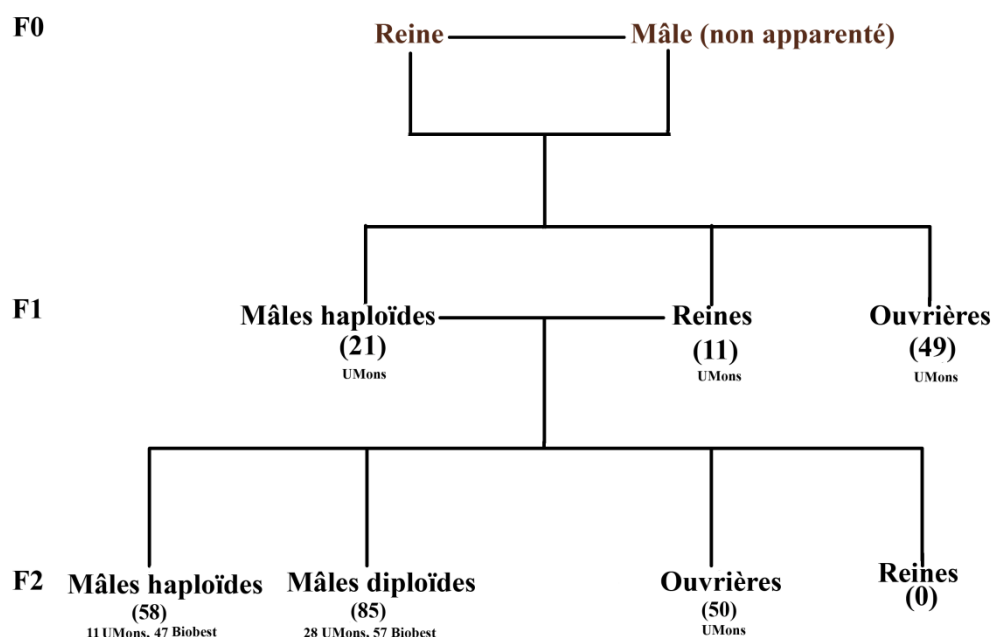


Figure 9: Arbre généalogique récapitulatif des spécimens de *Bombus terrestris* étudiés.

2.3. Détermination du degré de ploïdie chez les mâles de *Bombus terrestris*

Le degré de ploïdie des mâles de *B. terrestris* a été déterminé par cytométrie de flux au sein du laboratoire Evolution Biologique et Ecologie (Université libre de Bruxelles, BE) et du Museum Naturalis (Leiden, NL). La cytométrie de flux consiste à mesurer la quantité d'ADN contenue dans les noyaux. L'ADN nucléaire est coloré par un fluorochrome, généralement le DAPI (4',6'-diamidino-2-phénylindole) qui se lie de façon stoechiométrique à l'ADN. Les noyaux en suspension sont passés un par un dans un cytomètre de flux et percutés par un faisceau laser ou un faisceau lumineux provoquant ainsi l'excitation du fluorochrome. L'intensité de fluorescence émise est proportionnelle à la quantité d'ADN nucléaire. Un détecteur mesure l'intensité de luminescence émise par chaque noyau et la convertit en distributions de fréquences sous la forme d'un histogramme. La cytométrie de flux permet de mesurer la ploïdie d'un grand nombre d'individus, rapidement, précisément, et à un coût inférieur à celui d'autres techniques (génotypage par exemple).

La ploïdie de nos mâles de bourdons a été déterminée sur base du protocole décrit dans Cournault et Aron (2008). Brièvement, la tête d'un individu est broyée dans 50 µl d'une solution de DAPI. Le broyat est ensuite filtré et placé dans le cytomètre de flux PA-I (PARTEC©, Partec GmbH, Münster, Germany) pour analyse. Afin de calibrer l'appareil, nous avons tout d'abord analysé deux mâles que

nous savions haploïdes et deux femelles diploïdes. De façon arbitraire, les pics traduisant le passage de cellules haploïdes ont été fixés à une valeur relative de 100, les pics correspondant aux cellules diploïdes à une valeur de 200. Nos échantillons mâles ont ensuite été analysés les uns après les autres et leur ploïdie a été définie selon la valeur relative obtenue.

L'analyse de cytométrie en flux porte sur 145 mâles (41 issus de l'élevage à l'Université de Mons et 104 de la société Biobest) de la seconde génération (F2). L'axe x représente le signal détecté (intensité de la coloration par le DAPI). L'axe y représente les cellules comptées par millilitre de solution. Pour un individu haploïde, un pic se situe à 100 sur l'axe x puis de plus petits pics à 200 – 300. Ces derniers représentent les cellules en réplication. Pour un individu diploïde, un pic se situe à 200 en abscisse et de plus petits pics de 300 à 400 (cellules en réplication). Le reste du signal, marqué en noir, correspond au bruit de fond. On peut avoir un pic un peu plus prononcé aux alentours de 200 pour les mâles haploïdes. Il correspond aux cellules diploïdes musculaires.

Les deux premiers spectres (**Figures 10 et 11**) représentent les individus utilisés pour standardiser le cytomètre. Les deux spectres suivants représentent des exemples de spectre pour un mâle haploïde et un mâle diploïde (**Figures 12 et 13**).

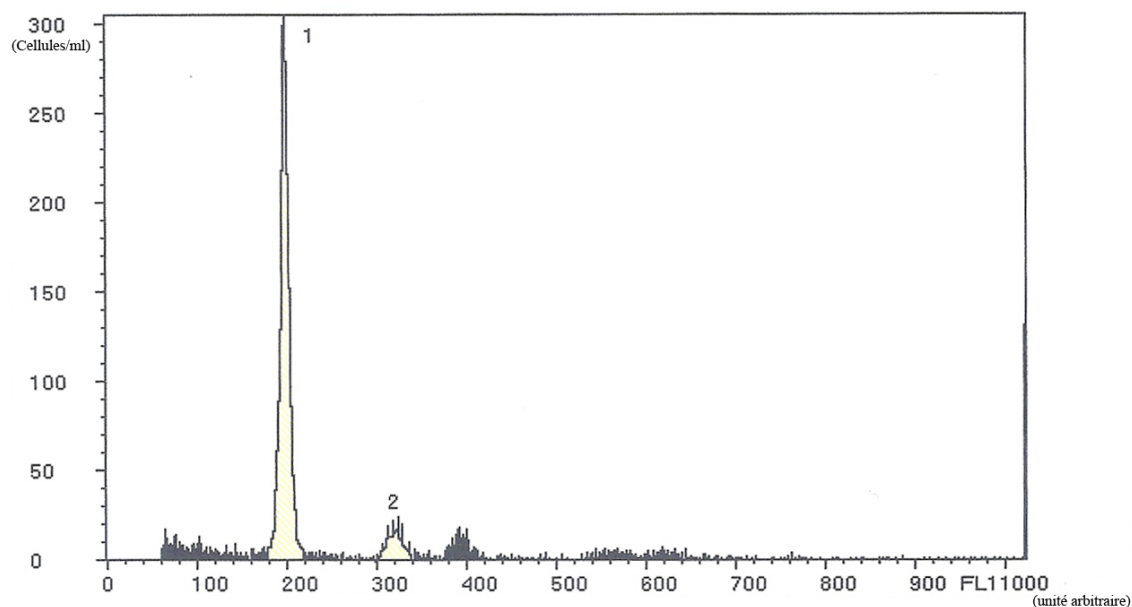


Figure 10 : Diagramme résultant de la cytométrie en flux pour une ouvrière en vue de la standardisation (code : BterWc01_MG002).

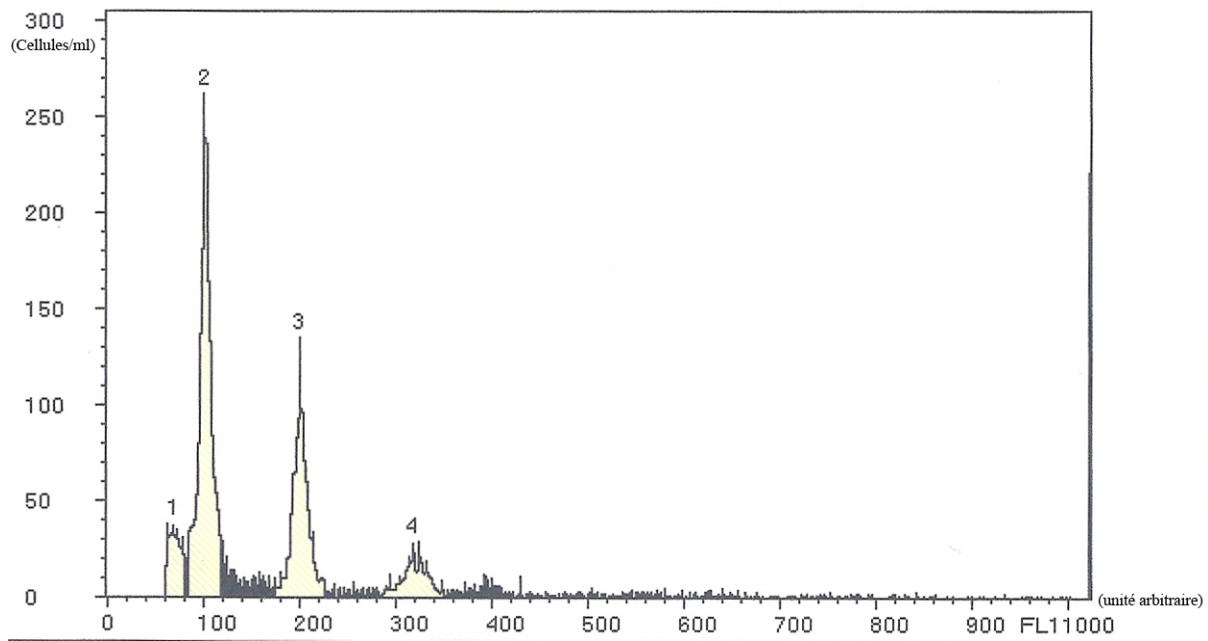


Figure 11 : Diagramme résultant de la cytométrie en flux pour un mâle haploïde en vue de la standardisation (code : BterMhc01_MG001).

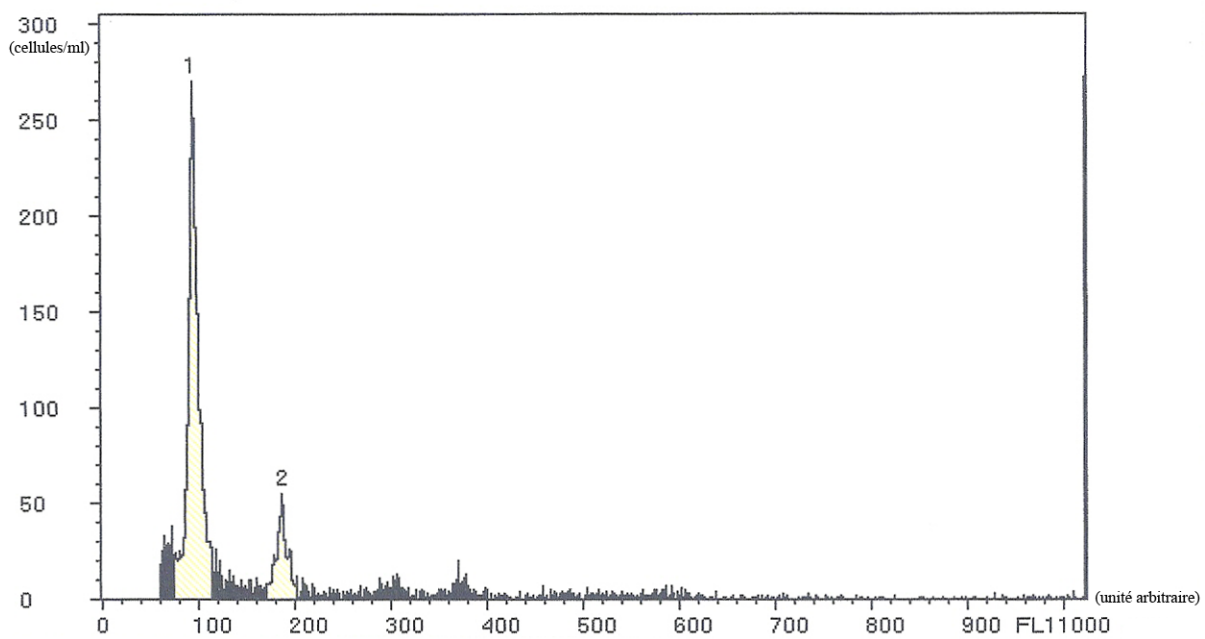


Figure 12 : Diagramme résultant de la cytométrie en flux pour un mâle haploïde (code : BterMhc13_MG120)

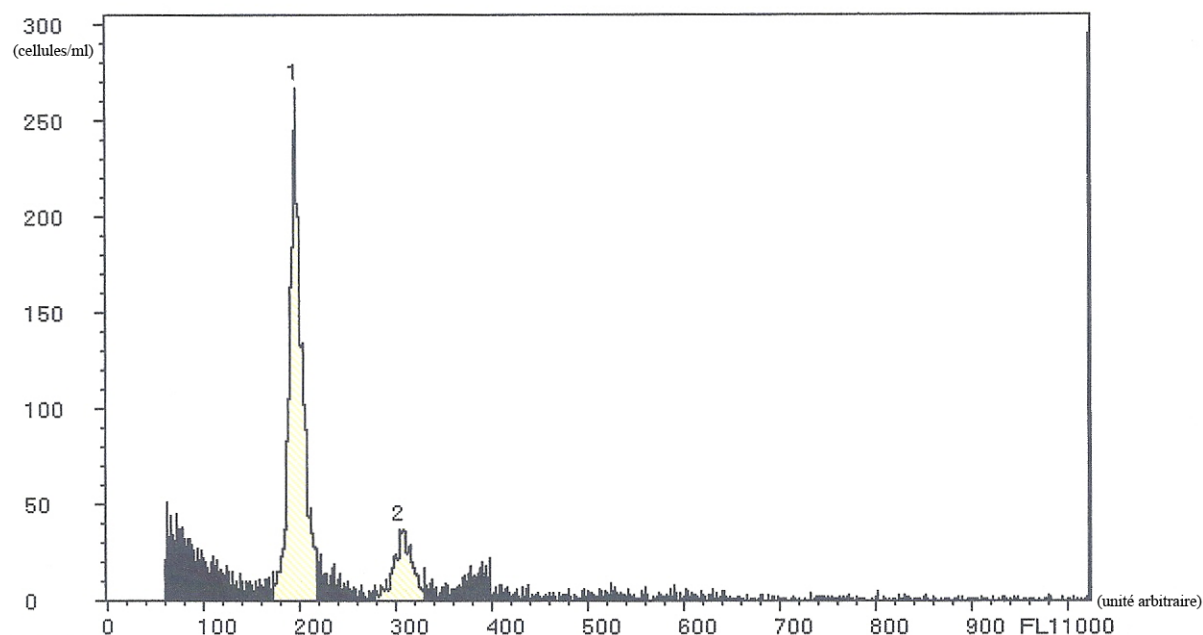


Figure 13 : Diagramme résultant de la cytométrie en flux pour un mâle diploïde (code : BterMdc18_MG139)

Parmi les 41 mâles de l'Université de Mons analysés, 28 étaient diploïdes, 12 étaient haploïdes et un seul n'a pu être déterminé à cause du bruit de fond trop important. Ceci correspond à une proportion de 68,3% de mâles diploïdes à la seconde génération. Une colonie n'a donné que des mâles haploïdes et une autre colonie n'a donné aucun mâle (**Annexes 1 et 2**). Dans les 8 autres colonies, des mâles haploïdes et diploïdes ont été détectés (**Annexes 1 et 2**).

Parmi les 104 mâles issu de l'élevage réalisé par la société Biobest, 57 mâles étaient diploïdes et 47 étaient haploïdes. Ceci correspond à une proportion de 54,81% de mâles diploïdes de seconde génération.

2.4. Analyse de morphométrie géométrique des ailes

La morphométrie est un outil utilisé dans de nombreuses disciplines. On distingue la **morphométrie traditionnelle** (Marcus 1990) de la **morphométrie géométrique** (Figure 14). La morphométrie traditionnelle est l'application de techniques statistiques multivariées à un jeu de données morphologiques composé de mesures linéaires, les angles et les ratios (Rohlf & Marcus 1993, Owen 2012). Cependant, les techniques de morphométrie traditionnelle ne préservent pas les relations géométriques entre les variables et perdent dès lors certains aspects de la forme (Adams et al. 2004).

Contrairement à la morphométrie traditionnelle, la morphométrie géométrique sépare de manière claire les composantes taille et forme d'un caractère morphologique. Son avènement a donc permis de nettes améliorations des techniques de morphométrie dans un but d'évaluer les changements qui affectent la forme d'un objet (Bookstein 1991, Zelditch et al. 2004, Adams et al. 2013). Elle permet l'étude quantitative de la forme, de la taille mais également de leur covariance, c'est à dire d'établir des relations entre différents paramètres (Bookstein 1991, Adams et al. 2013). C'est un outil utilisé dans de nombreuses études biologiques, anthropologiques ou encore paléontologiques (Rohlf et al. 1996, Wappler & Engel 2003, Mitteroecker et al. 2004, De Meulemeester et al. 2012).

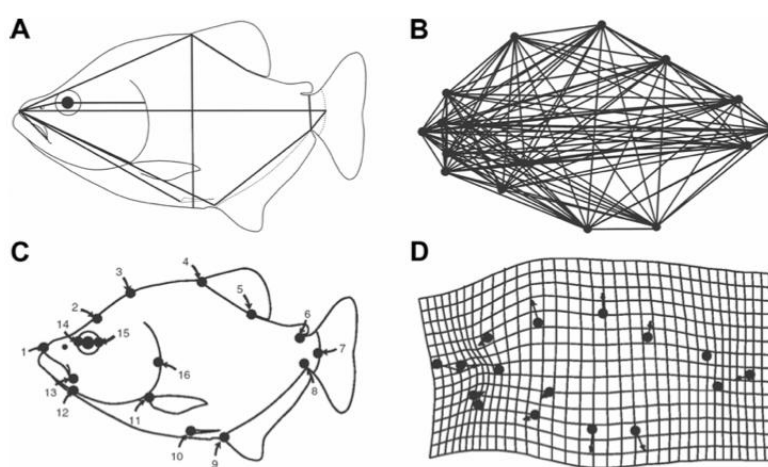


Figure 14 : Analyse de la forme d'un Téléostéen par morphométrie traditionnelle (A-B) et par morphométrie géométrique (C-D) (d'après Zelditch et al. 2004).

