Les Actes du BRG, 4 (2003) 79-100
© BRG, 2003

Article original

Diversité génétique, introgressions mitochondriales et nucléaires dans une population d'abeilles des Landes de Gascogne

Claire PERRIER[(1)], James STRANGE[(2)], Oliver LANGELLA[(1)], Walter Steve SHEPPARD[(2)] & Lionel GARNERY[(1)*]

[(1)] Laboratoire Populations, Génétique, Évolution, CNRS, Bât 13, Avenue de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette, France
[(2)] Département d'Entomologie, Université de l'État de Washington, Pullman WA 99164-8362, États-Unis

Abstract - Genetic diversity, nuclear and mitochondrial introgressions in a honey bee population in southwest France. A low level of genetic diversity is observed in the western Mediterranean honey bee lineage when compared to the other lineages of honey bees. Despite this fact, an ecotype particularly well adapted to the locally abundant, late blooming plant, common heather (*Calluna vulgaris*), has been described in the Landes de Gascogne region of France. Modern beekeeping practices, particularly honey bee stock importations and migratory beekeeping practices, represent a threat due to the genetic introgressions that they can generate. In order to preserve the genetic diversity of the Landes population an *in situ* genetic conservatory has been planned. The establishment of such a sanctuary necessitates first an accurate knowledge about the genetic structure of the population. The present study combines population genetics studies and multivariate analyses. This approach allows to estimate the levels and to characterize the origins of mitochondrial and nuclear genetic introgressions. Although the results suggest that levels of introgressions are relatively high at the population level, a geographical substructuration seems to indicate the presence of an isolation mechanism between the imported bee stocks and the local population. The result of this mechanism is a low level of gene flow between the two populations of bees. This is an important point regarding the establishment of a conservatory and, if confirmed, this result will greatly facilitate the methods to conserve the locally adapted ecotype. Although the reproductive behavior of the local bees limits the gene flow from the imported bees, it seems judicious to create the genetic conservatory in an area showing the lowest level of introgression. Our results indicate that this should be done in the area of Moustey, taking advantage of the large effective population of pure local bees managed by professional beekeepers.

[*] Correspondance et tirés à part : garnery@pge.cnrs-gif.fr

***Apis mellifera* / mitochondrial DNA / microsatellites loci / genetic introgressions / genetic conservatory**

Résumé - La lignée des abeilles ouest-méditerranéennes montre un niveau de diversité très inférieur aux autres lignées. Cependant, un écotype, particulièrement bien adapté à la floraison automnale de la bruyère callune, a été décrit en France, dans la région des Landes de Gascogne. Afin de préserver la diversité génétique de la population landaise menacée par les pratiques apicoles modernes, la mise en place d'un conservatoire *in situ* d'abeilles a été envisagée. La création d'un tel sanctuaire a nécéssité une connaissance précise de la diversité génétique de cette population. Les niveaux d'introgression observés sont relativement importants à l'échelle de la population. Cependant, l'analyse de la structure génétique montre l'existence de deux groupes génétiques distincts qui semble indiquer une subdivision de la population accompagnée d'un faible niveau de flux géniques entre abeilles importées et locales. Si cette observation devait se confirmer, ce résultat devrait grandement simplifier la méthodologie à employer pour la conservation des abeilles locales, donc de la forme écotypique. Il paraît tout de même judicieux de créer le conservatoire génétique dans une zone montrant les niveaux d'introgression les plus bas. Ainsi, la création du sanctuaire est recommandée dans la région de Moustey, bénéficiant de l'effectif important de colonies d'abeilles locales des apiculteurs professionnels.

***Apis mellifera* / ADN mitochondrial / locus microsatellites / introgressions génétiques / conservatoire génétique**

1. INTRODUCTION

L'abeille mellifère (*Apis mellifera*) est un des rares insectes à faire l'objet d'élevages en tant qu'animal de production. Cette espèce a une valeur économique importante grâce aux produits de la ruche mais surtout par sa contribution à la pollinisation des plantes cultivées. Dans certaines régions, l'abeille est devenue le principal pollinisateur de la flore sauvage du fait de son maintien par l'apiculture et contribue de façon inestimable au maintien de la richesse et de la stabilité des écosystèmes.

Le pouvoir d'adaptation de l'abeille domestique, *Apis mellifera*, à des conditions écologiques très variées a favorisé la mise en place d'une importante diversité biologique chez cette espèce. Au sein de son aire native de répartition (Europe, Afrique, Proche-Orient), cette espèce s'est diversifiée et différenciée en 25 sous-espèces ou races géographiques qui montrent des caractéristiques écologiques et comportementales qui leur sont propres[34], [39]. Les études biométriques [34], [35] ont permis de classer ces sous-espèces en quatre lignées évolutives nommées M, C, A, et O. Ces lignées ont une répartition géographique fortement structurée, et sont situées respectivement dans les régions ouest-méditerranéenne, nord-méditerranéenne, en Afrique et dans le Caucase. Depuis les travaux de Ruttner, l'utilisation de

divers marqueurs moléculaires a permis de confirmer dans ses grandes lignes cette classification [1], [6], [9], [12], [13], [15], [16], [17], [19], [20], [25], [38], [41], [42]. Ces études moléculaires ont notamment mis en évidence que la diversité génétique de la lignée ouest-méditerranéenne (lignée M) est relativement faible comparée aux autres lignées [6], [9], [11], [20]. Malgré la faible diversité génétique observée dans la lignée M, un écotype particulièrement bien adapté à la floraison automnale de la bruyère callune (*Calluna vulgaris*) a été décrit en 1966 en France, dans la région des Landes de Gascogne. Les surfaces de couvain de l'écotype présentent une ascension très lente au printemps, et l'élevage se poursuit activement jusqu'en octobre, alors que les abeilles d'autres régions montrent un développement du couvain plus précoce mais qui s'arrête plus tôt en saison [23], [24]. Il semble donc que l'apiculteur dispose, avec l'abeille landaise, d'un patrimoine génétique de choix pour tirer le meilleur parti des floraisons du sous-bois, en particulier grâce à la production du miel de callune qui trouve des débouchés importants sur le marché nord-européen, et à des prix très rémunérateurs [21].

Les activités humaines ont été responsables de la dispersion de l'abeille mellifère en dehors de son aire naturelle, notamment en Amérique et en Océanie [22], [29], [37]. De plus, le développement de certaines pratiques apicoles comme la transhumance des ruches et l'importation d'abeilles allochtones conduisent inéluctablement à des introgressions génétiques qui se sont montrées très variables d'une région à une autre [19], [20]. Ainsi, des niveaux trop importants d'introgression peuvent avoir comme conséquence l'élimination du particularisme des abeilles locales mieux adaptées aux conditions naturelles. Certaines races d'abeilles, telles que les races *ligustica* et *caucasica*, et la lignée synthétique Buckfast (hybride multiple de base C/M d'origine maternelle C) sont très appréciées pour leur rendement en miel et leur douceur [4], [14], [19], [20]. Cependant de nombreuses observations tendent à montrer que leurs hybrides avec la race locale sont souvent plus agressives. Dans les Landes, des études préliminaires [5], [19], [20] ont montré de faibles niveaux d'introgression malgré une transhumance importante de ruches. Cette observation peut être expliquée par le fait que les colonies allochtones sont présentes dans cette région pendant la floraison de la bruyère callune en dehors de la période de reproduction.

Étant donné la faible variabilité observée au sein de la lignée ouest-méditerranéenne et la menace d'introgressions importantes liée aux pratiques de l'apiculture intensive, des mesures de conservation sont actuellement envisagées dans les Landes de Gascogne afin de préserver, d'une part la sous-espèce endémique *(A. m. mellifera)*, mais également la forme écotypique. Il est ainsi question, de mettre en place une zone protégée *in situ*, ceci en collaboration avec les apiculteurs locaux et le Parc Naturel Régional des Landes de Gascogne. La création d'un tel sanctuaire nécessite tout d'abord une connais-

sance précise des impacts liés à la présence d'apiculteurs professionnels susceptibles de travailler avec des abeilles étrangères.

Le but de ce travail consiste donc dans un premier temps à définir la structure génétique de la population d'abeilles landaises et à estimer les niveaux d'introgressions au sein des ruchers, puis, dans un second temps, à localiser la zone la moins touchée par ces introgressions, dans le but d'y placer le conservatoire génétique.

2. MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1. Échantillonnage

Dans la région où a été montrée la présence de l'écotype, chaque rucher répertorié situé dans une surface de 20 kilomètres sur 40 kilomètres, a fait l'objet d'un échantillonnage. Une ouvrière a été prélevée dans toutes les colonies de chacun des ruchers et a été conservée dans un tube contenant de l'éthanol absolu. L'échantillonnage ainsi réalisé porte sur un total de 1 082 colonies, regroupées en 36 ruchers appartenant à 14 apiculteurs différents (figure 1). L'analyse des données a été effectuée en considérant des populations de références, telles que, Valenciennes (*A. m. mellifera*, 24 colonies) pour la lignée M, Chalkidiki (*A. m. macedonica*, 30 colonies), Forli (*A. m. ligustica*, 30 colonies) et Debrecen (*A. m. carnica*, 24 colonies) pour la lignée C, Tbilissi (*A. m. caucasica*, 25 colonies) et Erevan (*A. m. caucasica*, 17 colonies) pour la lignée O (données non publiées) et Al-Hoceima (*A. m. major*, 28 colonies) pour lignée A. Les analyses statistiques ont donc porté sur un total de 1 260 colonies.