Encadré 2. Vocabulaire spécifique à la morphométrie et aux études de stabilité développementale

Distance Procruste : Somme des distances au carré entre chaque landmark homologue.

Espace de forme de Kendall : Espace non-euclidien dans lequel se trouvent les objets après Superimposition Procruste, où les distances entre les objets sont les distances Procruste.

Espace tangent : Espace euclidien tangent à l'espace de forme où sont projetées les conformations.

Génotype : Ensemble, ou partie donnée, de la composition génétique d'un individu.

Landmark : Point de repère homologue, utilisé pour définir la forme d'un objet en morphométrie géométrique.

Morphométrie géométrique : ensemble de méthodes qui a pour but l'analyse des formes de structures comme un tout. La forme n'est pas caractérisée par une combinaison de variables indépendantes, mais par des coordonnées cartésiennes de landmarks, par le contour de la forme (outlines), ou par des surfaces.

Phénotype : Ensemble des caractères observables d'un individu en conséquence du génotype et des pressions environnementales.

Superimposition Procruste : Analyse statistique où les objets subissent une translation, une rotation et une mise à l'échelle de sorte à séparer le facteur forme du facteur taille.

Taille centroïde : Racine carrée de la somme des distances au carré entre chaque landmark d'une configuration et le centroïde.

La morphométrie géométrique minimise le nombre de variables qui décrivent la forme de l'objet. En effet, une analyse basée les coordonnées cartésiennes de **landmarks** est plus parcimonieuse qu'une analyse réalisée à partir d'un ensemble de mesures linéaires. Lorsque le nombre de points utilisés pour caractériser un objet augmente, alors que leurs coordonnées cartésiennes augmentent de façon linéaire, le nombre de mesures de distances délimitant la forme augmente de manière exponentielle. Les landmarks doivent être choisis selon certains critères : ils doivent être homologues, être situés dans un même plan pour les structures 2D, être identifiés de manière répétable et fiable les landmarks doivent définir de manière adéquate la morphologie de la forme étudiée (Zelditch et al. 2004).

Il existe 3 types de landmarks : Les landmarks de types I sont représentés par des caractéristiques suffisamment petites pour n'être considérés que comme un seul point. D'un point de vue biologique, ce sont ceux dont le caractère d'homologie est le plus facile à mettre en évidence. Concernant les

ailes de bourdons, c'est le cas des intersections de nervures. Les landmarks de type II correspondent à des maxima de courbure. Les landmarks de type III sont des points extrêmes tel un centroïde ou les points encadrant un diamètre de cercle. De par leur précision et leur fiabilité, il est donc préférable de privilégier les landmarks de type I.

La méthode de **superimposition Procruste des moindres carrés généralisée** permet d'extraire de l'analyse les variables qui ne se rapportent pas à la forme (effets de translation, de rotation et d'échelle). En effet, Kendall (1977) définit la forme d'un objet comme l'information géométrique qui subsiste après la filtration des effets de rotation, de translation et de l'échelle. La forme est donc indépendante de ces 3 variables. Les différences entre les conformations de landmarks homologues de chaque structure vont être minimisées via la **distance Procruste (Figure 15)** (Bookstein 1991). Pour minimiser cette distance, la superimposition aligne donc les différentes conformations dans un même référentiel.

$$d_{xy} = \sqrt{\sum_{i,j}^{k,p} (X_{ij} - Y_{ij})^2}$$

Figure 15: Formule de la Distance Procruste (d'après Zelditch et al. 2004)

En pratique, la superimposition Procruste commence par calculer le centroïde de chaque conformation de landmarks. Le centroïde de cette conformation peut être vu comme la localisation du centre de gravité de la forme étudiée (Zelditch et al. 2004). Les conformations sont ensuite centrées sur leurs centroïdes. S'en suit la mise à échelle des différentes conformations. Elle est réalisée par le calcul de la « **taille centroïde** » correspondant à la racine carrée de la somme des distances entre chaque landmark et le centroïde. Après la mise à l'échelle, la taille centroïde de chaque configuration égale 1. L'alignement se poursuit par une rotation de celles-ci de manière à minimiser les distances Procruste entre les conformations, L'alignement des conformations est alors terminé (**Figure 16**).

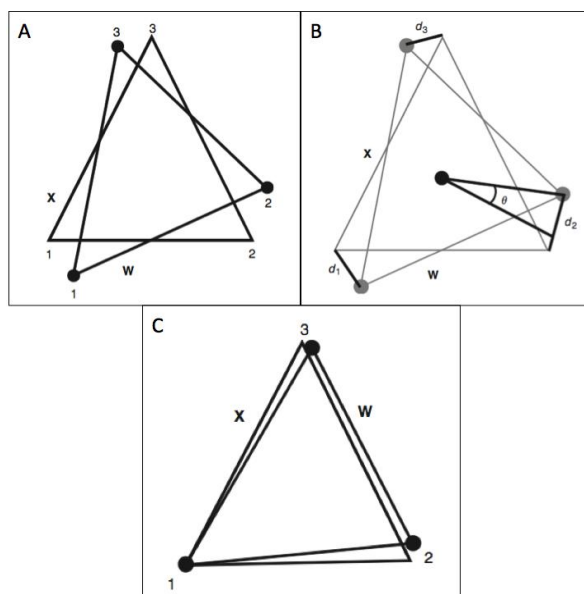


Figure 16: Principales étapes de la superimposition Procruste. A. Translation des conformations afin de les centrer sur leurs centroïdes et mise à l'échelle pour obtenir une taille centroïde égale à 1. B. Rotation des conformations afin de minimiser la distance Procruste entre conformations. C. Superimposition Procruste terminée (d'après Zelditch et al. 2004).

Les objets et les espaces dans lesquels se réalisent les étapes de l'analyse morphométrique ont différentes caractéristiques : les objets étudiés dans l'espace tridimensionnel défini par Goodall (1991) présentent $2k$ coordonnées à chaque landmark p . Une fois la somme du carré des distances entre les landmarks homologues des différents objets minimisée (par translation, rotation et mise à l'échelle), l'espace dans lequel se trouve l'objet sera l'**espace de forme** (« shape-space ») de **Kendall** (Kendall 1984, Kendall 1986). C'est un espace courbe, c'est-à-dire que la distance entre deux configurations de landmarks ne correspond pas à la distance euclidienne dans un plan cartésien.

Cette espace de forme comporte N dimensions qui correspondent au nombre de variables utilisées pour décrire les conformations moins le nombre de dimensions de l'objet (position, rotation et taille des conformations). Dans le cas d'une structure à deux dimensions, l'espace de forme possède $2k-4$ dimensions, où « k » est le nombre de landmarks et « 4 » représente les dimensions perdues (une dimension de la position de x , une dimension de la position de y , une dimension de rotation et une dimension de taille) (Kendall 1984).

Un problème se pose avec l'espace de forme : les outils statistiques standards s'effectuent dans un espace euclidien. Ce problème est contourné grâce à la projection des conformations dans l'espace euclidien tangent à l'espace de forme. On peut visualiser la relation entre l'espace de forme et l'**espace tangent** de la même manière que la relation entre le globe terrestre et un planisphère

(**Figure 17**). Plus on s'éloigne du point tangent, plus la déformation augmente, mais cette variation reste faible pour les conformations biologiques et les conformations mesurées proches du point tangent (Marcus et al. 2000).

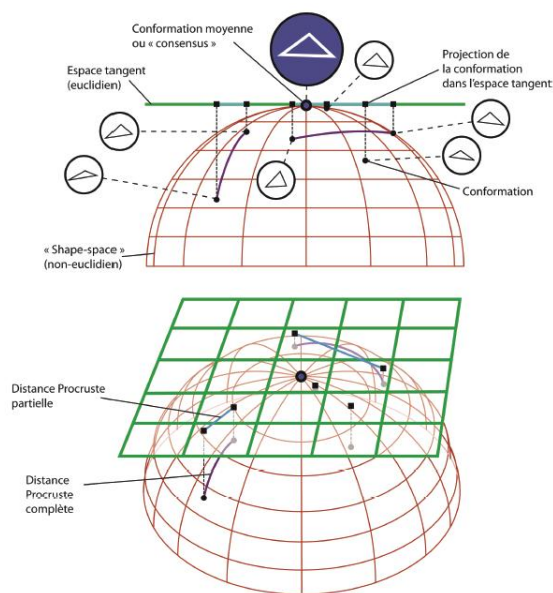


Figure 17: Espace de forme et espace tangent (Perrard 2012)

Une fois ces bases théoriques fixées, les différents outils développés peuvent être utilisés dans le domaine de la biologie. L'analyse de certains caractères par des analyses morphométriques peut par exemple révéler des variations de la forme de l'aile entre certaines populations d'insectes selon des variables environnementales comme la température et la saison (Mattu & Verna 1984, Ito 1987, Gilbert et al. 2004, Loh et al. 2008).

2.4.2. Mode opératoire pour les analyses morphométriques

Dans le cadre de ce mémoire, l'étude de forme sera réalisée sur l'aile antérieure de bourdons. Les ailes antérieures de bourdons sont formées de cellules alaires, délimitées par des veines qui y permettent le passage de l'hémolymph, des nerfs et des trachées (**Figure 18**) (Chapman 1998). Les ailes sont un trait souvent utilisé pour les analyses quantitatives (Francoy et al. 2006, 2008, 2012, Aytekin et al. 2007, Tolfski et al. 2008, Kozmus et al. 2011). Elles présentent l'avantage d'être des structures 2D rigides, sont facilement numérisables et mesurables. De plus, elles présentent un nombre suffisant de landmarks aux intersections des veines en vue de l'analyse des variations de forme. La morphométrie géométrique des ailes a été utilisée pour discriminer des taxa à différents

niveaux comme l'espèce ou la sous-espèce (Francoy et al. 2006, 2008, 2012, Aytakin et al. 2007, Tolfski et al. 2008, Kozmus et al. 2011) voir même pour discriminer les sexes (Francoy et al. 2009). Enfin, la morphométrie est également utile en paléontologie où elle permet la classification de fossiles d'abeilles (Wappler et al. 2012).

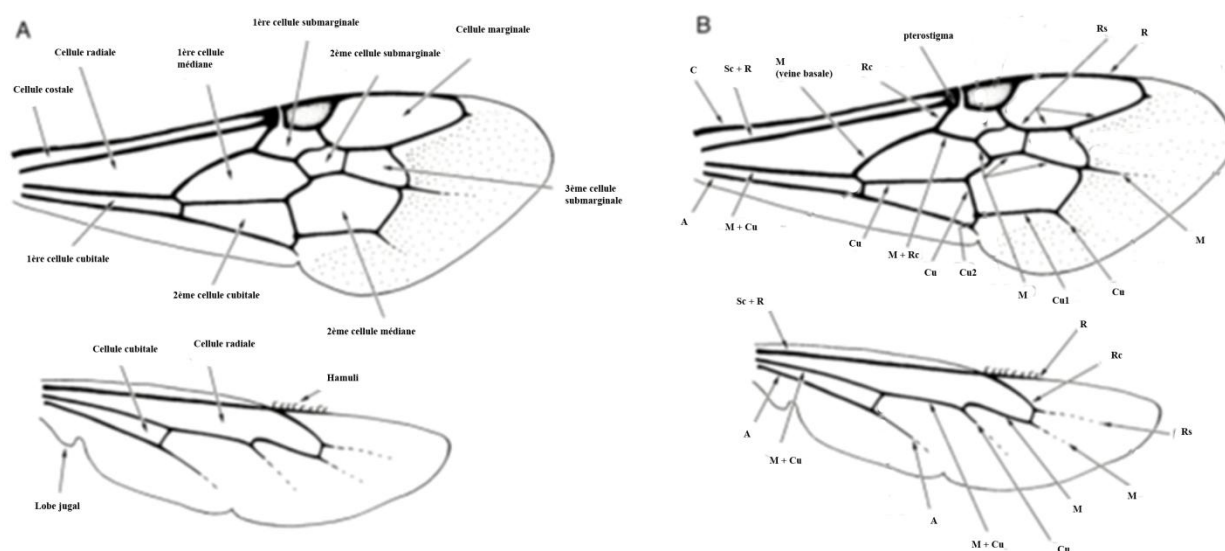


Figure 18 : A. Schéma d'une aile antérieure droite et d'une aile postérieure droite d'abeille et la légende des différentes cellules alaires (d'après Engel 2001). B. Schéma d'une aile antérieure droite et d'une aile postérieure droite d'abeille, avec la légende des différentes nervures alaires (d'après Engel 2001).

Les ailes antérieures gauches et droites des spécimens étudiés sont coupées au niveau des tegulae puis photographiées (**Figure 19**). Les ailes sont placées entre deux lames de microscopie. La lame inférieure comprend du papier millimétré pour obtenir une échelle. Pour aplatir l'aile de manière optimale, des pinces sont placées en haut et en bas des lames. De ce fait, on s'approche au mieux de la dimension en 2D souhaitée. Les ailes sont conservées dans une pochette plastique épinglée avec l'individu correspondant. Les photos de *B. terrestris* des colonies de l'université de Mons ont été réalisées par M. Gérard. Collin Molenaar a réalisé les photos de *B. terrestris* élevés par la société Biobest N.V..

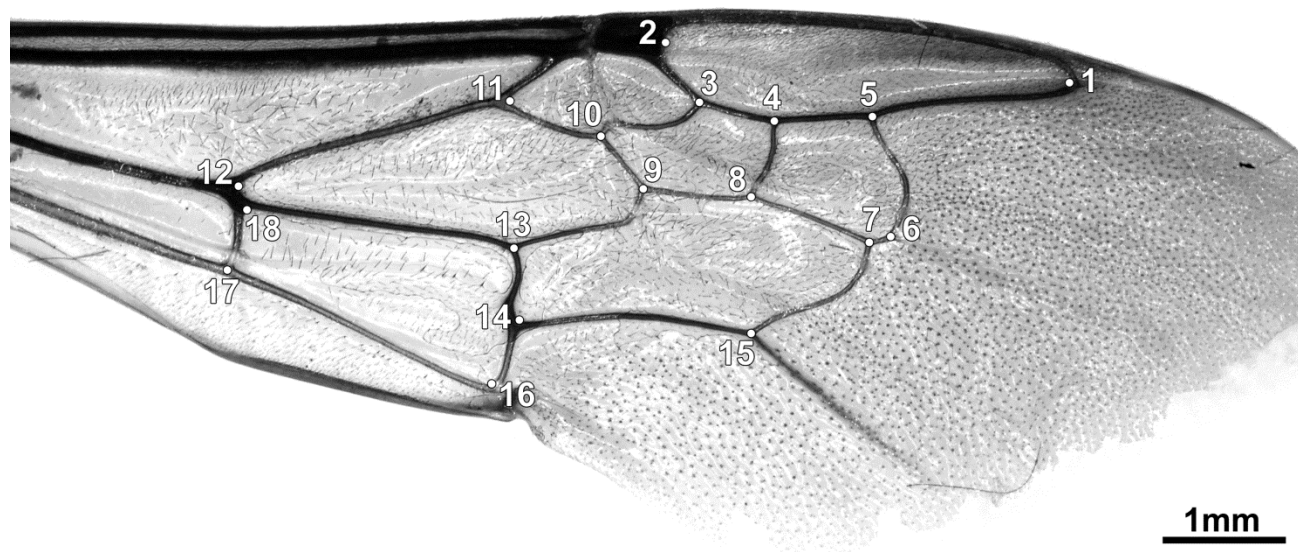


Figure 19: Aile antérieure droite de *Bombus terrestris* et position relative des 18 landmarks utilisés (Photographie: T. De Meulemeester).

18 landmarks sont utilisés pour réaliser les analyses morphométriques (**Figure 19**). La définition des landmarks est donnée dans le tableau (**Tableau 3**)

Tableau 3. Définition des 18 landmarks utilisés pour l'analyse de morphométrie géométrique des ailes de *Bombus terrestris*

Landmark	Définition d'après Engel (2001)	Type
1	Point interne positionné le plus à gauche de la cellule marginale	II
2	Point interne positionné le plus à droite de la cellule marginale	II
3	Point positionné à l'intersection de la nervure Rs avec la 2 ^{ème} abscisse de la nervure RS	I
4	Point positionné à l'intersection de la nervure RS avec la nervure 1rs-m	I
5	Point positionné à l'intersection de la nervure Rs avec la nervure 2rs-m	I
6	Point positionné à l'intersection de la nervure M avec la nervure 2rs-m	I
7	Point positionné à l'intersection de la nervure M avec la nervure 2m-cu	I
8	Point positionné à l'intersection de la nervure 1rs-m avec la nervure M	I
9	Point positionné à l'intersection de la nervure 1m-cu avec la nervure M	I
10	Point positionné à l'intersection de la 2 ^{ème} abscisse de la nervure Rs avec la nervure M+Rs	I

11	Point interne positionné le plus en bas à droite de la 1 ^{ère} cellule submarginale	II
12	Point interne positionné le plus en bas à droite de la 1 ^{ère} cellule médiale	II
13	Point positionné à l'intersection de la nervure Cu avec la nervure 1m-cu	I
14	Point interne positionné le plus en bas à droite de la 2 ^{ème} cellule médiale	II
15	Point positionné à l'intersection de la nervure Cu avec la nervure Cu1	I
16	Point interne positionné le plus en bas à gauche de la 2 ^{ème} cellule cubitale	II
17	Point positionné à l'intersection de la nervure A avec la nervure cu-a	I
18	Point interne positionné le plus en haut à droite de la 2 ^{ème} cellule cubitale	II

Les photos réalisées pour les analyses morphométriques sont compilées dans des fichiers TPS par le logiciel tps-UTILS 1.56 (Rohlf 2013a). Le logiciel tps-DIG 2.17 (Rohlf 2013b) est ensuite utilisé pour numériser les coordonnées cartésiennes des landmarks digitalisés. La superimposition Procruste qui élimine toutes variations qui ne se rapportent pas à la forme de l'aile est réalisée via le logiciel R version 3.0.2 (2013). Le logiciel tps-SMALL 1.25 (Rohlf 2013c) est utilisé afin de vérifier la corrélation entre l'espace de forme de Kendall et l'espace tangent.

2.4.3. Discrimintion des males diploïdes sur base de la forme des ailes

L'analyse chez *Bombus terrestris* est réalisée sur un jeu de données de 544 ailes antérieures droites et gauches représentant 272 spécimens. Parmi ces 272 spécimens, on compte 9 reines (18 ailes), 85 mâles diploïdes (170 ailes), 79 mâles haploïdes (158 ailes) et 99 ouvrières (198 ailes) provenant de la colonie de première génération, des 10 colonies de seconde génération du laboratoire de zoologie de l'Université de Mons et des colonies de la société Biobest.

La **Relative Warps Analysis** s'apparente techniquement à une ACP appliquée aux données cartésiennes de landmarks. Elle peut être appliquée à un jeu de données multivariées dans le but d'identifier les « composantes principales » (PCs) qui expriment la plus grande variabilité du jeu de données. La « **Between group PCA** » est utilisée pour mettre en évidence la plus grande variation entre les groupes. Au contraire de l'ACP, l'analyse est donc supervisée où les groupes que l'on recherche sont déterminés sur base d'un « à priori ». Dans cas, l'à-priori pour les groupes « mâles haploïdes » et « mâles diploïdes » a été un à-priori génétique (le degré de ploïdie a été mis en

évidence par cytométrie en flux). L'espace dans lequel sont projetées les configurations de landmarks est un espace euclidien où les distances entre spécimens sont conservées. Tout comme dans l'ACP, c'est la manière de voir le jeu de données qui varie.

L'Analyse Discriminante Linéaire (**LDA**) est une analyse statistique d'ordination supervisée. C'est une méthode qui permet de mettre en évidence une série de combinaisons de caractères qui divisent un jeu de données en plusieurs groupes. Comme précédemment, chaque point représente la conformation de landmarks d'un individu. Les axes de l'analyse sont générés à partir des combinaisons des variables originales, c'est à dire les variables linéaires discriminantes. La discrimination des groupes dans la LDA est quantifiée par un tableau d'assignement dans une procédure de validation croisée « *leave-one-out* ». Dans cette méthode, chaque conformation est tour à tour retirée du jeu de données. Les axes de la LDA sont recalculés sans la conformation retirée du jeu de données. Ensuite, cette conformation est projetée dans l'espace discriminant comme une conformation inconnue et les probabilités postérieures (PP) d'assignement à chacun des groupes sont calculées. La conformation est assignée au groupe où sa probabilité d'y appartenir est la plus grande (Huberty & Olejnik 2006). Dans cette étude, la bgPCA et la LDA sont réalisés via le logiciel R (2013).

L'assignement en validation croisée *leave-one-out* est calculé par deux approches: en considérant l'attribution de chaque aile séparément et en considérant l'attribution du spécimen sur base des probabilités postérieures des deux ailes. En effet, l'objectif final est l'identification du spécimen et non d'une aile séparément. Un spécimen est attribué à un groupe si la probabilité postérieure d'assignement au même groupe est supérieure à 90% pour les deux ailes. Si une aile montre une probabilité d'attribution à un groupe robuste mais que l'autre aile montre une d'attribution incertaine (inférieure à 90%), le spécimen est attribué au groupe supporté. Dans le cas d'assignements robustes à des groupes différents ou des probabilités d'assignements incertaines pour les deux ailes, le spécimen n'est attribué à aucun groupe.

Un test de comparaisons multiples des moyennes (Pairwise ANOVA) permettra de comparer les tailles centroïdes des différents groupes. Ce test applique une correction de Bonferroni pour éviter les erreurs de type I.

2.4.4. Mode opératoire pour l'analyse de l'asymétrie fluctuante

La digitalisation des ailes est réalisée deux fois afin d'évaluer la marge d'erreur sur la mesure (Palmer & Strobeck 1986, Klingenberg et al. 2002). Les analyses d'asymétrie fluctuante permettent de comparer d'une part (i) les deux générations d'ouvrières et d'autre part (ii) les mâles selon leur degré de ploïdie.

Le mode opératoire de la mesure de l'asymétrie fluctuante est le suivant :

- **Test de la corrélation entre l'asymétrie fluctuante et la taille du caractère étudié :** l'asymétrie fluctuante peut être corrélée à la taille d'un caractère. L'analyse de l'AF due à la taille et celle due à la forme de l'aile doit donc être séparée pour éviter de biaiser l'interprétation des résultats.
- **Choix de l'indice de mesure de l'asymétrie fluctuante** en fonction du test de corrélation précédent. Par défaut, c'est l'indice de mesure FA10 qui est utilisé.
- **Mesure de l'erreur :** cette étape permet de vérifier si la différence mesurée entre les 2 ailes est significativement différente des erreurs de mesures de digitalisation. La part d'asymétrie fluctuante entre les deux côtés est souvent réduite (la plupart du temps de l'ordre de 1% de la taille du caractère), des erreurs de mesures trop grandes peuvent donc biaiser l'analyse. Pour mesurer cette erreur, chaque aile est digitalisée 2 fois, à un intervalle de temps de plus d'une semaine et par le même expérimentateur. Dans le but de savoir si la part d'erreur est significative, une ANOVA à deux facteurs est réalisée (cotés x individus).
- **Test de la présence d'asymétrie directionnelle :** Ce type d'asymétrie pourrait augmenter artificiellement le niveau d'asymétrie mesuré. L'absence d'asymétrie directionnelle est vérifiée à l'aide d'un t test. Il compare la moyenne de la différence des valeurs entre le côté droit et gauche à zéro.
- **Mesure de l'asymétrie fluctuante *sensu stricto* :** elle est mesurée comme la déviation par rapport à une symétrie bilatérale parfaite ($D - G$). Au plus la variance de la part d'asymétrie fluctuante est grande, au moins le contrôle du développement phénotypique est efficace.

L'analyse de la variance (*ANalysis Of VAriance*) est un test statistique qui compare les moyennes de différentes catégories d'un facteur. L'hypothèse nulle de ce test est qu'il n'y a pas de différences significatives entre les moyennes d'une variable numérique, selon les différentes catégories. C'est un

test qui demande plusieurs conditions d'application : (I) la variable numérique doit suivre une distribution normale, (II) l'échantillonnage doit être aléatoire, (III) les observations doivent être indépendantes et (IV) les variances doivent être homogènes (homoscédasticité). La normalité du jeu de données est testée par un **test de Shapiro** (H_0 = distribution normale) et l'homoscédasticité est testée par le **test de Bartlett** (H_0 = variances homogènes). On parle de « *two-way ANOVA* » lorsque l'analyse de la variance est à deux facteurs. L'analyse de la variance retourne une *p-value*, elle permet de détecter une différence significative entre les moyennes des différentes catégories.

La variante de l'ANOVA utilisée est la **Procruste ANOVA**. C'est la technique la plus répandue pour la mesure de l'asymétrie fluctuante. On évaluera la part relative de variation au sein des individus, la part d'asymétrie (fluctuante et directionnelle) ainsi que l'erreur due à la mesure. Dans cette étude, la Procruste ANOVA est réalisée via le logiciel R (The R Foundation for Statistical Computing 2012).

Des **tests de permutations** seront réalisés pour mettre en évidence une différence significative d'asymétrie entre deux groupes via une p-value retournée par ces tests.

Des **F-test** (Test de Fisher) permettront tester l'égalité des variances des différents groupes pour mettre en évidence une différence significative d'asymétrie directionnelle entre chacun d'entre eux.

3. Résultats

3.1. Caractère diagnostique de la forme de l'aile chez les mâles de *Bombus terrestris*

Les premiers résultats de la discrimination des mâles de *Bombus terrestris* selon le degré de ploïdie a fait l'objet d'une publication scientifique soumis dans une revue internationale avec comité de lecture, Apidologie. L'article en question est disponible dans l'**Annexe 3**.

Le coefficient de régression entre les distances Procrustes et les distances Euclidiennes obtenu grâce au logiciel tps SMALL est proche de 1 (0,9999). Cela signifie que la variation d'amplitude de notre jeu de données est faible et que l'approximation pour passer de l'espace de forme de Kendall à l'espace linéaire tangent est correcte.

Nous avons utilisé la taille centroïde comme la mesure de la taille globale de l'aile (**Figure 20**).

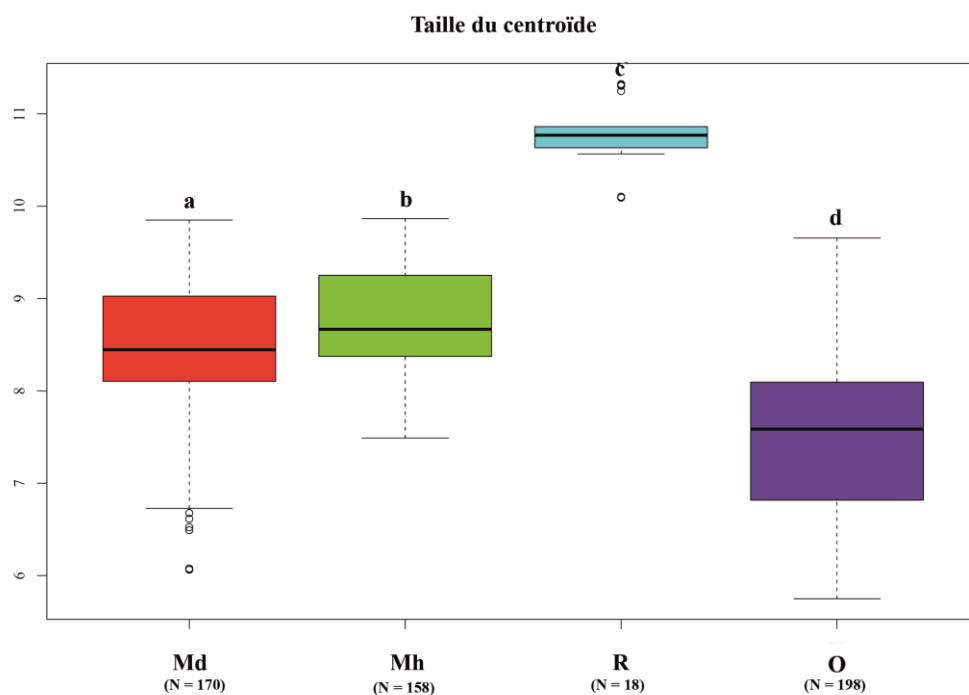


Figure 20 : Taille du centroïde des ailes des différents groupes chez *Bombus terrestris*

L'ANOVA de la taille centroïde montre une différence significative ($p\text{-value} = 1.25 \times 10^{-80}$). Grâce à une pairwise ANOVA, nous avons pu mettre en évidence que les quatre groupes avaient une taille de

centroïde significativement différente (**Figure 20, Tableau 4**). Cette ANOVA a été réalisée avec une correction de Bonferroni de facteur 6 qui permet de minimiser le risque d'erreur de type I.

Tableau 4 : Pairwise ANOVA de la taille de centroïde entre les 4 castes de *Bombus terrestris*. Diagonale supérieure : distances, diagonale inférieure : p-values.

	Mh	Md	O	R
Mh	-	0.377	1.25	2
Md	1.65E-06	-	0.878	2.38
O	2.45E-46	6.57E-23	-	3.25
R	3.68E-34	3.04E-28	1.77E-40	-

Les 4 groupes définis dans l'analyse sont séparés dans la *between-group PCA* (**Figure 21**), bien qu'un recouvrement clair entre les ouvrières, les mâles haploïdes et les mâles diploïdes existe. Dans cette analyse, toutes les reines sont regroupées et bien séparées des autres groupes.

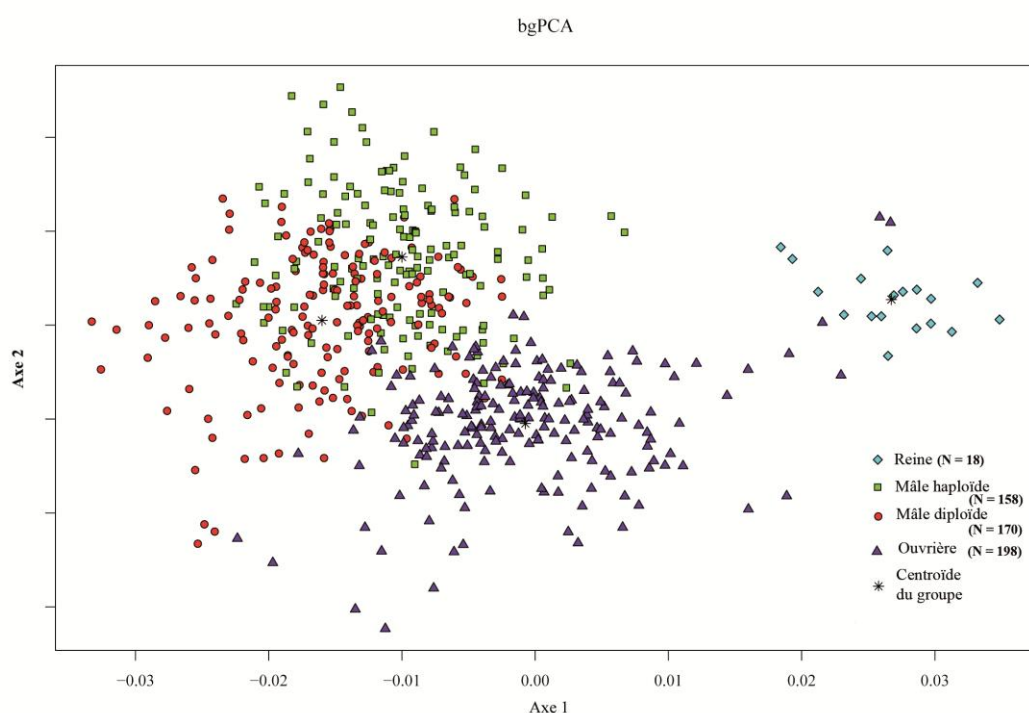


Figure 21 : Graphique de la *Between-group PCA* des différents groupes chez *Bombus terrestris*

La LDA nous permet de visualiser de manière plus marquée les séparations entre les groupes (**Figure 22, Tableau 5**). Les 4 mêmes groupes y sont bien séparés.

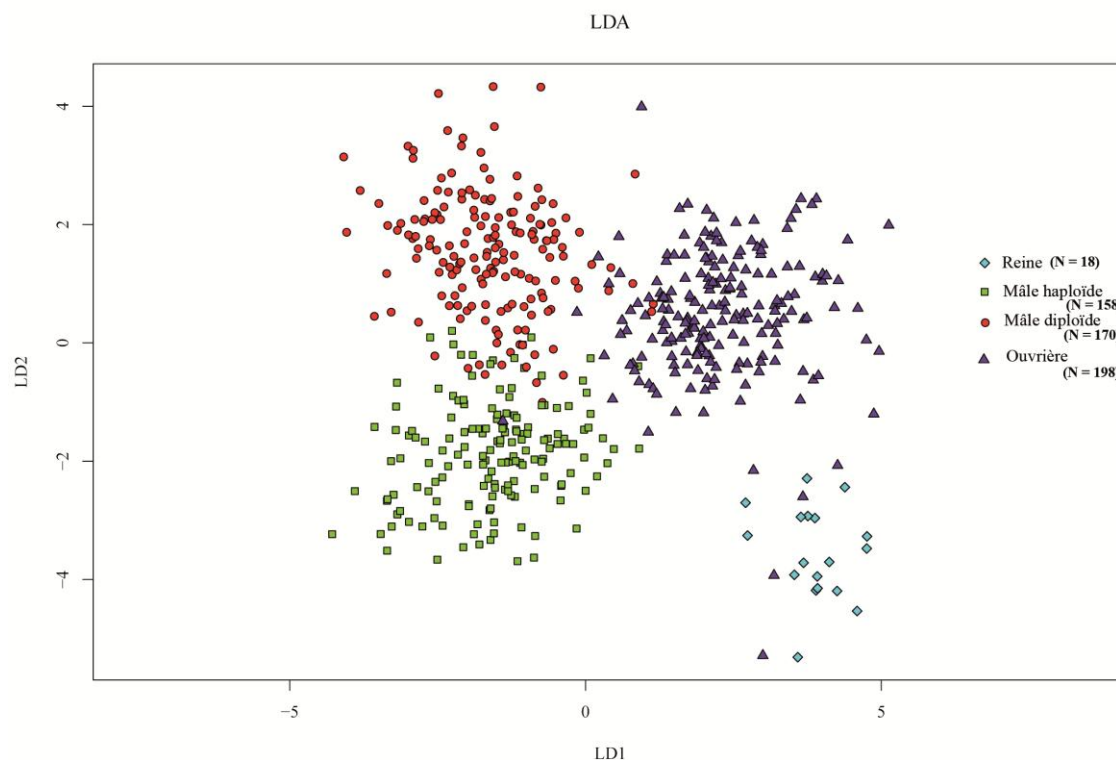


Figure 22 : graphique de la LDA des différents groupes de *Bombus terrestris*.

Tableau 5. Tableau d'attribution des ailes en validation croisée « *leave one out* » Les groupes originaux sont représentés en lignes et les groupes prédits le sont en colonnes. Le « *Hit Ratio* » (HR%) est donné pour chaque caste. Md = Mâle diploïde, Mh = Mâle haploïde, O = ouvrière, R = Reine.

	Md	Mh	R	O	HR(%)
Md	153	11	0	6	90
Mh	11	144	0	3	91,14
R	0	0	18	0	100
O	3	3	6	186	93,94

Au regard de l'assignement par *cross-validation*, 92,1% des ailes ont été correctement assignées à leur groupe. Alors que les reines sont très clairement discriminées, les 3 autres castes le sont avec un léger recouvrement entre les groupes. Les 18 ailes de reines montrent un *hit-ratio* de 100%. Douze des 198 ailes d'ouvrières ont été mal classifiées, toutes assignées aux groupes des mâles diploïdes ou

haploïdes (*hit-ratio* de 93,94%). Parmi les 158 ailes de mâles haploïdes, 11 ont été attribuées au groupe des mâles diploïdes et 3 au groupe des ouvrières (*hit-ratio* de 91,14%). Parmi les 170 ailes de mâles diploïdes, 11 ont été attribuées au groupe des mâles haploïdes et 6 au groupe des ouvrières (*hit-ratio* de 90%). 51% des mauvaises attributions sont des attributions de mâles diploïdes aux mâles haploïdes et inversement.