2.2. Analyses moléculaires

L'ADN total a été extrait à partir de la tête de chacun des individus, selon le protocole rapide d'utilisation du Chelex [10]. La région intergénique COI-COII de l'ADN mitochondrial (ADNmt) a été étudiée selon le protocole décrit par Garnery *et al.* [17]. Le génotype multilocus de chaque individu de l'échantillon landais a été déterminé à partir de six locus microsatellites. Les conditions d'utilisation de quatre de ces locus (A88, A8, A113, Ap43) ont déjà été décrits [9], [11], [20]. Les locus Ap55 et Ap81 sont amplifiés ensemble en utilisant une température d'hybridation de 60 °C et une concentration finale de $MgCl_2$ de 1mM.

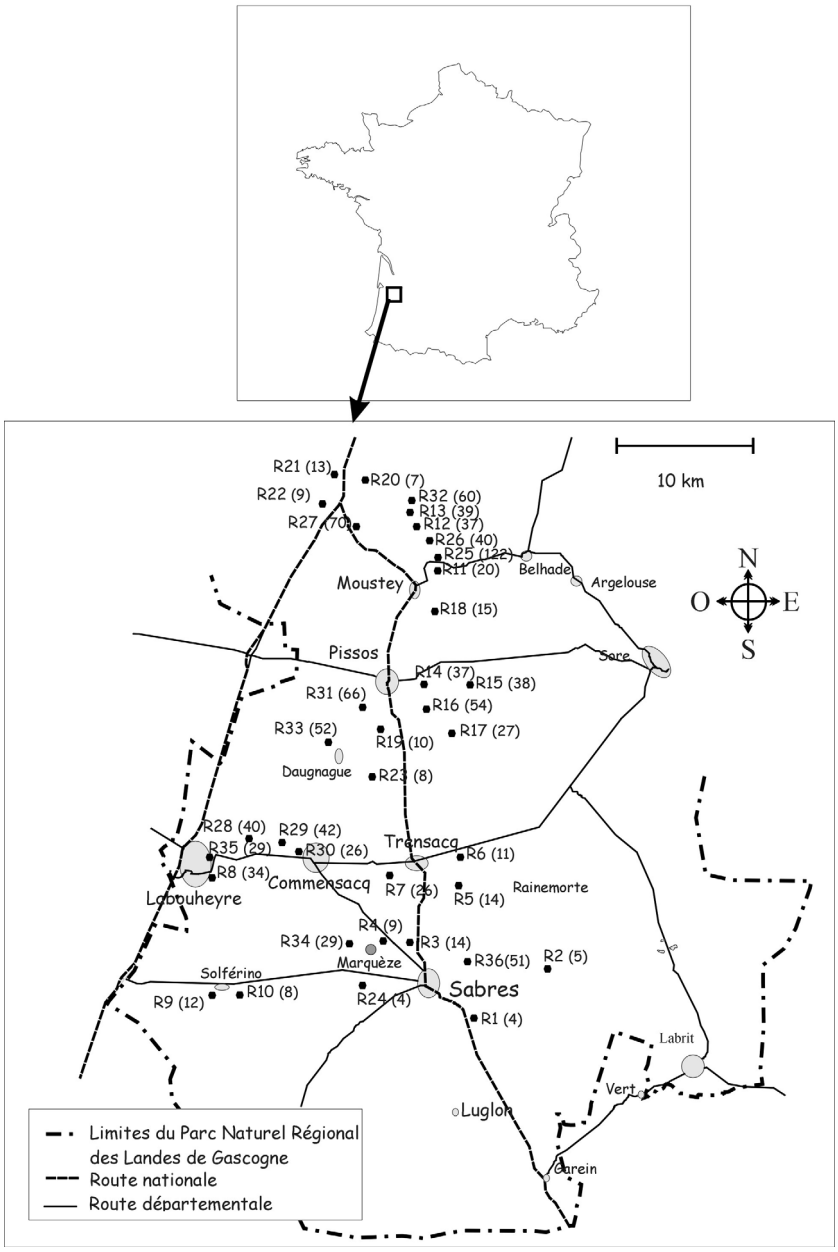

Figure 1 : Carte de l'échantillonnage réalisé pour l'étude. Chaque rucher est noté R suivi de son numéro. Le nombre de colonies pour chacun des ruchers est indiqué entre parenthèses.