Si on ne considère que les assignements robustes (c'est-à-dire avec une probabilité postérieure avec plus de 0.90 ; c'est le cas pour 81,1% des ailes), nous voyons que 99,55% des ailes sont classifiées correctement (**Tableau 6**). En connaissant à priori le sexe auquel appartient l'aile, c'est-à-dire si l'on a restreint le jeu de données aux mâles, le *hit-ratio* d'assignement au degré correct de ploïdie est de 100% (132/132) pour les ailes de mâles diploïdes et de 98,43% (125/127) pour les ailes de mâles haploïdes.

Tableau 6. Identification des ailes basée sur la méthode de Cross-Validation « *leave-one-out* » durant la LDA. Seul les assignements robustes sont utilisés (n=243). Les groupes originaux sont en ligne et les groupes prédits sont en colonne. Md = Mâle diploïde, Mh = Mâle haploïde, O = Ouvrière, R = Reines.

	Md	Mh	R	O	HR(%)
Md	132	0	0	0	100
Mh	1	125	0	1	98,43
R	0	0	17	0	100
O	0	1	0	165	98,86

Au niveau des spécimens, une identification robuste existe pour 147 des 164 mâles (**Tableau 7**). Seul deux n'ont pas été attribués au degré correct de ploïdie. Toutes les reines ont été attribuées au groupe correct et 95 des 99 ouvrières ont une identification correcte et robuste. 92,28% des individus sont attribués au bon degré de ploïdie.

Tableau 7. Tableau d'attribution des spécimens en validation croisée « leave one out » dans la LDA (n=138). Les groupes originaux sont en ligne, le degré de ploïdie prédit est en colonne. Les mâles ont été identifiés comme diploïde lorsque les ailes ont été assignées à un groupe diploïde, que ce soit des mâles ou des ouvrières. Mh = Mâle haploïde, Md = Mâle diploïde, O = Ouvrière, R = Reine.

	Haploïde	Diploïde	NA	HR (%)
Mh	0	77	8	100
Md	70	2	7	97,22
O	1	95	3	98,96
R	0	9	0	100

3.2. Détermination de l'asymétrie des ailes chez *Bombus terrestris*

3.2.1. Asymétrie des ailes des différents groupes

Le tableau de la Procruste ANOVA (**Tableau 8, Figure 25**) met en évidence la présence significative d'asymétrie fluctuante de forme dans les 4 groupes, ainsi que la présence d'asymétrie directionnelle.

Tableau 8 : Procruste ANOVA pour les mâles diploïdes, haploïdes, les reines et les ouvrières de *Bombus terrestris*. Md = Mâle diploïde (170), Mh = Mâle haploïde (158), O = ouvrières (18), R = Reine (198).

	Msind	Msside	Msinter	Msres	dfind	dfside	dfinter	Find	Fside	Finter	Pind	Pside	Pinter
Md	4.45E-005	2.94E-005	6.80E-006	4.92E-007	2400	32	2400	6.551416	4.319241	13.806732	0	1.20E-014	0
Mh	5.32E-005	3.05E-005	4.66E-006	4.34E-007	2432	32	2432	11.407799	6.544084	10.748419	0	0	0
R	1.55E-005	6.49E-006	3.46E-006	8.92E-007	288	32	288	4.465355	1.875458	3.881174	0	0.0039334123	0
O	3.89E-005	7.48E-006	5.21E-006	7.66E-007	3072	32	3072	7.467722	1.434753	6.054187	0	0.0541875831	0

La figure suivante permet une représentation graphique de la différence d'asymétrie directionnelle entre les 4 groupes de la colonie (**Figure 23**), déjà mise en évidence dans le premier tableau de la Procruste ANOVA (**Tableau 8**).

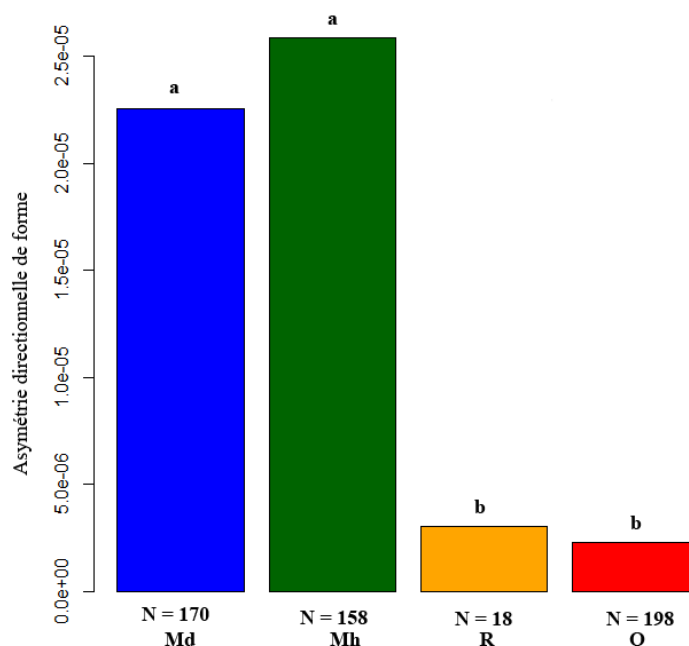


Figure 23 : Graphique de la part d'asymétrie directionnelle de forme des 4 groupes de la colonie de *Bombus terrestris* (Mâles diploïdes, mâles haploïdes, reines, ouvrières).

Le tableau des F-tests de comparaison de valeurs 2 par 2 (**Tableau 9**) met en évidence que la différence d'asymétrie directionnelle de forme est significative entre les mâles diploïdes et les reines, les mâles diploïdes et les ouvrières, les mâles haploïdes et les reines ainsi qu'entre les mâles haploïdes et les ouvrières.

Tableau 9 : F-tests de comparaison 2 x 2 des 4 groupes de *Bombus terrestris*

	Md	Mh	R	O
Md	NA	0.385752343	0.006533025	0.04382307
Mh	0.385752343	NA	0.004171214	0.03623398
R	0.006533025	0.004171214	NA	0.44475356
O	0.043823069	0.036233982	0.444753563	NA

Les tests sur l'asymétrie directionnelle de taille n'ont montré aucun résultat significatif (**Figure 24**).

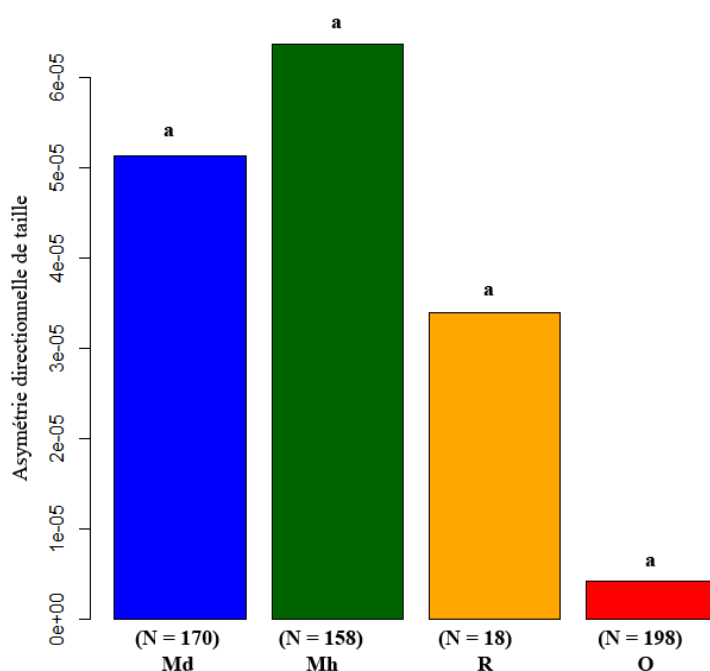


Figure 24 : Graphique de la part d'asymétrie directionnelle de taille des 4 groupes de la colonie de *Bombus terrestris* (Mâles diploïdes, mâles haploïdes, reines, ouvrières).

Des tests de permutations ont été effectués pour mettre en évidence la différence d'asymétrie fluctuante de forme entre les différents groupes de la colonie (**Tableau 10**).

Tableau 10 : Test de permutation entre les différents groupes de *Bombus terrestris*.

Permutations	p-value
Md-Mh	$0.99 \cdot 10^{-4}$
Md-R	$0.99 \cdot 10^{-3}$
Md-O	$0.99 \cdot 10^{-4}$
Mh-R	0.77 ns
Mh-O	0.71 ns
R-O	0.72 ns

Ce tableau met en évidence que les mâles diploïdes ont une asymétrie fluctuante significativement différente des 3 autres groupes, tandis que les 3 autres groupes ne sont pas significativement différents entre eux. La figure suivante permet une représentation graphique (**Figure 25**). On y voit

que les mâles diploïdes sont significativement plus asymétriques que les 4 autres groupes.

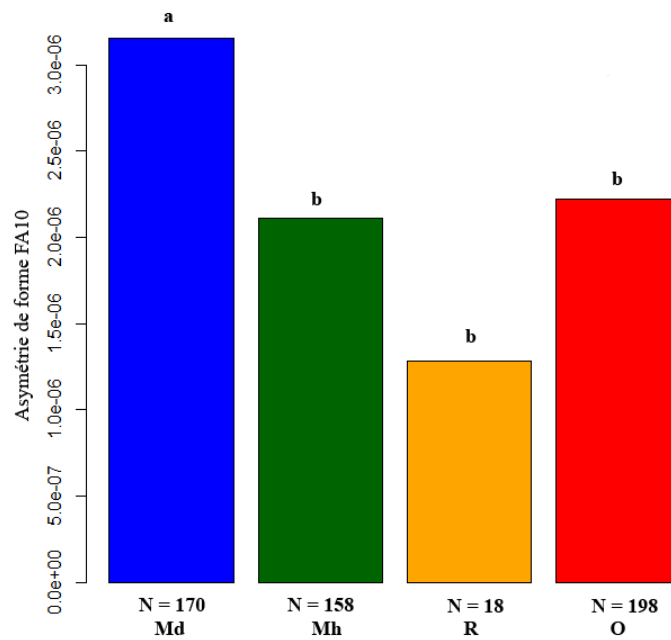


Figure 25 : Graphique de la part d'asymétrie fluctuante de forme des 4 groupes de la colonie (Mâles diploïdes, mâles haploïdes, reines, ouvrières).

3.2.2. Asymétrie des deux générations d'ouvrières

Comme le montre la Procruste ANOVA (**Tableau 11**), il existe une différence significative d'asymétrie de taille entre la première et la seconde génération (consanguine) d'ouvrières de *B. terrestris*. La seconde génération est significativement plus asymétrique au niveau de la taille des ailes (**Figure 26**).

Tableau 11 : Procruste ANOVA pour l'asymétrie fluctuante de taille des deux générations d'ouvrières de *Bombus terrestris*.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Ind	47	0.82691	0.0175939	1.5226548	<2.2e-16***
Side	1	0.00013	0.0001301	112.602	<2.2e-16***
Ind:side	47	0.00255	0.0000542	46.881	<2.2e-16***
Residuals	96	0.00011	0.0000012		

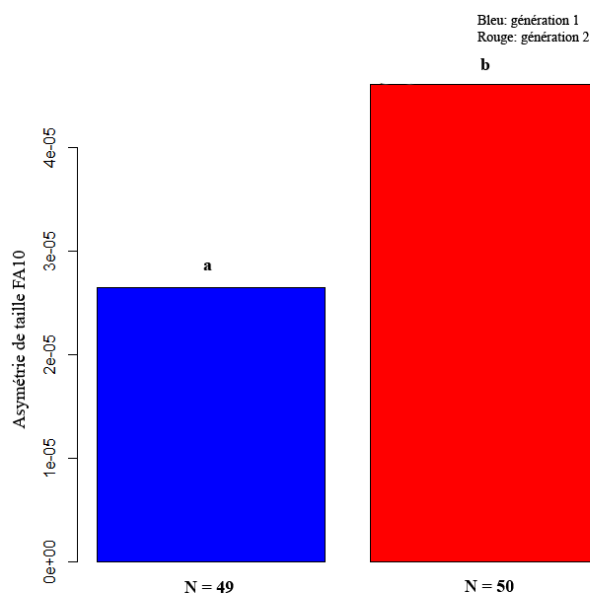


Figure 26: Graphique de la part d'asymétrie fluctuante de taille des deux générations d'ouvrières de *Bombus terrestris*.

Il n'y a pas d'asymétrie directionnelle de taille significative chez les deux générations d'ouvrière et donc pas de différences significatives pour les tests de comparaisons (p-value = 0.6845932).

Enfin, bien qu'il y ait une asymétrie fluctuante de forme significative chez les ouvrières de *Bombus terrestris* (**Tableau 12**), il n'y a pas de différence significative entre les deux générations d'ouvrières comme le montre le test de comparaison (**Fig. 27**).

Tableau 12 : Procruste ANOVA pour les mâles de générations d'ouvrières de *Bombus terrestris*.

	Msind	Msside	Msinter	Msres	dfind	dfsides	dfinter	Find	Fside	Finter	Pind	Pside	Pinter
1	2.19E-005	5.38E-006	5.22E-006	5.80E-007	1.50E+003	3.20E+001	1.50E+003	4.1923526	1.0308615	8.9895861	0	0.42015764	0
2	3.88E-005	4.82E-006	5.26E-006	9.47E-007	1536	32	1536	7.3784492925	0.9172950507	5.5486013	0	0.60085838	0

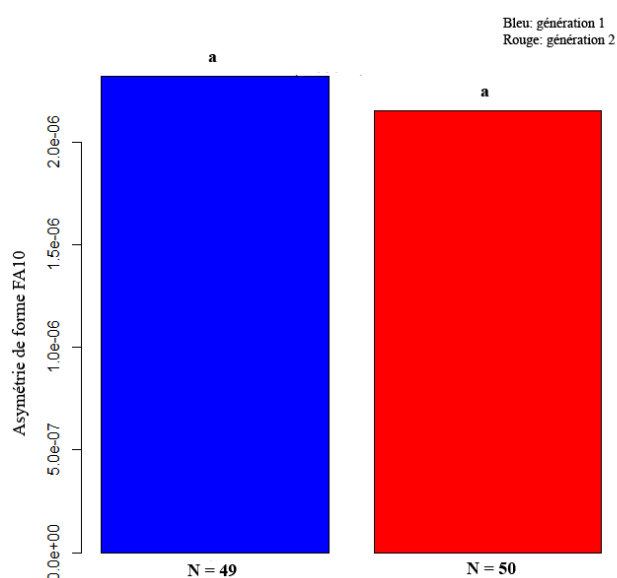


Figure 27 : Graphique de la part d'asymétrie fluctuante de forme des deux générations d'ouvrières de *Bombus terrestris*.

4. Discussion

En suivant les méthodes d'élevage de Roseler (1985) et de Duchateau & Velthuis (1988), nous sommes arrivés à un taux de survie de près de 100% pour les colonies élevées. Par ailleurs, nous avons obtenu une proportion de mâles haploïdes et diploïdes lors des premiers couvains similaires aux précédentes études en laboratoire (Duchateau & Velthuis 1988, Duchateau et al. 1994). Cependant, nous n'avons pas pu produire de troisième génération puisqu'aucune reine n'a été produite lors de la seconde génération.

4.1. Caractère diagnostique de la forme de l'aile chez les mâles de *Bombus terrestris*

Comme lors de précédentes études sur les Hyménoptères, un dimorphisme sexuel marqué au niveau de l'aile a pu être mis en évidence (Pretorius 2005). Ce caractère nous a aussi permis de discriminer les spécimens au niveau des castes de bourdons ainsi que les mâles selon leur degré de ploïdie. Les résultats de chaque analyse (BgACP, LDA) ont donné un pattern similaire. Cependant, la puissance de discrimination de la géométrie morphométrique est différente selon les castes.

Comme le montre l'analyse discriminante, le taux de confusion entre les deux groupes de mâles reste très faible. La forme des ailes des mâles haploïdes et des mâles diploïdes est donc un caractère morphologique puissant pour permettre leur discrimination. Le biais d'identification dû aux ouvrières est facilement contourné par une analyse visuelle des génitalia, très aisément distinguables entre ouvrières et mâles. Lorsqu'on ne considère que les identifications robustes au niveau des ailes, le hit-ratio atteint même 99,55% d'identifications correctes et 98,8% pour les identifications robustes et correctes au niveau des spécimens.

Cependant, le but ultime n'est pas l'identification d'une aile mais d'un spécimen. Ces identifications sont également robustes comme le montre les hit-ratio des différents groupes (100% pour les mâles haploïdes et les reines, 99% pour les ouvrières et 97,2% pour les mâles diploïdes).

La morphologie des mâles diploïdes avait été relativement peu étudiée et utilisée auparavant. En effet, ceux-ci sont semblables aux mâles haploïdes mis à part quelques traits morphologiques comme leur taille moyenne (légèrement inférieure chez les bourdons), la taille de leurs organes génitaux mâles ou la taille de leurs spermatozoïdes (plus grands chez les mâles diploïdes) (Duchateau & Marrien 1995). Les ailes sont un caractère facilement mesurable, cependant, il est possible que la

forme d'autres caractères morphologiques varie entre les mâles haploïdes et diploïdes, cette question n'a encore jamais été investiguée.

Au contraire d'autres espèces d'Hyménoptères, les mâles diploïdes de bourdons ne sont pas éliminés à des stades précoces du développement (Woyke 1963). La possibilité de les discriminer facilement des mâles haploïdes a donc un intérêt particulier dans la biologie de la conservation. Selon une étude de modélisation récente, le vortex des mâles diploïdes pourrait être stoppé grâce à un flux génique, même très faible (Hein et al. 2009). De plus, le fardeau génétique que représentent les mâles diploïdes n'est pas à généraliser à tous les Hyménoptères puisqu'ils possèdent un fitness similaire aux mâles haploïdes chez certaines espèces (Elias et al. 2009, Elias et al. 2010, Kureck et al. 2013).

Les bourdons utilisés pour cette étude proviennent tous de la même société de production de bourdons (Biobest N.V.). Il est donc possible que la variabilité de forme reste faible au sein des castes dû à leur proximité génétique. Une plus grande diversité génétique pourrait augmenter la diversité de formes. Un aspect intéressant à approfondir serait l'utilisation d'un jeu de données avec des mâles d'une même espèce aux origines et à la localisation très différentes afin de tester la puissance d'un outil d'identification généralisé des mâles diploïdes. En effet, une étude avait déjà démontré que des mâles d'une même espèce, aux origines différentes, pouvaient posséder des formes d'ailes différentes, bien que cette étude ait été réalisée par des analyses en morphométrie linéaires (Kozmus et al. 2011). Le même type d'étude devra également être appliqué à d'autres espèces pour confirmer ou infirmer sa capacité de discrimination, un aspect étudié actuellement en partenariat avec des élevages réalisés par Biobest. Enfin, dans le futur, l'application de ces études de laboratoire devront être appliquées sur le terrain.

4.2. Détermination de l'asymétrie des ailes chez *Bombus terrestris*

En ce qui concerne la stabilité développementale, tant la part d'asymétrie fluctuante que la part d'asymétrie directionnelle étaient significatives pour les 4 groupes étudiés. Les analyses ont montré que les mâles diploïdes étaient significativement plus asymétriques que les trois autres groupes, dont les mâles haploïdes. Cependant, la part d'asymétrie ne diffère pas entre ces trois autres groupes (mâles haploïdes, ouvrières et reines). Ceci contraste avec les autres études d'asymétrie fluctuante réalisées sur *Apis mellifera* puisque les mâles haploïdes avaient systématiquement montré une asymétrie plus forte que les femelles diploïdes (Bruckner 1976, Clarke et al. 1986, Clarke & Oldroyd 1996, Smith et al. 1997). L'argument avancé était la possibilité pour les femelles diploïdes de

tamponner les erreurs développementales par un génome diploïde et leur hétérozygotie. D'autres études se sont penchées sur des espèces différentes d'Hyménoptères (*Apis cerana*, *Solenopsis invicta*, *Vespula germanica*) et de Thysanoptères, avec des résultats différents de ceux obtenus pour *Apis mellifera*. En effet chez ces espèces, aucune relation n'a pu être mise en avant entre la stabilité développementale des mâles haploïdes et des femelles diploïdes (Clarke 1997, Crespi & Vanderkist 1997).

Dans notre étude, la comparaison avec des mâles diploïdes est une première. Ils résultent d'une erreur développementale et malgré leur diploïdie, montre une asymétrie supérieure à tous les autres groupes. Ceci pose question sur la capacité de la diploïdie à tamponner les erreurs développementales mais aussi sur le lien entre l'hétérozygotie et la stabilité développementale, un lien qui a toujours posé question. Il y'a cette fois une relation claire entre l'homozygotie et une stabilité développementale faible. Cependant, cette relation peut être due intrinsèquement à l'homozygotie ou à un autre caractère propre aux mâles diploïdes. C'est une question qui reste en suspens et demandera à être approfondie. Il semble cependant qu'une hypothèse générale sur les facteurs influençant la stabilité développementale peut difficilement être émise. Cette stabilité développementale semble être caractère-, taxon- ou encore environnementale-spécifique et ne semble pas pouvoir être généralisée de manière transversale entre ces différents facteurs (Clarke 1997).

Au contraire, aucune asymétrie de forme n'a été détectée entre la génération d'ouvrières de la colonie mère et celle de la colonie fille consanguine. Cependant, une asymétrie de taille a été détectée, résultant en une seconde génération d'ouvrières significativement plus asymétrique en ce qui concerne la taille des ailes. Les phénomènes de consanguinité sont connus pour influencer négativement la stabilité développementale d'un organisme (Clarke et al. 1992, Eldridge et al. 1999). Dans ce cas, une seule génération d'individus consanguins a été produite (bien que cette consanguinité soit relativement forte puisque l'accouplement se réalise entre frères et sœurs). Une seule génération d'accouplements consanguins n'a donc peut-être pas été suffisante pour détecter cette augmentation d'asymétrie de forme, puisque seule une asymétrie de taille a été détectée.

Cette augmentation d'asymétrie fluctuante peut avoir de nombreuses conséquences sur le fitness d'individus. Chez de nombreux groupes, les performances de vol ont été affectées. Son efficacité peut en effet diminuer lorsque l'asymétrie des ailes augmente comme cela a été démontré chez les oiseaux (Moller 1991), les Odonates (De Block & Stocks 2007) et les Drosophiles (Markow & Ricker 1992). Cette relation est également suspectée chez *Apis mellifera* (Hepburn et al. 1999).

Enfin, chez *Apis mellifera*, la sélection sexuelle sélectionne négativement les mâles plus asymétriques car leur probabilité d'être choisie par une femelle diminue avec l'asymétrie de leurs ailes (Jaffe & Moritz 2010). C'est donc le fitness d'une population consanguine qui peut être affecté par cette variation phénotypique.

Dans tous les cas, ces résultats demandent à être validés chez d'autres espèces. Ces recherches sont en cours dans différents laboratoires avec lesquels nous sommes en collaboration.

5. Conclusion

L'utilisation de la morphométrie géométrique pour discriminer les mâles haploïdes des mâles diploïdes de *Bombus terrestris* semble être un outil approprié avec un haut pouvoir de discrimination. Cet outil demande à être développé et testé sur d'autres espèces de bourdons ainsi que d'autres abeilles sauvages.

Cette possibilité de discrimination sur base morphologique et non la génétique est un point capital au niveau du coût économique, de la rapidité et de la facilité à détecter la présence de mâles diploïdes dans une population. Les mâles diploïdes traduisent une santé génétique relativement basse d'une population, due à la faible diversité allélique et l'augmentation de la probabilité de production d'un homozygote pour le sl-CSD. Cet outil donne donc une indication de la santé génétique d'une population de ces insectes pollinisateurs de manière simple et efficace.

En ce qui concerne la stabilité développementale, la forte asymétrie des mâles diploïdes met en évidence l'impact d'un stress (génétique dans ce cas) sur la stabilité morphologique d'un individu. Puisque les mâles diploïdes sont plus asymétriques que les mâles haploïdes, ce paramètre pourrait être combiné à la forme de l'aile pour augmenter la puissance de discrimination entre mâles haploïdes et diploïdes.

6. Perspectives

Dans le futur, un outil de discrimination des mâles diploïdes pourrait permettre d'évaluer leur proportion au sein de la population, tant d'un point de vue géographique qu'historique. L'importance d'un tel outil réside dans le fait que les insectes pollinisateurs subissent des pressions environnementales importantes, qui entraînent leur déclin. Cet outil pourrait alors être développé pour gérer leurs populations en vue de cibler les populations à risque. Il serait applicable dans une large gamme de domaines comme ceux de la biologie de la conservation et de gestion des services écosystémiques (par exemple, la pollinisation des cultures). En plus des perspectives écologiques, cet outil comporte aussi des perspectives économiques puisque les sociétés de production de bourdons pourraient augmenter leur productivité par la détection des colonies comportant des mâles diploïdes.

7. Bibliographie

- Adams J, Rothman ED, Ker WE, Paulino ZL.** 1977. Estimation of the number of sex alleles and queen matings from diploid male frequencies in a population of *Apis mellifera*. *Genetics* 86:583 – 596.
- Adams D.C., Rohlf F. J., Slice D.E.** 2004. Geometric morphometrics: ten years of progress following the 'revolution'. *Italian Journal of Zoology* 71:5 – 16.
- Adams DC, Rohlf FJ, Slice DE.** 2013. A field comes of age: Geometric morphometrics in the 21st century. *Hystrix* 24.
- Alford DV.** 1975. *Bumblebees*. Davis-Poynter, London.
- Amin MR, Than KK, Kwon YJ.** 2010. Mating statuts of bumblebees, *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae) with notes on ambient temperature, age and virginity. *Applied Entomology and Zoology* 45:363 – 367.
- Armbruster P, Reed DH.** 2005. Inbreeding depression in benign and stressful environments. *Heredity* 95:235 – 242.
- Armitage S, Boomsma J, Baer B.** 2010. Diploid male production in a leaf-cutting ant. *Ecological Entomology* 35:175 – 182.
- Asplen MK, Whitfield JB, de Boer JG, Heimpel GE.** 2009. Ancestral state reconstruction analysis of hymenopteran sex determination mechanisms. *Journal of Evolutionary Biology* 22:1762 – 1769.
- Ayabe T, Hoshiba H, Ono M.** 2004. Cytological evidence for triploid males and females in the bumblebee, *Bombus terrestris*. *Chromosome research* 12:215 – 223.
- Aytekin AM, Terzo M, Rasmont P, Cagatay N.** 2007. Landmark based geometric analysis of wing shape in *Sibiricobombus* Vogt (Hymenoptera: Apidae: *Bombus* Latreille). *Annales de la Société Entomologique de France* (n.s.) 43 : 95 – 102.
- Beekman M, Van Stratum P, Lingeman R.** 1998. Diapause survival and post-diapause performance in bumblebee queens of *Bombus terrestris*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 89:207 – 214.
- Beekman M, Van Stratum P, Verrman A.** 1999. Selection for nondiapause in the bumblebee *Bombus terrestris*, with notes on the effect of inbreeding. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 93:69 – 75.
- Bennett ATD, Cuthill IC, Partridge JC, Maier EJ.** 1996. Ultraviolet vision and mate choice in zebra finches. *Nature* 380:433 – 435.

M. GERARD, 2014. Influence d'un stress génétique sur la forme des ailes de Bourdons

- Beye M.** 2004. The dice of fate: the *csd* gene and how its allelic composition regulates sexual development in the honey bee, *Apis mellifera*. *Bioessays* 26:1131 – 1139.
- Beye M, Hasselmann M, Fondrk MK, Page RE, Omholt SW.** 2003. The gene *csd* in the primary signal for sexual development in the honeybee and encodes an SR-type protein. *Cell* 114:419 – 429.
- Biesmeijer JC, Roberts SPM, Reemer M, Ohlemüller R, Edwards M, Peeters T, Schaffers AP, Potts SG, Kleukers R, Thomas CD, Settele J, Kunin WE.** 2006. Parallel declines in pollinators and insect-pollinated plants in Britain and the Netherlands. *Science* 313:351 – 354.
- Bookstein FL.** 1991. *Morphometric Tools for Landmark Data: Geometry and Biology*. Cambridge, Cambridge University Press.
- Bradshaw AD.** 1965. Evolutionary significance of phenotypic plasticity in plants. *Advances in Genetics* 13:115 – 155.
- Brown MJF, Paxton RJ.** 2009. The conservation of bees : a global perspective. *Apidologie* 40:410 – 416.
- Brown MJF, Schmid-Hempel R, Schmid-Hempel P.** 2003. Strong context-dependent virulence in a host-parasite system: reconciling genetic evidence with theory. *Journal of Animal Ecology* 72:994 – 1002.
- Brückner D.** 1976. The influence of genetic variability on wing symmetry in honeybees (*Apis mellifera*). *Evolution* 30:100 – 108.
- Bull JJ.** 1983. *Evolution of Sex Determining Mechanisms*. Cummings, Menlo Park, CA.
- Camargo CA.** 1979. Sex determination in bees. XI. Production of diploid males and sex determination in *Melipona quadrifasciata*. *Journal of Apicultural Research* 18: 77-84.
- Cameron SA, Hines HM, Williams PH.** 2007. A comprehensive phylogeny of the bumble bees (*Bombus*), *Biological Journal of Linnean Society* 91, 161–188.
- Cameron SA, Lozier JD, Strange JP, Koch JB, Cordes N, Solter LF, Griswold TL.** 2011. Patterns of widespread decline in North American bumble bees. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108:662 – 667.
- Carvalho L. G., Kunin W. E., Keil P., Aguirre-Gutiérrez J., Ellis W. N., Fox R., Groom Q., Hennekens S., Van Landuyt W., Maes D., Van de Meutter F., Michez D., Rasmont P., Ode B., Potts S. G., Reemer M., Roberts S. P. M., Schaminée J., Wallisdevries M. F., Biesmeijer J.C.** 2013. Biodiversity declines and biotic homogenization have slowed-down for NW-European pollinators and plants. *Ecology Letters*, 16:870 - 878.
- Carvalho GA.** 2001. The number of sex alleles (CSD) in a bee population and its practical

- importance (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Hymenoptera Research* 10:10 – 15.
- Chapman TW, Stewart SC** 1996. Extremely high levels of inbreeding in a natural population of the free-living wasp *Ancistrocerus antilope* (Hymenoptera: Vespidae: Eumeninae). *Heredity* 76:65 – 69.
- Chapman RF**. 1998. *The insects: structure and function*. Cambridge University Press. Cambridge.
- Charman TG, Sears J, Green RE, Bourke AFG**. 2010. Conservation genetics, foraging distance and nest density of the scarce Great Yellow Bumblebee (*Bombus distinguendus*). *Molecular Ecology* 19:2661 – 2674.
- Clarke GM**. 1993. The genetic basis of developmental stability. I. Relationships between stability, heterozygosity and genomic coadaptation. *Genetica* 89:15 – 23.
- Clarke GM**. 1997. The Genetic Basis of Developmental stability III. Haplo-diploidy: Are males more stable than females? *Evolution* 51:2021 – 2028.
- Clarke GM**. 1998. Developmental stability and fitness: the evidence is not quite so clear. *The American Naturalist* 152:762-766.
- Clarke GM**. 1998. The Genetic basis of developmental stability. V. Inter and intra individual character variation. *Heredity* 80:562 – 567.
- Clarke GM, Oldroyd BP**. 1996. The genetic basis of developmental stability in *Apis mellifera* II Relationships between character size, asymmetry and single-locus heterozygosity. *Genetica* 97:211 – 224.
- Clarke GM, Brand GW, Whitten MJ**. 1986. Fluctuating asymmetry: A technique for measuring developmental stress caused by inbreeding. *Australian Journal of Biological Sciences* 39:145 – 153.
- Clarke GM, Oldroyd BP and Whitten MJ**. 1992. The genetic basis of developmental stability in *Apis mellifera*: Heterozygosity versus genic balance. *Evolution* 46:753 – 762.
- Claude J**, *Morphometrics with R*, Springer, 2008
- Colla SR, Packer L**. 2008. Evidence for decline in eastern North American bumblebees (Hymenoptera: Apidae), with special focus on *Bombus affinis* Cresson. *Biodiversity Conservation* 17:1379 – 1391.
- Cook JM, Crozier RH**. 1995. Sex determination and population biology of the Hymenoptera. *Trends in Ecology and Evolution* 10:281 – 286.
- Cournault L, Aron S**. 2008. Rapid determination of sperm number in ant queens by flow cytometry. *Insectes sociaux*. 55, 283-287.
- Cowan DP, Stahlhut JK**. 2004. Functionally reproductive diploid and haploid males in an inbreeding hymenopteran with complementary sex determination. *Proceedings of the*

National Academy of Sciences USA 101:10374 – 10379.

- Crespi BJ, Vanderkist BA.** 1997. Fluctuating asymmetry in vestigial and functional traits of a haplodiploid insect. *Heredity* 78:624 – 630.
- Crozier RH.** 1971. Heterozygosity of sex determination in haplodiploidy. *The American Naturalist* 105:399 – 412.
- Crozier RH.** 1977. Evolutionary genetics of the Hymenoptera. *Annual Review of Entomology*, 22:263 – 288.
- Darvill B, Ellis JS, Lye GC, Goulson D,** 2006. Population structure and inbreeding in a rare and declining bumblebee, *Bombus muscorum*. *Molecular Ecology* 15: 601-611.
- Darvill B, Lepais O, Woodall LC, Goulson D.** 2012. Triploid bumblebees indicate a direct cost of inbreeding in fragmented populations. *Molecular Ecology* 21:3988 – 3995.
- Davis ES, Murray TE, Fitzpatrick N, Brown MJF, Paxton RJ.** 2010. Landscape effects on extremely fragmented populations of a rare solitary bee, *Colletes floralis*. *Molecular Ecology*. 19:4922 – 4935.
- De Block M, Stocks R.** 2007. Flight-related body morphology shapes mating success in a damselfly. *Animal Behavior* 74:1093 – 1098.
- De Meulemeester T, Michez D, Aytekin AM, Danforth BN.** 2012. Taxonomic affinity of halictid bee fossils based on geometric morphometrics analyses of wing shape. *Journal of Systematic Palaeontology* 10:755 – 764.
- Debat V, David P.** 2001. Mapping phenotypes: canalization, plasticity and developmental stability. *Trends in Ecology and Evolution* 16:555 – 561.
- Debat V, Alibet P, David P, Paradis E, Auffray JC.** 2000. Independence between developmental stability and canalization in the skull of the house mouse. *Proceedings of The Royal Society B: Biological Sciences*. 423 – 430.
- Debat V, Debelle A, Dworkin I.** 2009. Plasticity, canalization and developmental stability of the *Drosophila* wing: joint effects of mutations and developmental temperature. *Evolution* 63-11:2864 – 2876.
- Duchateau MJ, Velthuis HHW.** 1988. Development and reproductive strategies in *Bombus terrestris* colonies. *Behaviour*. 107:186 – 207.
- Duchateau MJ, Marien J.** 1995. Sexual biology of haploid and diploid males in the bumblebee *Bombus terrestris*. *Insectes Sociaux* 42:255 – 266.
- Duchateau MJ, Hoshiba H, Velthuis HHW.** 1994. Diploid males in the bumble bee *Bombus terrestris*. Sex determination, sex alleles and viability. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 71:263 – 269.