Les séquences des amorces des locus Ap55 et Ap81 sont respectivement Ap55-1 5'GATCACTTCGTTTCAACCGT3', Ap55-2 5'-CATTCGGTATGGTACGACCT-3', Ap81-1 5'-GCATCGTCGAGGCGTTGA-3' et Ap81-2 5'-GAAAAGTATTCCGCCGAGCA-3'. Ces loci sont considérés comme particulièrement discriminant entre les lignées M et C [20]. Chacune des amplifications par PCR des locus microsatellites a été réalisée dans un volume de 10 µL. Le protocole d'amplification de ces locus utilise les conditions générales décrites par Estoup *et al.* [9], modifiées par Garnery *et al.* [20].

2.3. Traitements statistiques des données

Les estimateurs non-biaisés de la diversité haplotypique de chaque rucher, et des niveaux d'hétérozygotie pour les locus microsatellites ont été calculés respectivement à l'aide des formules de Nei & Tajima [28] et Nei [27]. Les tests exacts, pour l'équilibre de Hardy-Weinberg et les déséquilibres de liaison ont été réalisés à l'aide du programme GENEPOP (version 3) [32].

Les distances génétiques, qu'elles concernent les ruchers ou les individus, ont été calculées à l'aide du logiciel POPULATIONS (version 1.2.21, Langella, 1999). Les distances génétiques entre les différents ruchers ont été calculées selon la méthode de Cavalli-Sforza et Edwards [2] qui semble constituer avec la distance D_A de Nei, la meilleure estimation de distance génétique pour les études populationnelles [43]. Les distances génétiques entre les individus correspondent à des distances DAS (*Shared Allele Distance*) [3]. Les relations « phylogénétiques » entre les ruchers ont été établies grâce au logiciel POPULATIONS, selon l'algorithme du *Neighbor-Joining* [36]. La visualisation de l'arbre phylogénétique a été réalisée grâce au logiciel TREEPLOT (version 0.6, Langella, 2001).

Les analyses en coordonnées principales (ATD ou analyses de tableaux de distances) ont été réalisées sur les matrices de distances inter-ruchers et inter-individuelles en utilisant le programme NUEES (version 0,8, Langella 2001). La visualisation des projections des individus a été faite à l'aide du logiciel graphique XGOBI (version 1.1).

Le classement des colonies par rapport aux populations de référence a été obtenu à l'aide du logiciel GENECLASS (version 1.0.02)[7]. Ce programme permet d'affecter les colonies à des populations de références en calculant des probabilités d'appartenance de chaque individu à un échantillon fondées soit sur la méthode fréquentielle [30], soit sur la méthode Bayesienne, ou bien sur des distances génétiques DAS [3].

3. RÉSULTATS

3.1. Distribution des haplotypes mitochondriaux

L'identification des profils de restriction a révélé l'existence de seize haplotypes mitochondriaux comprenant: deux haplotypes africains (lignée A), trois nord-méditerranéens (lignée C) et onze ouest-méditerranéens (lignée M). Les profils électrophorétiques des mitotypes M31, M32, M33, M34 et M35 n'avaient jamais été observés, et sont décrits ici pour la première fois (figure 2).