M. GERARD, 2014. Influence d'un stress génétique sur la forme des ailes de Bourdons

- Duchateau MJ, Velthuis HHW, Boomsma JJ.** 2004. Sex ratio variation in the bumblebee *Bombus terrestris*. Behavioral Ecology 15:71 – 82.
- Duvoisin N, Baer B, Schmid-Hempel P.** 1999. Sperm transfer and male competition in a bumblebee. Insectes sociaux 50:101 – 108.
- Eldridge MDB, King JM, Loupis AK, Spencer PBS, Taylor AC, Pope LC, Hall GP.** 1999. Unprecedented low levels of genetic variation and inbreeding depression in an island population of the black-footed rock-wallaby. Conservation Biology. 13:531 – 541.
- Elias J, Mazzi D, Dorn S.** 2009. No need to discriminate? Reproductive diploid males in a parasitoid with complementary sex determination. PLOS one 4 (6) e6024.
- Elias J, Dorn S, Mazzi D.** 2010. Inbreeding in a natural population of the gregarious parasitoid wasp *Cotesia glomerata*. Molecular Ecology 19:2336 – 2345.
- Ellis JS, Knight ME, Darvill B, Goulson D.** 2006. Extremely low effective population sizes, genetic structuring and reduced genetic diversity in a threatened bumblebee species, *Bombus sylvarum*. Molecular Ecology 15:4375 – 4386
- Engel MS.** 2001. A monograph of the Baltic Amber bees and evolution of the Apoidea (Hymenoptera). Bulletin of the American Museum of Natural History 259:1 – 192.
- Estoup A, Solignac M, Cornuet JM, Goudet J, Scholl A.** 1996. Genetic differentiation of continental and island populations of *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae) in Europe. Molecular Ecology 5:19 – 31.
- Francoy TM, Prado PRR, Gonçalves LS, Costa LDF, De Jong D** 2006 Morphometric differences in a single wing cell can discriminate *Apis mellifera* racial types
- Francoy TM, Wittmann D, Drauschke M, Muller S, Steinhage V, Bezerra Laure MAE, De Jong D, Gonçalves LS** 2008 Identification of 72 Africanized honey bees through wing morphometrics: two fast and efficient procedures. Apidologie 39:488 – 494.
- Francoy TM, Silva RAO, Nunes-Silva P, Menezes C, Imperatriz-Fonseca VL** 2009. Gender identification of five genera of stingless bees (Apidae, Meliponini) based on wing morphology. Genetics and molecular research 8:207 – 214.
- Francoy TM, De Faria Franco F, Roubik DW** 2012 Integrated landmark and outline-based morphometric methods efficiently distinguish species of *Euglossa* (Hymenoptera, Apidae, Euglossini).
- Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA.** 2002. Introduction to Conservation genetics, Cambridge University Press, Cambridge.
- Garibaldi LA, Steffan-Dewenter I, Winfree R, Aizen MA, Bommarco R, Cunningham SA, Kremen C, Carvalheiro LG, Harder LD, Afik O, Bartomeus I, Benjamin F, Boreux V,**

- Cariveau D, Chacoff NP, Dudenhoffer JH, Freitas BM, Ghazoul J, Greenleaf S, Hipolito J, Holzschuh A, Howlett B, Isaacs R, Javrorek SK, Kennedy CM, Krewenka KM, Krishnan S, Mandelik Y, Mayfield MM, Motzke I, Munyuli T, Nault BA, Otieno M, Petersen J, Pisanty G, Potts SG, Rader R, Ricketts TH, Rundlof M, Seymour CL, Schuepp C, Szentgyorgyi H, Taki H, Tscharntke T, Vergara CH, Viana BF, Wanger TC, Westphal C, Williams N, Klein AM.** 2013. Wild Pollinators Enhance Fruit Set of Crops Regardless of Honey Bee Abundance. *Science* 339:1608 – 1611/
- Genersch E, Yue C, Fries I, De Miranda JF** 2006 Detection of deformed wing virus, a honey bee viral pathogen, in bumble bees (*Bombus terrestris* and *Bombus pascuorum*) with deformities. *Journal of Invertebrate Pathology* 91:61 – 63.
- Gerloff CU, Ottmer BK, Schmid-Hempel P.** 2003. Effects of inbreeding on immune response and body size in a social insect: *Bombus terrestris*. *Functional Ecology* 17:582 – 589.
- Gerloff CU, Schmid-Hempel P.** 2005. Inbreeding depression and family variation in a social insect, *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae). *Oikos* 111: 67 – 80.
- Gilbert P, Capy P, Imasheva A, Moreteau B, Morin JP, Pétavy G, David JR** 2004 Comparative analysis of morphological traits among *Drosophila melanogaster* and *D. simulans*: Genetic variability, clines and phenotypic plasticity. *Genetica* 120:165 – 179.
- Goodall CR.** 1991. Procrustes methods in the statistical analysis of shape (with discussion and rejoinder). *Journal of the Royal Statistical Society, series B* 53:285 – 339.
- Goulson D.** 2010. Bumblebees. Oxford University Press. New-York.
- Goulson D, Darvill B.** 2004. Niche overlap and diet breadth in bumblebees: are rare species more specialized in their choice of flowers?. *Apidologie* 35:55 – 63.
- Goulson D, Hanley ME, Darvill B, Ellis JS, Knight ME.** 2005. Causes of rarity in bumblebees. *Biological Conservation* 122:1 – 8.
- Goulson D, Lye GC, Darvill B.** 2008. Decline and conservation of bumblebees. *Annual Review of Entomology* 53:191 – 208.
- Green CL, Oldroyd BP.** 2002. Queen mating frequency and maternity of males in the stingless bee *Trigona carbonaria* Smith. *Insectes Sociaux* 49: 196 – 202.
- Hedrick PW, Parker JD.** 1997. Evolutionary genetics and genetic variation of haplodiploids and X-linked genes. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 28:55 – 83.
- Heimpel GE, de Boer JG.** 2008. Sex determination in the Hymenoptera. *Annual review of Entomology* 53:209 – 230.
- Hein S, Poethke HJ, Dorn S.** 2009. What stops the ‘diploid male vortex’? – A simulation study for species with single locus complementary sex determination. *Ecological Modelling* 220:1663

M. GERARD, 2014. Influence d'un stress génétique sur la forme des ailes de Bourdons

– 1669.

Hepburn HR, Radloff SE, Fuchs S. 1999. Flight machinery dimensions of honeybees, *Apis mellifera*. Journal of Comportemental Physiology B 169:107 – 112.

Herrmann M, Trenzcek T, Fahrenhorst H, Engels W. 2005. Characters that differ between diploid and haploid honey bee (*Apis mellifera*) drones. Genetics and Molecular Research 4:624 – 641.

Ho GWC, Leung KMY, Lajus DL, Ng JSS, Chan BKK. 2009. Fluctuating asymmetry of *Amphibalanus* (*Balanus*) *amphitrite* (Cirripedia: Thoracica) in association with shore height and metal pollution. Hydrobiologia 621:21 – 32.

Huberty CJ, Olejnik S. 2006. Applied MANOVA and Discriminant Analysis. Second Edition. New Jersey.

Ito M 1987 Geographic variation of an East Asian bumblebee *Bombus diversus* in some morphometric characters (Hymenoptera, Apidae). Japanese journal of entomology 55:188 – 201.

IUCN, Bumblebee specialist Group, http://www.iucn.org/about/work/programmes/species/who_we_are/ssc_specialist_groups_and_red_list_authorities_directory/invertebrates/bumblebee_specialist_group/ 15 mai 2014.

Jaffé R, Moritz RFA. Mating flights select for symmetry in honeybee drones (*Apis mellifera*). Naturwissenschaften 97:337 – 343.

Johannsen W. 1909. The genotype conception of heredity. American Naturalist 45:129 – 159.

Karsli BA, Gurel F 2013 Effects of CO2 Narcosis on the Onset of oviposition and colony founding success of post diapausing bumblebee (*Bombus terrestris*) Queen. Kafkas Universitesi Veteriner Fakyltesi Dergisi 19:221 – 224.

Keller LE, Waller DM. 2002. Inbreeding effects in wild populations. Trends in Ecology and Evolution 17:230 – 241.

Kendall DG. 1984. Shape-manifolds, procrustean metrics and complex projective spaces. Bulletin of the London Mathematical Society 16:81 – 121.

Kendall DG. 1986. Comment on F. L. Bookstein. Size and shape spaces for landmark data in two dimensions. Statistical Science 1:222 – 226.

Ker WE. 1987. Sex determination in bees. XXI. Number of XO-heteroalleles in a natural population of *Melipona compressipes fasciculata* (Apidae). Inseces Sociaux 34:274 – 279.

Kevan PG, Phillips TP. 2001. The economic impacts of pollinator declines: an approach to assessing the consequences. Conservation Ecology 5:8.

Klein AM, Vaissière BE, Cane JH, Steffan-Dewenter I, Cunningham SA, Kremen C,

- Tscharntke T.** 2007. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of the Royal Society of London B* 274:303 – 313.
- Klingenberg CP, McIntyre GS.** 1998. Geometric morphometrics of developmental instability: analyzing patterns of fluctuation asymmetry with procrustes methods. *Evolution* 52:1363 – 1375
- Klingenberg CP, Barulenga M, Meyer A.** 2002. Shape analysis of symmetric structures: Quantifying variation among individuals and asymmetry. *Evolution* 56:1909 – 1920.
- Kozmus P, Virant-Doberlet M, Meglic V, Dovc** 2011 Identification of *Bombus* species based on wing venation structure, *Molecular Nutrition and Food Research* 55:1735 – 1739.
- Kremen C, Williams NM, Bugg RL, Fay JP, Thorp RW.** 2004. The area requirements of an ecosystem service: crop pollination by native bee communities in California. *Ecology Letters* 7:1109 – 1119.
- Kukuk PF, May B.** 1990. Diploid males in a primitively eusocial bee, *Lasioglossum (Dialictus) zephyrum*. *Evolution* 44:1522 – 1528.
- Kureck IM, Nicolai B, Foitzik S** 2013 Similar Performance of Diploid and haploid males in an ant species without inbreeding avoidance. *Ethology* 119:360 – 367.
- Kwon YJ, Saeed S, Duchateau MJ** 2003. Stimulation of colony initiation and colony development in *Bombus terrestris* by adding a male pupa: The influence of age and orientation. *Apidologie* 34:429 – 437.
- Leamy LJ, Klingenberg CP.** 2005. The Genetics and Evolution of Fluctuating Asymmetry. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 36:1 – 21.
- Lens L, van Dongen S, Wilder CM, Brooks TM, Matthysen E.** 1999. Fluctuating asymmetry increases with habitat disturbance in seven bird species of a fragmented afrotrropical forest. *Proceedings of Royal Society B* 266:1241 – 1246.
- Loh R, David JR, Debat V, Bitner-Mathé BC** 2008 Adaptation to different climates results in divergent phenotypic plasticity of wing size and shape in an invasive drosophilid. *Journal of Genetics* 87: 209 – 217.
- Lopez-Urbe MM, Almanza MT, Ordonez M.** 2007. Diploid male frequencies in Colombian populations of euglossine bees. *Biotropica* 39:299 – 314.
- Lopez-Vaamonde C, Brown RM, Lucas ER, Pereboom JJM, Jordan WC, Bourke AFG.** 2007. Effect of the queen on worker reproduction and new queen production in *Bombus terrestris*. *Apidologie* 38:171 – 180.
- Lozier JD, Cameron SA.** 2009. Comparative genetic analyses of historical and contemporary collections highlight contrasting demographic histories for the bumble bees *Bombus*

M. GERARD, 2014. Influence d'un stress génétique sur la forme des ailes de Bourdons

pensylvanicus and *Bombus impatiens* in Illinois. *Molecular Ecology* 18:1875 – 1886.

Lozier JD, Stange JP, StewartIJ, Cameron SA. 2011. Patterns of range-wide genetic variation in six North American bumble bee (Apidae: *Bombus*) species. *Molecular Ecology* 20:4870 – 4888.

Luna MG, Hawkins BA. 2004. Effects of inbreeding in *Nasonia vitripennis* (Hymenoptera: Pteromalidae). *Environmental Entomology*. 33:765 – 775.

Maebe K, Meeus I, Maharramov J, Grootaert P, Rasmont P, Smagghe G 2013. Microsatellite analysis in museum samples reveals inbreeding before the regression of *Bombus veteranus*. *Apidologie* 44:188 – 197.

Marcus LF. 1990. Traditional morphometrics. Pages 77 – 122 in FJ Rohlf and FL Bookstein (eds.). Proceedings of the Michigan morphometrics workshop. University of Michigan Museum of Zoology Special Publication 2.

Marcus L, Hingst-Zaher E, Zaher H. 2000. Application of landmark morphometrics to skulls representing the orders of living mammals. *Hystrix, the Italian Journal of Mammalogy* 11/27 – 47.

Markow TA, Ricker JP. 1992. Male size, developmental stability and mating success in natural populations of three *Drosophila* species. *Heredity* 69:122 – 127.

Mattu VK and Verma LR. 1984. Morphometric studies on the Indian honeybee, *Apis cerana indica* F. – Effect of seasonal variations. *Apidologie* 15:63 – 74.

McCorquodale DB, Owen RE. 1994. Laying sequence, diploid males and nest usurpation in the leafcutter bee, *Megachile rotundata* (Hymenoptera: Megachilidae). *Journal of Insect Behavior* 7:731 – 738.

Michener CD. 2000. The bees of the world. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, Maryland.

Mitteroecker P, Gunz P, Bernhard M, Schaefer K, Bookstein FG. 2004. Comparison of cranial ontogenetic trajectories among great apes and humans. *Journal of Human Evolution* 46:679 – 698.

Mitton JB. 1994. Enzyme heterozygosity, metabolism and developmental stability. In: Markow TA (ed.) *Developmental Instability: its Origins and Evolutionary Implications*, pp. 49 – 67. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

Moller AP. 1991. Sexual ornament size and the cost of fluctuating asymmetry. *Proceedings of the Royal Society of London B Biology* 243:59 – 62.

Moller AP. 1992. Female swallow preference for symmetrical male sexual ornaments. *Nature* 357:238 – 240.

M. GERARD, 2014. Influence d'un stress génétique sur la forme des ailes de Bourdons

- Moller AP.** 1994. Sexual selection in the barn swallow (*Hirundo rustica*). IV. Patterns of fluctuating asymmetry and selection against asymmetry. *Evolution* 48:658 – 670.
- Moller AP.** 1997. Developmental stability and fitness: A review. *American Naturalist*. 149:916 – 932.
- Moller AP and Swadle JP.** 1997. *Asymmetry, Developmental Stability and Evolution*, Oxford University Press
- Owen.** 2012. Applications of Morphometrics to Hymenoptera, Particularly Bumble Bees (*Bombus*, *Apidae*).
- Packer L; Owen RE.** 1990. Allozyme variation, linkage disequilibrium and diploid male production in a primitively social bee *Augochlorella striata* (Hymenoptera: Halictidae). *Heredity* 65:241 – 248.
- Packer L, Zayed A, Grixti JC, Ruz L, Owen RE, Vivallo F, Toro H.** 2005. Conservation Genetics of Potentially Endangered Mutualisms: Reduced Levels of Genetic Variation in Specialist versus Generalist Bees. *Conservation Biology* 19:195 – 202.
- Palmer AR, Strobeck C.** 1986. Fluctuating asymmetry: measurement, analysis, patterns. *Annual review of Ecology, Evolution and Systematics* 17:391 – 421.
- Palmer AR.** 1996. Waltzing with asymmetry. *BioSciences* 46:518 – 532.
- Patiny S, Rasmont P, Michez D.** 2009. A survey and review of the statuts of wild bees in the West-Palaeartic region. *Apidologie*. 40:313 – 331.
- Paxton RJ.** 2005. Male mating behaviour and mating systems of bees: an overview. *Apidologie* 36:145 – 156.
- Paxton RJ, Thoren PA, Gyllenstrand N.** 2000. Microsatellite DNA analysis reveals low diploid male production in a communal bee with inbreeding. *Biological Journal of the Linnean Society* 69:483 – 502.
- Paxton RJ, Bego LR, Shah MM, Mateus S.** 2003. Low mating frequency of queens in the stingless bee *Scaptotrigona postica* and worker maternity of males. *Behavioral and Ecological Sociobiology* 53:174 – 181.
- Pélabon C, Hansen TF.** 2008. On the adaptative accuracy of directional asymmetry in insect wing size. *Evolution* 62:2855 – 2867.
- Pimentel D, Wilson C, McCullum C, Huang R, Dwen P, Flack J, Tran Q, Saltman T, Cliff B.** 1997. Economic and environmental benefits of biodiversity. *Bioscience* 47:747 – 757.
- Pinto NS, Juen L, Cabette HSR, De Marco P.** 2012. Fluctuating Asymmetry and Wing Size of *Argia tinctipennis* Selys (Zygoptera: Coenagrionidae) in Relation to Riparian Forest Preservation Status. *Neotropical Entomology* 41:178 – 185.
- Plowright RC, Pallett MJ.** 1979. Worker-male conflict and inbreeding in bumble bees

M. GERARD, 2014. Influence d'un stress génétique sur la forme des ailes de Bourdons

(Hymenoptera: Apidae). Canadian Entomologist 111:289 – 294.

Pretorius E. 2005. Using geometric morphometrics to investigate wing dimorphism in males and females of Hymenoptera – a case study based on the genus *Tachysphex* Kohl (Hymenoptera: Sphecidae: Larrinae). Australian Journal of Entomology 44:113 – 121.

R Development Core Team. 2013. R: A language and environment for statistical computing, version 3.0.2, ISBN 3-900051-07-0. *R Foundation for Statistical Computing*. Vienna, Austria.

Rasmont P, Coppée A, Michez D, De Meulemeester T. 2008. An overview of *Bombus terrestris* (L. 1758) subspecies (Hymenoptera: Apidae). Annales de la Société Entomologique de France 44:243 – 250.

Raven P, Johnson G, Losos J, Susan S., Biologie, Bruxelles, De Boeck, 2007.

Rohlf, FJ. (2013a). tpsUtil program, version 1.56. *Department of Ecology & Evolution, State University of New York, Stony Brook*.

Rohlf, FJ. (2013b). tpsDig, version 2.17. *Department of Ecology and Evolution, State University of New York, Stony Brook*.

Rohlf, FJ. 2013c. tps-SMALL, version 1.25. *Department of Ecology and Evolution, State University of New York, Stony Brook*.

Rohlf FJ, Marcus LF. 1993. A Revolution in morphometrics. Trends in Ecology and Evolution 8:129 – 132.

Rohlf FJ, Loy A, Corti M. 1996. Morphometric analysis of old world talpidae (mammalian, insectivora) using partial-warp scores. Systematic Biology 45:344 – 362.

Roll-Hansen N. 2008. Sources of Wilhelm Johannsen's Genotype theory. Journal of the History of Biology 42:457 – 493.

Roseler PF. 1985. A technique for year-round rearing of *Bombus terrestris* (Apidae, Bombini). Colonies in captivity. Apidologie 16:165 – 170.

Ross KG, Fletcher DJC. 1986. Diploid male production – a significant colony mortality factor in the fire ant *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae), Behavioral Ecology and Sociobiology 19:283 – 291.

Roubik DW, Weigt LA, Bonilla MA. 1996. Populations genetics, diploid males, and limits to social evolution of Euglossine bees. Evolution 50:931 – 935.

Ruf D, Dorn S, Mazzi D. 2013. Unexpectedly low frequencies of diploid males in an inbreeding parasitoid with complementary sex determination. Biological Journal of the Linnean Society 108:79 – 86.

Samejima Y, Tsubaki Y. 2010. Body temperature and body size affect flight performance in a damselfly. Behavioral Ecology and Sociobiology 64:685 – 692.