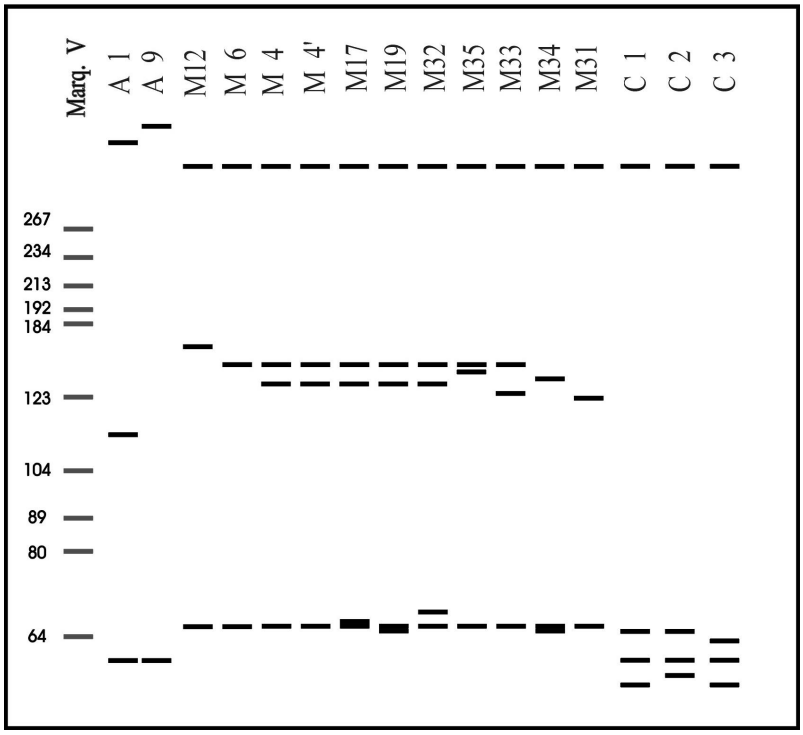

Figure 2 : Schéma synthétique des 16 profils de restriction observés à l'aide du test mitochondrial de la région intergénique COI-COII. À gauche, est indiqué le marqueur de taille de référence. Les profils sont classés selon leur appartenance à une des lignées évolutives A, M et C.

La répartition des haplotypes pour chaque rucher est indiquée dans le tableau I. L'haplotype M4 est de loin le plus fréquent dans la population. L'haplotype qui arrive au second rang est l'haplotype C1.

Tableau I : Nombre de colonies trouvées pour chacun des haplotypes mitochondriaux des 36 ruchers de la population landaise. Le nombre de colonies (N) par rucher (Ruc.) est indiqué dans la deuxième colonne et le numéro de l'apiculteur est indiqué dans la dernière colonne (Api.)

Ruc.	N	A 1	A 9	M 6	M 4	M 4'	M 12	M 17	M 19	M 31	M 32	M 33	M 34	M 35	C 1	C 2	C 3	Api.
1	4				4													1
2	5				5													2
3	14			2	8	2			1	1								3
4	9				7									2				3
5	14			2	11	1												4
6	11			1	7	3												4
7	26			1	19	6												4
8	34				1										29		4	5
9	12				12													6
10	8				8													6
11	20			1	16				1			1			1			7
12	37			1	30				5					1				8
13	39				33	1									4		1	8
14	37			1	22	11	1		1		1							9
15	38		2		25	3	3		3		2							9
16	54			4	36	6	2		4						1	1		9
17	27				22	2	1		2									10
18	15			1	10		1		1						2			10
19	10				9			1										10
20	7				6		1											11
21	13				11				1						1			8
22	9				8				1									11
23	8				5	1			1								1	12
24	4				4													13
25	122		1	4	89	14	6	1	5		1						1	9
26	40			1	29	8			1		1							9
27	70			3	59				4					1	3			8
28	40														39		1	5
29	42														37		5	5
30	26				1										15		10	5
31	66			1	22	3			1				1		24	1	13	14
32	60			2	51	5			2									11
33	52	1			48				1						1		1	8
34	29														26		3	5
35	29	1			3										18		7	5
36	51														45		6	5
Total	1082	2	3	25	621	66	15	2	35	1	5	1	1	4	246	2	53	

3.2. Diversités haplotypique et nucléaire de la population

La diversité haplotypique au sein de la population landaise est très variable en fonction des ruchers (tableau II). La diversité la plus faible (0,000) est observée au sein des ruchers 1, 2, 9, 10 et 24. Le rucher 31 est caractérisé par la diversité haplotypique la plus élevée (0,726). Les hétérozygoties de chaque rucher ont été déterminées pour chaque locus microsatellite, à partir des fréquences alléliques. L'hétérozygotie moyenne de chaque rucher pour l'ensemble des six locus est comprise entre 0,211 et 0,664 (tableau II).

Tableau II : Diversités haplotypiques mitochondriales moyennes (H. D.) et hétérozygoties moyennes (H. exp.) des locus microsatellites, observées dans chacun des ruchers.

Rucher	N	H. D.	H. exp.	Rucher	N	H. D.	H. exp.
1	4	0,000	0,303	19	10	0,200	0,376
2	5	0,000	0,215	20	7	0,286	0,211
3	14	0,670	0,290	21	13	0,295	0,284
4	9	0,389	0,377	22	9	0,222	0,381
5	14	0,385	0,257	23	8	0,643	0,485
6	11	0,564	0,239	24	4	0,000	0,274
7	26	0,428	0,279	25	122	0,453	0,337
8	34	0,266	0,601	26	40	0,446	0,339
9	12	0,000	0,268	27	70	0,287	0,311
10	8	0,000	0,350	28	40	0,050	0,623
11	20	0,368	0,303	29	42	0,215	0,627
12	37	0,332	0,304	30	26	0,538	0,612
13	39	0,279	0,290	31	66	0,726	0,556
14	37	0,571	0,371	32	60	0,273	0,360
15	38	0,558	0,309	33	52	0,149	0,296
16	54	0,540	0,322	34	29	0,192	0,625
17	7	0,336	0,293	35	29	0,564	0,664
18	15	0,562	0,272	36	51	0,212	0,491

La population analysée dans sa globalité ne semble pas se comporter de manière panmictique, (test exact de Fisher sur tous les locus : $p < 10^{-5}$). L'équilibre de Hardy-Weinberg a également été testé indépendamment pour les 36 ruchers. La robustesse du test a été augmentée en appliquant la correction de Bonferroni. Les hétérozygoties observées ne sont pas significativement différentes des hétérozygoties espérées, et tous les ruchers pris individuellement sont à l'équilibre de Hardy-Weinberg, à l'exception du rucher 31 ($p < 10^{-5}$).

Les tests réalisés sur l'ensemble des ruchers considérés comme appartenant à la même population montrent que toutes les paires de locus sont en déséquilibre de liaison sans exception ($0{,}010 > p > 10^{-5}$). Seuls 8 déséquilibres de liaisons ont été détectés dans les 36 ruchers testés individuellement.

3.3. Relations entre ruchers et populations de références

Les relations phylogénétiques entre les ruchers et les populations de références sont présentées sur la figure 3. Il apparaît clairement qu'aucun des ruchers analysés n'est situé à proximité des populations de références des lignées évolutives A, C ou O. La plupart des ruchers landais se branchent à proximité de la population de référence de la lignée M (Valenciennes). Les ruchers 23 et 31 apparaissent à la base de ce rameau et semblent donc se différencier légèrement d'un groupe cohérent M. La souche Buckfast de référence, testée ici pour la première fois, se branche clairement en position intermédiaire entre les lignées M, A, C et O. Cette souche semble plus proche des lignées C et O que des lignées M et A. Les ruchers 8, 28, 29, 30, 34, 35, et 36 sont clairement branchés avec cette population.

Les projections selon les trois premiers axes de l'analyse en coordonnées principales, menée sur les distances inter-ruchers, permettent de visualiser la position de chaque rucher par rapport aux populations de références des quatre lignées évolutives (figure 4). Le premier axe, qui absorbe 61,93 % de la variabilité totale, sépare la population de référence de la lignée M des autres populations de référence. La plupart des ruchers landais se regroupent autour de la population Valenciennes. Le deuxième axe, qui explique 8,87 % de la variabilité totale permet de séparer les lignées C et O. Les ruchers 8, 28, 29, 30, 34, 35 et 36 sont situés à proximité de la souche de référence Buckfast, isolée de la lignée C par le troisième axe qui explique 6,39 % de la variabilité. Les ruchers 23 et 31 présentent une position intermédiaire entre la lignée M et la souche de référence Buckfast.