M. GERARD, 2014. Influence d'un stress génétique sur la forme des ailes de Bourdons

- Schlick-Steiner BC, Steiner FM, Seifert B, Stauffer C, Christian E, Crozier RH.** 2010. Integrative taxonomy: a multisource approach to exploring biodiversity. *Annual Review of Entomology* 55:421 – 438.
- Schmalhausen II.** 1949. *Factors of Evolution*. The University of Chicago Press, LTD, Chicago and London.
- Schmid-Hempel P, Schmid-Hempel R, Brunner PC, Seeman OD, Allen GR.** 2007. Invasion success of the bumblebee, *Bombus terrestris*, despite a drastic genetic bottleneck. *Heredity* 99:414 – 422.
- Smith DR, Crespi BJ, Bookstein FL.** 1997. Fluctuating asymmetry in the honey bee, *Apis mellifera* – effects of ploidy and hybridization. *Journal of Evolutionary Biology* 10:551 – 574.
- Stearns SC, Kaiser M, Kawecki TJ.** 1995. The differential genetic and environmental canalization of fitness components in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Evolutionary Biology* 8:539 – 557.
- Swaddle JP, Witter MS, Cuthill IC.** 1994. The analysis of fluctuating asymmetry. *Animal Behavior* 48:986 – 989.
- Swaddle JP.** 1997. Within-individual changes in developmental stability affect flight performance. *Behavioral Ecology* 8:601 – 604.
- Takahashi NC, Peruquetti RC, Del Lama MA, de Oliveira Campos LA.** 2001. A reanalysis of diploid male frequencies in euglossine bees (Hymenoptera: APidae). *Evolution* 55:1897 – 1899.
- Takahashi J, Ayabe T, Mitsuhashi M, Shimizu I, Ono M.** 2008. Diploid male production in a rare and locally distributed bumblebee, *Bombus florilegus*. *Insectes sociaux* 55:43 – 50.
- The Trustees of the Natural History Museum London,** Bumblebees, <http://www.nhm.ac.uk/research-curation/research/projects/bombus/index.html>, 15 mai 2014
- Thurin N, Aron S.** 2009. Sib-mating in the ant *Plagiolepis pygmaea*: Adaptive inbreeding? *Journal of Evolutionary Biology* 22:2481 – 2487.
- Tolfski A.** 2008 Using geometric morphometrics and standard morphometry to discriminate three honeybee subspecies. *Apidologie* 39:558 – 563
- Van Wilgenburg E, Driessen G, Beukeboom L.** 2006. Single locus complementary sex determination in Hymenoptera: an unintelligent design? *Frontiers in Zoology*. 3:1 – 15.
- Waddington CH.** 1939. *Introduction to Modern Genetics*. London: Allen and Unwin.
- Waddington CH.** 1942. Canalization of development and the inheritance of acquired characters. *Nature* 150:563 – 565.
- Waddington CH.** 1961. Genetic assimilation. *Advances in Genetics* 10:257 – 293.

M. GERARD, 2014. Influence d'un stress génétique sur la forme des ailes de Bourdons

- Wappler T, Engel MS.** 2003. The middle Eocene bee faunas of Eckfeld and Messel, Germany (Hymenoptera: Apoidea). *Journal of Paleontology*, 77:908 – 21
- Wappler T, De Meulemeester T, Aytakin MA, Michez D, Engel MS.** 2012. Geometric morphometric analysis of a new Miocene bumble bee from the Randeck Maar of southwestern Germany (Hymenoptera: Apidae). *Systematic Entomology* 37:784 – 792.
- Whitehorn PR, Tinsley MC, Goulson D.** 2009. Kin recognition and inbreeding reluctance in bumblebees. *Apidologie* 40:627 – 633.
- Whitehorn PR, Tinsley MC, Brown MJF, Darvill B, Goulson D.** 2009. Impacts of inbreeding on bumblebee colony fitness under field conditions. *BMC Evolutionary Biology* 9: art. No. 152.
- Whiting PW.** 1933. Selective fertilization and sex-determination in Hymenoptera. *Science* 78:537 – 538.
- Whiting PW.** 1943. Multiple alleles in complementary sex determination of *Habrobracon*. *Genetics* 28:365 – 382.
- Williams PH.** 1982. The distribution and decline of British Bumble bees (*Bombus* Latr.). *Journal of Apicultural Research* 21:236 – 245.
- Williams PH.** 1986. Environmental change and the distribution of British bumble bees (*Bombus* Latr.). *Bee World* 67:50 – 61
- Williams PH.** 1994. Phylogenetic relationships among bumble bees (*Bombus* Latr.): a reappraisal of morphological evidence. *Syst. Entomol.* 19:327 – 344.
- Williams PH, and Osborne JL.** 2009. Bumblebee vulnerability and conservation world-wide. *Apidologie* 40: 367-387.
- Williams PH, Brown MJF, Carolan JC, An J, Goulson D, Aytakin AM, Best LR, Byvaltsev AM, Cederberg B, Dawson R, Huang J, Ito M, Monfared An Raina RH, Schmid-Hempel P, Sheffield CS, Sima P, Xie Z.** 2012. Unveiling cryptic species of the bumblebee subgenus *Bombus* s. str. Worldwide with COI barcodes (Hymenoptera: Apidae). *Systematics and Biodiversity* 10:21 – 56.
- Winfree R.** 2010. The conservation and restoration of wild bees. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1195:169 – 197.
- Woyke J.** 1963. Drone larvae from fertilized eggs of the honeybee. *Journal of Apicultural Research* 2:19 – 24.
- Yoneda M.** 2008. Induction of colony initiation by Japanese native bumblebees using cocoons of exotic bumblebee *Bombus terrestris*. *Entomological Science* 1:123 – 126.
- Yoon HJ.** 2010. Wake-up treatments for improving oviposition and colony development of the Bumblebees *Bombus ignitus* and *Bombus terrestris*. *International Journal of Industrial*

M. GERARD, 2014. Influence d'un stress génétique sur la forme des ailes de Bourdons

Entomology 20:19 – 24.

Zakharov VM. 1992. Population phenogenetics: analysis of developmental stability in natural populations. Acta zoologica fennica 191:7 – 30.

Zayed A. 2004. Effective population size in Hymenoptera with complementary sex determination CSD. Heredity 93:627 – 630.

Zayed A. 2009. Bee genetics and conservation. Apidologie 40 :237 – 262.

Zayed A, Packer L. 2005. Complementary sex determination substantially increases extinction proneness of haplodiploid populations. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102:10742 – 10746.

Zayed A, Packer L. 2007. The population genetics of a solitary oligolectic sweat bee, *Lasioglossum* (Sphecodogastra) *oenotherae* (Hymenoptera: Halictidae). Behavioral Ecology and Sociobiology 61:435 – 447.

Zayed A, Roubik DW, Packer L. 2004. Use of diploid male frequency data as an indicator of pollinator decline. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences 271:S9 – S12.

Zelditch ML, Swiderski DL, Sheets HD, Fink WL. 2004. “Geometric Morphometrics for biologists: a primer”.

Zeuner, F.E. and Manning, F.J. 1976. A monograph of fossil bees (Hymenoptera: Apoidea). Bulletin of the British Museum (Natural History). Geology 27:151 – 268.

Annexe

Annexe 1: tableau des spécimens de seconde génération au laboratoire de Zoologie de l'Université de Mons

	Colonie 11	Colonie 12	Colonie 13	Colonie 14	Colonie 15	Colonie 16	Colonie 17	Colonie 18	Colonie 19	Colonie 20	Total
Mâles	10	12	7	1	10	4	0	12	12	14	82
Ouvrières	10	10	5	10	4	20	23	8	3	5	98
Total	20	22	12	11	14	24	23	20	15	19	180

Annexe 2: tableau des mâles de seconde génération du laboratoire de Zoologie de l'Université de Mons utilisés pour la cytométrie en flux

	Colonie 11	Colonie 12	Colonie 13	Colonie 14	Colonie 15	Colonie 16	Colonie 17	Colonie 18	Colonie 19	Colonie 20	Total
Mâles haploïdes	0	0	1	0	1	2	0	1	5	0	10
Mâles diploïdes	5	2	4	0	5	1	0	3	0	5	25
NA	0	1	0	1	2	1	0	1	0	0	6
Total	5	3	5	1	8	4	0	5	5	5	41

Annexe 3: Article soumis à la revue *Apidologie* sur la discrimination des mâles de *Bombus terrestris* selon leur degré de ploïdie via les techniques de morphométries géométriques.

Discrimination of haploid and diploid males of *Bombus terrestris* (Hymenoptera; Apidae) based on wing shape

Maxence GERARD¹, Denis MICHEZ¹, Denis FOURNIER², Kevin MAEBE³, Guy SMAGGHE³, Jacobus C. BIESMEIJER⁴, Thibaut DE MEULEMEESTER^{1,4}

⁽¹⁾ Laboratory of Zoology, University of Mons, Place du Parc 20, B-7000 Mons, Belgium. maxence.gerard@umons.ac.be; denis.michez@umons.ac.be; thibaut.demeulemeester@umons.ac.be

⁽²⁾ Evolutionary Biology and Ecology, Université libre de Bruxelles. denis.fournier@ulb.ac.be

⁽³⁾ Department of Crop Protection, Faculty of Bioscience Engineering, Ghent University, Coupure links 653, 9000, Ghent, Belgium. kevin.maebe@ugent.be; guy.smagghe@ugent.be

⁽⁴⁾ Naturalis Biodiversity Center, Darwinweg 2, PoBox 9517, 2300RA Leiden, The Netherlands. koos.biesmeijer@naturalis.nl; thibaut.demeulemeester@naturalis.nl

Corresponding author: T. De Meulemeester, thibaut.demeulemeester@naturalis.nl

Abstract

Gerard, M., Michez D., Fournier D., Smagghe G., Biesmeijer JC., De Meulemeester T.
Discrimination of haploid and diploid males of *Bombus terrestris* (Hymenoptera; Apidae) based on wing shape

Presence of diploid males in bees reflects inbreeding and informs about the health status of a colony or population. Detection of diploid males, and discrimination from haploid males and workers, is, however, limited to molecular diagnostics. Here we present a novel method based on differences in wing shape, e.g. venation patterns in wings. The method is easy to apply and results, for *Bombus terrestris*, in very high discrimination success. Possible applications of the method are discussed.

Keywords: *Bombus*, decline, diploid males, wing shape, geometric morphometrics

Introduction

There is accumulating evidence of recent declines in both wild and domesticated bees (Biesmeijer et al. 2006, Potts et al. 2010, Cameron et al. 2011). Among the potential drivers of these declines are landscape modification and fragmentation, intensive use of agrochemicals, pathogen infections, competition with alien species, climate change, and interactions between all of these (Potts et al. 2010, Winfree 2010). Independent of which driver is responsible, reduced populations experience several threats such as loss of genetic diversity, and risk of inbreeding as a result of non-random mating (Ellis et al. 2006, Davis et al. 2010). These threats are particularly problematic in haplodiploid species such as bees (Zayed and Packer 2005, Zayed 2009). These species have a single locus sex determination system where diploids are females and haploids are males (Whiting 1933, Crozier 1971). However, inbreeding can lead to diploids being homozygous, which develop into males (Duchateau et al. 1994). More than 80 Hymenoptera species produce diploid males (Van Wilgenburg et al. 2006, Darvill et al. 2012), while in some eusocial species (e.g. *Apis mellifera*) diploid male larvae are killed by workers before becoming an adult (Woyke 1963). In bumble bees homozygote diploid larvae may develop into unviable or effectively sterile males.

Production of viable diploid males has a strong negative effect on bumble bees population maintenance by impacting on the fitness of (i) the colonies producing the diploid males; (ii) the queens mating with diploid males. Indeed, after mating with a brother, half of the queen's diploid eggs, which normally develop into females, develop into males (Duchateau et al. 1994). As a consequence, the colony produces only half the normal quantity of workers from the start and thus will remain rather small in size, with low production of new queens. Second, as most bumble bee species are monandrous (even known polyandrous species mate with a frequency close to one; Estoup et al. 1996, Payne et al. 2003, Takahashi et al. 2008) and diploid males produce diploid sperm, queens mating with diploid males produce 100% of sterile triploid offspring leading to the inbred strain having much lower fitness than outbred colonies. In wild populations, this is known as the "diploid male extinction vortex" (Zayed and Packer 2005). In this vortex, populations are reduced, e.g. due to habitat fragmentation, which leads to decreased allelic diversity, increased inbreeding and the production of diploid males so that the extinction risk of the population increases. Nevertheless the haplodiploid system could select negatively the deleterious alleles and balance the costs of inbreeding and low genetic diversity (Schmid-Hempel et al. 2007). Some studies have tried to quantify the presence of diploid males in wild populations. In Japanese *Bombus florilegus*, 28% of the males were diploid (Takahashi et al. 2008), whereas diploid males were also frequent in

fragmented populations of British *Bombus muscorum* (Darvill et al. 2006). Because diploid male production occurs under conditions of severe inbreeding, the presence of diploid males can be used as an indicator for population (or colony) health and can be used to assess the viability of bee populations (Zayed et al. 2004).

Detection of low genetic diversity or increased inbreeding within a population requires specialized, often invasive, and very costly genetic methods, such as flow cytometry or microsatellite analysis (Gadau et al. 2001, Maebé et al. 2013, 2014). Use of morphological, instead of genetic, characters could provide an alternative, but has not been developed till now.

In this study, we aim to develop and test wing morphometric identifiers for bumble bee diploid males. Our study focuses on the bumble bee *Bombus terrestris*, a well-studied and easily-reared bumble bee. Wings are analyzed by geometric morphometrics procedures, which quantify and analyze the overall shape of a structure (Bookstein 1991; Rohlf and Marcus 1993; Zelditch et al. 2004, Adams et al. 2013). Morphometric studies of bees have focused on wing shape and venation because wings are flat, rigid, 2D structures with many homologous landmarks which are diagnostic at multiple taxonomic levels (e.g. Francoy et al. 2008; Michez et al. 2009; De Meulemeester et al. 2012; Dewulf et al. 2014). Our method is cheap, fast, and renders the possibility to assess male ploidy not only of freshly-collected specimens, but also of pin-mounted museum specimens for which biomolecular analysis is often impeded due to inadequate killing or storage.

Materials and Methods

Material and ploidy determination

Three colonies of *Bombus terrestris* obtained from bee breeder Biobest N.V. were artificially reared in a controlled climate room at +28/30°C and 60% relative humidity at the laboratory of Zoology in Mons (UMons, BE). Only one of the colonies produced both queens (n=11) and males (n=21) of first generation. The newly emerged queens and males of this colony were placed in a “flight cage” to force brother-sister mating. These mated queens were used to produce a second generation inbred colonies. During 2 months the mated queens overwintered following the rearing method of Lhomme et al (2013). Hibernated queens were activated with CO₂ narcosis (Roseler 1985) and were placed in small boxes with two workers and a cocoon to maximize the probability of colony initiation (Kwon et al. 2003).

All eleven mated queen of the first generation initiated a colony, producing a total of 62 workers and

41 males of second generation. The degree of ploidy of these males was assessed by flow cytometry using a PA-I flow cytometer (PARTEC®, Partec GmbH, Munster, Germany) For this purpose, heads were cut off and crushed each in 1 ml of a DNA-staining solution containing DAPI as the DNA dye. Processing, cell cycle analysis and quantification of flow cytometric data were performed according to Cournault and Aron (2008).

The total sample of specimen for the analysis included 30 workers, 21 haploid males, and 10 mated-queens of the first generation, and 49 workers, 26 diploid males, and 10 haploid males of the second generation.

Geometric Morphometrics

The bumble bees were killed and the both wings were clipped. The right and left forewings of all 146 specimens were photographed using an Olympus SZH10 microscope coupled with a Nikon D200 camera. Among the 292 wings, 277 were suitable for morphometrics analyses (from 79 workers, 10 queens, 28 haploid males, 22 diploid males). Photographs were input to tps-UTILS 1.56 (Rohlf 2013a) and wing shape was captured by digitizing two-dimensional Cartesian coordinates of 18 landmarks (Fig. 1) on right and symmetrized-left wings with tps-DIG v2.17 (Rohlf 2013b).

The 274 landmark configurations were scaled, translated and rotated against the consensus configuration using the GLS Procrustes superimposition method to remove all non-shape differences and to separate the size and shape components of the form (Rohlf and Slice 1990; Bookstein, 1991). The superimposition was performed using R functions of the package geomorph (Adams and Otárola-Castillo, 2013).

The aligned landmark configurations were projected into the Euclidean space tangent to the curved Kendall's shape space to aid further statistical analyses. The correlation coefficient between the Procrustes distances in the shape space and the Euclidean distances in the tangent space was close to 1 (0.9999). This means that the linear tangent space closely approximates the curved shape space, thereby permitting us to be confident in the variation amplitude of our dataset (Rohlf, 1999). The least-squares regression slope and the correlation coefficient between the two distances were calculated with tps-SMALL v1.25 (Rohlf, 2013c).

Shape discrimination of castes and diploid males

Discrimination of single wings

A between-group PCA was performed to visualize shape variation between four groups defined based on the caste and the degree of ploidy of the specimens: queen, worker, haploid male, diploid male (Fig 2). Compared to traditional PCA, between-group PCA tends to maximize variation between groups by projecting the greatest variance between group means along the first principal component, the second greatest variance on the second component, and so on. Unlike discriminant analyses, scores of the specimens are projected in an Euclidean space that does not affect relations or distances between specimens.

Discrimination among the different castes and between haploid and diploid males was also assessed by linear discriminant analysis (LDA) of the aligned configuration of landmarks. The effectiveness of the LDA for discriminating groups was assessed by the percentages of wings correctly classified to their original group (i.e. hit-ratio, HR) in a leave-one-out cross-validation procedure based on the posterior probabilities of assignment. Given the observed scores of a wing, the posterior probability equals the probability of the wing to belong to one group compared to all others. The wing is consequently assigned to the group for which the posterior probability is the highest (Huberty and Olejnik 2006) (Table 1).

Discrimination of specimens

Assignment of wings in predictive discriminant analyses should not be considered as a unique qualitative identification. Value of the posterior probabilities could be more informative for validating the assignment to a group. Low probabilities (<0.90) refer to a non-supported assignment and should be considered as dubious classification. Identification of the specimens was, therefore, redefined based on posterior probabilities of assignment of both right and left wings of the same specimen. We applied the following rule of thumb for specimen identification. A specimen was assigned to a group if both wings showed high posterior probabilities of assignment (>0.90) for the same group. If one wing showed supported assignment but the second wing showed low probabilities, the specimen was assigned to the supported group. In case of divergent supported assignments, or when right and left wings showed low probabilities both, the identification was stated as dubious, and the specimen was not assigned to any group.