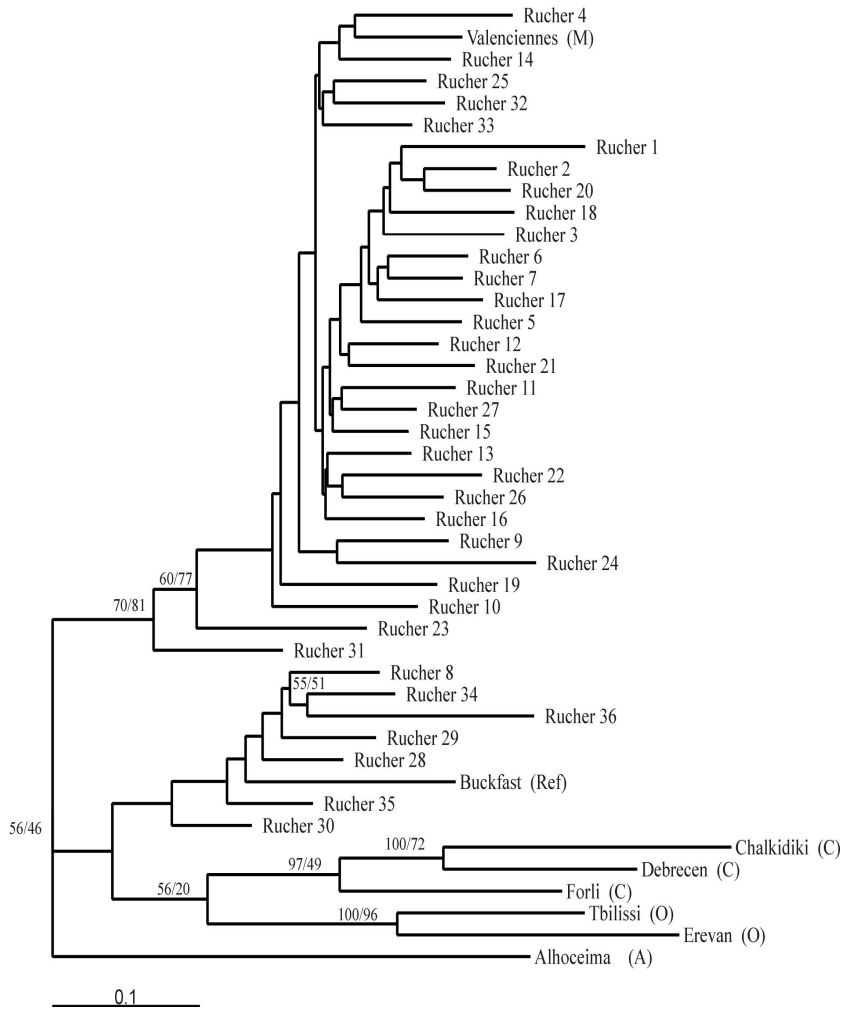

Figure 3 : Réseau phylogénétique obtenu à partir de la matrice de distances de Cavalli Sforza inter-ruchers (données microsatellites). La reconstruction a été réalisée selon l'algorithme du *Neighbor-Joining*. Les valeurs de bootstraps supérieures à 50 % sont représentées sur chaque noeud (2 000 réplications réalisées sur les locus ou les individus). Entre parenthèses sont indiquées les lignées d'origine des populations servant de référence.

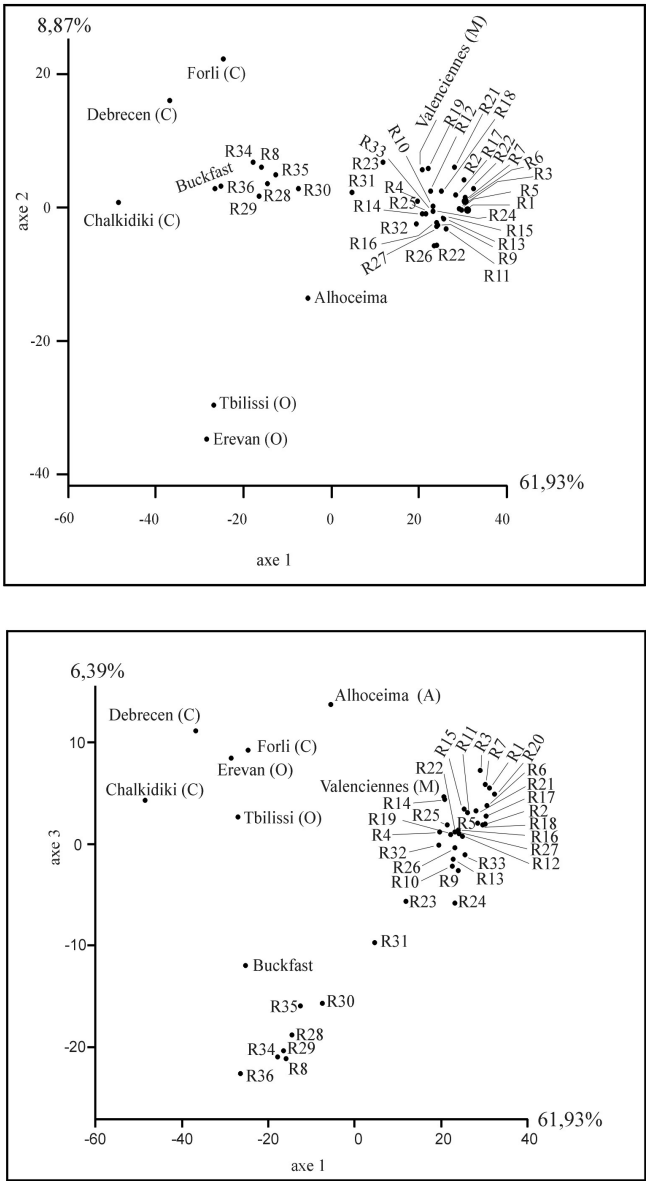

Figure 4 : Projections selon les axes 1-2 et 2-3 de l'analyse en coordonnées principales réalisée sur la matrice des distances inter-ruchers. Le pourcentage de variation exprimé est indiqué sur chaque axe.

3.4. Caractérisation des niveaux d'introgressions génétiques

Le test mitochondrial permet directement de caractériser l'origine maternelle de la colonie étudiée. La région landaise semble, dans un premier temps, être très touchée par l'importation de reines étrangères originaires de la lignée C (haplotypes C1, C2 et C3). En effet, le taux d'introgression mitochondriale par cette lignée allochtone est estimé à 27,82 % en prenant en compte l'ensemble des ruchers. Ces phénomènes d'introgressions ne sont pourtant pas répartis uniformément au sein de la région landaise (figure 1, tableau I).