Separating males from females is fairly easy in bumblebees (i.e. males have genitalia when females have sting). Therefore, it is likely that in many cases one already knows the sex of a specimen and only the ploidy of the male specimen needs to be assessed. Given that wing shapes of diploid males are closer to the wing shape of workers than to the wing shape of haploid males (Fig 1, Table 1), a

male was identified as diploid when wings were assigned to either diploid males or workers (Table 2).

Statistical analyses were performed using the software R version 3.0.2 (2013, <http://www.R-project.org/>).

3. Results

The four groups defined in our analyses (i.e. queens, workers, haploid males, and diploid males) are separated in the between-group PCA, even though clear overlap is observed between workers and males (Fig. 2). In these analyses, all queens cluster together and are well separated from the other groups.

The same four groups are well separated from each other in the LDA. If we regard the assignment by the cross validation, disregarding the level of support for the assignment, 93.1% of wings are correctly assigned to their group. The 19 queen wings show a HR of 100%. Five of the 156 worker wings are misclassified, all being assigned to diploid males (HR 96.8%). Among 56 haploid male wings, only one is misclassified as diploid male wing, and four as worker wing (HR 91.1%). Among 44 diploid male wings, one is misclassified as a haploid male and eight are misclassified as workers (HR of 79.5%).

If, on the other hand, we only consider well-supported assignments (i.e. with posterior probability >0.90; this is the case for 88% of all wings), we see that 97.1% of the wings are classified correctly (Table 1). Having prior knowledge of the sex of the specimen, i.e. wing is known from a male, the hit ratio for assignment to the correct ploidy is 97.3% (36 of 37) for diploid male wings and 97.7% (43 of 44) for haploid male wings (Table 1).

At specimen level, a well-supported identification is given for 45 of the 50 males. In all these cases the correct ploidy was assigned (Table 2). The LDA of wing shape appears to be a clear and accurate method for discrimination between haploid and diploid males. All the queens and 76 of the 78 workers have a well-supported identification and are assigned to the correct level of ploidy.

4. Discussion

Haploid and diploid male production in inbred colonies

We managed to produce diploid males on our laboratory colonies, in which approximately half of the

first brood were males. The majority of those males was diploid (72.22%) but there was a significant number of haploid males. Even if our results are based on one colony only, they confirm similar study based on colonies reared in laboratory condition (Duchateau et al. 1994). This is rarely the case in wild colonies, however, Roseler (1985) stated that the CO₂ narcosis can induce the laying of unfertilized eggs by queens during their first brood, which may have been the case in our breeding operation.

Morphometric identifiers for haploid and diploid males

Geometric morphometrics have been used previously to discriminate bees at different taxonomic levels (e.g., Aytekin et al., 2007, Francoy et al., 2008, Michez et al., 2009, De Meulemeester et al., 2012). Here, we show that bumble bee castes and diploid males can also be discriminated based on their wing shape with a less than 5% error margin. We argue that a morphometric identifier could be developed to provide a fast, accurate, and cost-free evaluation of the degree of ploidy of bumble bee males, overcoming the impediments incurred by biomolecular analyses.

The method we describe here may be of use to the monitoring of the health and status of wild populations as well as to quality control of breeding stocks used for commercial rearing. Given that a high level of diploid males is an indication of a low level of allelic diversity, their proportion in a population may be an indication of the genetic health and/or recent trends of wild pollinator populations (Zayed et al. 2004). Monitoring bee populations is pivotal and is becoming increasingly crucial for the evaluation of national and international targets in nature conservation and for biodiversity monitoring or ecosystem service assessments (e.g. crop pollination). Till now, most assessments of pollinator change have had to rely on species richness or distribution change estimates derived from indirect evidence (e.g. opportunistic occurrence records; Biesmeijer et al. 2006, Carvalheiro et al. 2013). Development of a morphometric identifier will provide a novel tool to rapidly evaluate both the state of populations and the impact of mitigation measures at a low cost as compared to the expertise needed and costs associated with assessments based on DNA-analyses. In addition, past population trends may be inferred from analysis of museum collection specimens, for which male ploidy assessment can now be achieved non-invasively.

Furthermore, a recent study highlighted the production of diploid males in colonies from mass production facilities, indicating some level of inbreeding in industrial breeding (Maebe et al., 2014). An early morphological detection of diploid males could improve the production of the bumble bee commercial breeding.

In the near future, the morphometric identifiers can be turned into an automated or semi-automated identification tools suitable for field or museum studies. Finally, morphology-based analysis will also facilitate future citizen-science bee monitoring schemes, e.g. involving smartphone or tablet-based image analysis and data recording.

Acknowledgments

We wish to thank Dr. Felix Wäckers and Biobest N.V for providing the colonies used in this study. T. De Meulemeester and J.C. Biesmeijer' were supported in part by 'STEP – Status and Trends of European Pollinators' (EC FP7 grant no. 244090) and by SUPER-B COST ACTION FA 1305. The study was also funded by an internal Applied-Oriented Research Grant from Naturalis Biodiversity Center. We are grateful to Collin Molenaar for help in data collection and Prof. Menno Schilthuizen for his valuable comments.

References

- Adams, D.C., Rohlf, F.J. & Slice, D.E. (2004) Geometric morphometrics: ten years of progress following the 'revolution'. *Ital. J. Zool.* **71**(1), 5-16.
- Adams, D.C., Otárola-Castillo, E. (2013) Geomorph: An R package for the collection and analysis of geometric morphometric shape data. *Method Ecol. Evol.* **4**(4) 393-399.
- Aytekin, A. M., Terzo, M., Rasmont, P., Cagatay, N. (2007). Landmark based geometric analysis of wing shape in *Sibiricobombus* Vogt (Hymenoptera : Apidae : *Bombus* Latreille). *Ann. Soc. Entomol. Fr.* **43**, 95 - 102
- Biesmeijer, J.C., Roberts, S.P.M., Reemer, M., Ohlemüller, R., Edwards, M., et al. (2006) Parallel declines in pollinators and insect-pollinated plants in Britain and the Netherlands. *Science* **313**, 351 – 354.
- Bookstein, F.L. (1991) *Morphometric Tools for Landmark Data: Geometry and Biology*. Cambridge, Cambridge University Press.
- Cameron, A.S., Lozier, J.D., Strange, J.P., Koch, J.B., Cordes, N., Solter, L.F., Griswold, T.L. (2011) Patterns of widespread decline in North American bumble bees. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**, 662 – 667.
- Carvalho LG, Kunin WE, Keil P, Aguirre-Gutierrez J, Ellis WN, Fox R, Groom Q, Hennekens S, Van Landuyt W, Maes D, Van de Meutter F, Michez D, Rasmont P, Ode B, Potts SG, Reemer M, Roberts SPM, Schamin J, Wallis DeVries MF, Biesmeijer JC (2013) Species richness declines and biotic homogenisation have slowed down for NW-European pollinators and plants. *Ecological Letters* **16** 870-878.
- Cournault L., Aron S. (2008). Rapid determination of sperm number in ant queens by flow cytometry. *Insectes soc.* **55**, 283-287.
- Crozier, R.H. (1971) Heterozygosity of sex determination in haplodiploidy. *Am. Naturalist* **105**, 399 – 412.
- Crozier, R. H. (1971) Heterozygosity of sex determination in haplodiploidy. *Am. Naturalist* **105**, 399 - 412
- Darvill, B., Lepais, O., Woodall, L.C., Goulson, D. (2012) Triploid bumblebees indicate a direct cost of inbreeding in fragmented populations. *Mol. Ecol.* **21**, 3988 – 3995.
- Davis, E.S., Murray, T.E., Fitzpatrick, N., Brown, M.J.F., Paxton, R.J. (2010) Landscape effects on

- extremely fragmented populations of a rare solitary bee, *Colletes floralis*. *Mol. Ecol.* **19**, 4922 – 4935.
- De Meulemeester, T., Michez, D., Aytekin, A.M., Danforth, B.N. (2012) Taxonomic affinity of halictid bee fossils (Hymenoptera: Anthophila) based on geometric morphometrics analyses of wing shape. *J. Syst. Paleontol.* **10** (4) 755 – 764
- Dewulf A, De Meulemeester T, Dehon M, Engel MS, Michez D, 2014. A new interpretation of the bee fossil *Melitta willardi* Cockerell (Hymenoptera: 'Melittidae') based on geometric morphometrics of the wing. *Zookeys*, in press.
- Duchateau, M.J., Hoshiba, H., Velthuis, H.H.W. (1994) Diploid males in the bumble bee *Bombus terrestris*. Sex determination, sex alleles and viability. *Entomol. Exp. Appl.* **71**, 263 – 269.
- Ellis, J.S., Knight, M.E., Darvill, B., Goulson, D. (2006) Extremely low effective population sizes, genetic structuring and reduced genetic diversity in a threatened bumblebee species, *Bombus sylvarum*. *Mol. Ecol.* **15**, 4375 – 4386
- Estoup, A., Solignac, M., Cornuet, J.M., Goudet, J., Scholl, A. (1996) Genetic differentiation of continental and island populations of *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae) in Europe. *Mol. Ecol.* **5**, 19 – 31.
- Francoy, T.M., Wittmann, D., Drauschke, M., Muller, S., Steinhage, V., Bezerra Laure, M.A.F., De Jong, D., Gonçalves, L.S. (2008) Identification of 72 Africanized honey bees through wing morphometrics: two fast and efficient procedures. *Apidologie* **39**, 488 – 494.
- Gadau J, Gerloff CU, Krüger N, Chan H, Schmid-Hempel P, Wille A, Page RE (2001) A linkage analysis of sex determination in *Bombus terrestris* (L.) (Hymenoptera: Apidae). *Heredity* **87** (2): 234-242.
- Huberty, C.J., Olejnik, S. (2006) Applied MANOVA and Discriminant Analysis. Second Edition. New Jersey.
- Kwon, Y.J., Saeed, S., Duchateau, M.J. (2003) Stimulation of colony initiation and colony development in *Bombus terrestris* by adding a male pupa: The influence of age and orientation. *Apidologie* **34**, 429 – 437.
- Lhomme, P., Sramkova, A., Kreuter, K., Lecocq, T., Rasmont, P., Ayasse, M. (2013) A method for year-round rearing of cuckoo bumblebees (Hymenoptera: Apoidea: *Bombus* subgenus *Psithyrus*). *Ann. Soc. Entomol. Fr.* **49** (1), 117-125.
- Maebe, K., Meeus, I., Maharramov, J., Grootaert, P., Rasmont, P., Smagghe, G. (2013) Microsatellite analysis in museum samples reveals inbreeding before the regression of *Bombus veteranus*. *Apidologie* **44**, 188 - 197
- Maebe, K., Meeus I., Ganne, M., Wackers, F., Smagghe, G. (2014) Scientific note on microsatellite DNA analyses revealing diploid and haploid drones in bumblebee mass breeding. *Apidologie* **45**, 189 – 191
- Michener, C. D. (2007) The bees of the world, John Hopkins University Press, Baltimore
- Michez, D., De Meulemeester, T., Nel, A., Rasmont, P. & Patiny S. (2009) New fossil evidence of the early diversification of bees: *Paleohabropoda oudardi* from the French Paleocene (Hymenoptera, Apidae, Anthophorini). *Zool. Scr.* **38**, 171-181.
- Payne, C. M., Lavery, T. M., Lachance, M. A. (2003) The frequency of multiple paternity in bumble bee (*Bombus*) colonies based on microsatellite DNA at the B10 locus. *Insec. Soc.* **50**, 375 – 378.
- Potts, S.G., Biesmeijer, J.C., Kremen, C., Neumann, P., Schweiger, O., Kunin, W.E. (2010) Global pollinator declines: Trends, impacts and drivers. *Trends Ecol. Evol.* **25**, 345 – 353.
- R Development Core Team. (2013) R: A language and environment for statistical computing, version 3.0.2, ISBN 3-900051-07-0. *R Foundation for Statistical Computing*. Vienna, Austria.
- Rohlf, F. J. (1999) Shape statistics: Procrustes superimpositions and tangent spaces. *J. Classif.* **16**(2) 197-223.
- Rohlf, F. J. (2013a) tpsUtil program, version 1.56. Department of Ecology & Evolution, State University of New York, Stony Brook.

- Rohlf, F. J. (2013b) tpsDig, version 2.17. Department of Ecology and Evolution, State University of New York, Stony Brook.
- Rohlf, F. J. (2013c) tps-SMALL, version 1.25. Department of Ecology and Evolution, State University of New York, Stony Brook.
- Rohlf, F. J., Marcus, L. F. (1993) A revolution morphometrics. Trends Ecol. Evol. **8**(4), 129-132
- Rohlf, F.J., Slice, D. (1990) Extensions of the Procrustes method for the optimal superimposition of landmarks. Syst. Zool. **39**, 40–59.
- Roseler, P.F. (1985) A technique for year-round rearing of *Bombus terrestris* (Apidae, Bombini). Colonies in captivity. Apidologie **16**, 165 – 170.
- Schmid-Hempel P., Schmid-Hempel R., Brunner P.C., Seeman O.D., Allen G.R. (2007) Invasion success of the bumblebee, *Bombus terrestris*, despite a drastic genetic bottleneck. Heredity **99**, 414-422.
- Takahashi, J., Ayabe, T., Mitsuhashi, M., Shimizu, I., Ono, M. (2008) Diploid male production in a rare and locally distributed bumblebee, *Bombus florilegus*. Insec. soc. **55**, 43 – 50.
- Van Wilgenburg, E., Driessen, G., Beukeboom, L. (2006) Single locus complementary sex determination in Hymenoptera: an unintelligent design? Frontiers Zool. **3**, 1 – 15.
- Whiting, P.W. (1933) Selective fertilization and sex-determination in Hymenoptera. Science **78**, 537 – 538.
- Winfree, R. (2010) The conservation and restoration of wild bees. Ann. N.Y. Acad. Sci. **1195**, 169 – 197.
- Woyke J. (1963) Drone larvae from fertilized eggs of the honeybee. J. Api. Res. **2**, 19 – 24.
- Zayed, A. (2009) Bee genetics and conservation. Apidologie **40**, 237 – 262.
- Zayed, A., Packer, L. (2005) Complementary sex determination substantially increases extinction proneness of haplodiploid populations. Proc. Natl. Acad. Sci.U.S.A. **102**:10742 – 10746.
- Zayed, A, Roubik D.W., Packer, L. (2004) Use of diploid male frequency data as an indicator of pollinator decline. Proc. R. Soc. B. **271**, S9 – S12.
- Zelditch, M.L., Swiderski, D.L., Sheets, H.D., Fink, W.L. (2004) “Geometric Morphometrics for biologists: a primer”. Elsevier Academic Press, San Diego.

Figures captions

Fig. 1 Wing of a *Bombus terrestris* male with 18 landmarks

Fig. 2 Ordination of the 4 groups of *Bombus terrestris* along the first two axes of the between-group PCA. open circles: haploid males; black circles: diploid males; triangles: workers; diamonds: queens; stars: group means.

Table 1 Wing identification based on leave-1 one-out cross-validation procedure in the LDA. Only well-supported assignments were used (n= 241). Original groups are along the rows, predicted groups are along the columns. hM: haploid males; dM: diploid males; W: workers; Q: queens

	hM	dM	W	Q
hM	43	1	-	-
dM	1	33	3	-
W	-	2	140	-
Q	-	-	-	19

Table 2 Specimen identification based on leave-1 one-out cross-validation procedure in the LDA (n= 137). Original groups are along the rows, predicted ploidy along the columns. Males were identified as diploid when wings were assigned to either diploid males or workers. hM: haploid males; dM: diploid males; W: workers; Q: queens; NA: dubious ploidy identification

	haploid	diploid	NA
hM	24	0	4
dM	0	21	1
W	0	76	2
Q	0	9	0

Figure 1.

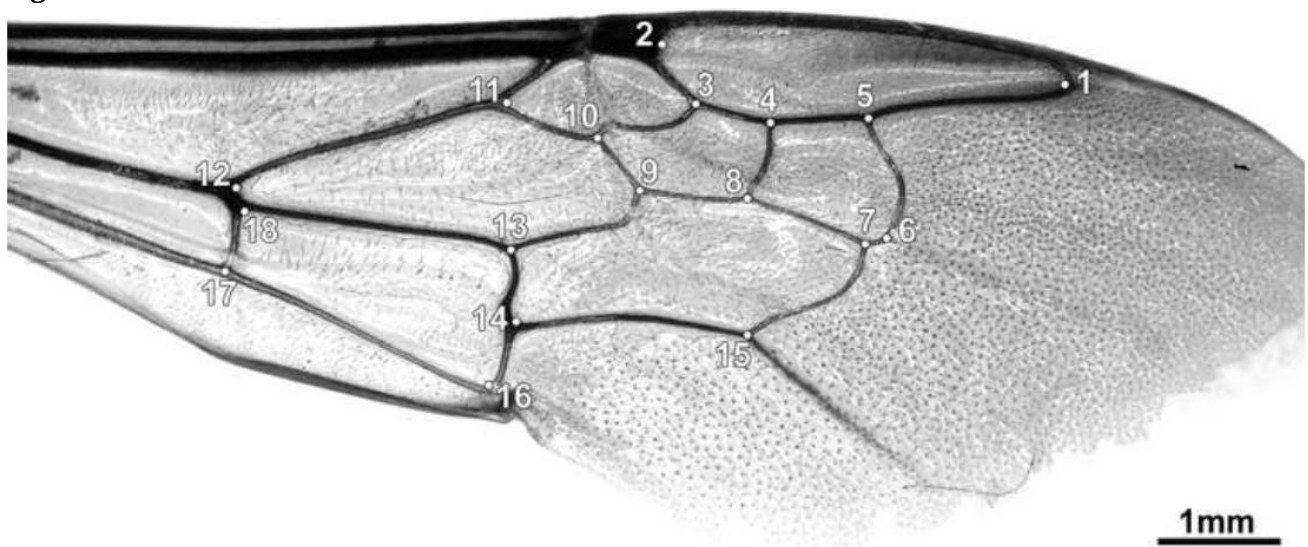


Figure 2.