Le classement de chaque colonie landaise, en utilisant comme références les populations Buckfast et Valenciennes, a été obtenu sur la base des données des locus microsatellites, selon trois méthodes différentes (tableau III).

Cette analyse fournit une estimation indirecte du niveau d'introgression nucléaire de chaque rucher par les abeilles de souche Buckfast. Le niveau d'introgression nucléaire de l'ensemble de la population paraît, comme dans le cas de l'ADNmt, relativement élevé puisqu'il est compris entre 17,84 % (méthode DAS) et 24,86 % (méthode Bayesienne). Comme dans le cas de l'ADNmt, on note une hétérogénéité importante dans les niveaux d'introgression en fonction des ruchers (tableau III).

3.5. Constitution génétique des colonies

Étant donné le nombre de colonies analysées et l'hétérogénéité apparente mettant en évidence trois types de ruchers (types M, Buckfast et intermédiaires) la projection simultanée de l'ensemble des 1 260 individus dans l'espace de l'analyse en coordonnées principales ne permet pas de visualiser clairement la composition de chaque rucher. Nous avons donc décidé de ne montrer que deux exemples de ces projections, qui correspondent aux deux situations les plus représentatives (figures 5 a et b). Sur ces figures, le premier axe, qui absorbe 32,67 % de l'inertie totale du nuage de points, permet de séparer les colonies de la lignée M du groupe formé par les populations de référence des lignées C et O. L'axe 2 sépare les populations de référence des lignées C et O. La figure 5 a montre les projections du rucher n° 25. Ces projections mettent en évidence le regoupement de la plupart des colonies chevauchant largement la surface occupée par la population de référence de la lignée M. Toutefois, quelques individus sortent de cette distribution et se trouvent dans le nuage de points de la souche de référence « Buckfast ». Ce sont ces mêmes individus qui sont classés dans la population « Buckfast » avec les méthodes de classification. La projection des colonies du rucher n° 28 montre au contraire que celles-ci sont en majorité regroupées dans, ou à proximité du nuage de point de la référence Buckfast et

que seules quelques unes d'entre elles se trouvent dans, ou à proximité du nuage de point de la référence « Valenciennes ».

Tableau III : Résultats des classements d'individus selon les trois méthodes pour les séquences microsatellites. Ces classements ont été réalisés par rapport à deux populations de référence ne faisant pas partie de la région landaise : l'une référence de la lignée M (Val), l'autre référence de la souche Buckfast (Buck). Les deux dernières colonnes présentent le classement dans la lignée M ou C obtenu pour l'ADN mitochondrial. La dernière ligne exprime le pourcentage d'introgression soit par l'abeille Buckfast (locus microsatellites) soit par la lignée C (ADNmt).

Rucher	N	Fréquentielle		Bayesienne		DAS		ADNmt	
		Val	Buck	Val	Buck	Val	Buck	*M*	C
1	4	4	0	4	0	4	0	4	0
2	5	5	0	5	0	5	0	5	0
3	14	14	0	14	0	14	0	14	0
4	9	8	1	8	1	9	0	9	0
5	14	14	0	14	0	14	0	14	0
6	11	11	0	11	0	11	0	11	0
7	26	26	0	26	0	26	0	26	0
8	34	5	29	2	32	10	24	1	33
9	12	11	1	11	1	12	0	12	0
10	8	8	0	8	0	8	0	8	0
11	20	20	0	20	0	20	0	19	1
12	37	36	1	36	1	37	0	37	0
13	39	39	0	39	0	39	0	34	5
14	37	37	0	37	0	37	0	37	0
15	38	38	0	38	0	38	0	38	0
16	54	54	0	54	0	54	0	52	2
17	27	27	0	27	0	27	0	27	0
18	15	15	0	15	0	15	0	13	2
19	10	9	1	9	1	10	0	10	0
20	7	7	0	7	0	7	0	7	0
21	13	13	0	13	0	13	0	12	1
22	9	9	0	8	1	9	0	9	0
23	8	6	2	6	2	7	1	7	1
24	4	3	1	3	1	4	0	4	0
25	122	119	3	119	3	121	1	121	1
26	40	37	3	37	3	40	0	40	0
27	70	68	2	68	2	70	0	67	3
28	40	7	33	7	33	13	27	0	40
29	42	3	39	2	40	12	30	0	42
30	26	8	18	7	19	15	11	1	25
31	66	43	23	41	25	51	15	28	38
32	60	53	7	54	6	59	1	60	0
33	52	52	0	52	0	52	0	50	2
34	29	3	26	2	27	9	20	0	29
35	29	9	20	8	21	13	16	4	25
36	51	1	50	1	50	4	47	0	51
Total	1082	822	260	813	269	889	193	781	301
% intro			24,03		24,861		17,837		27,819

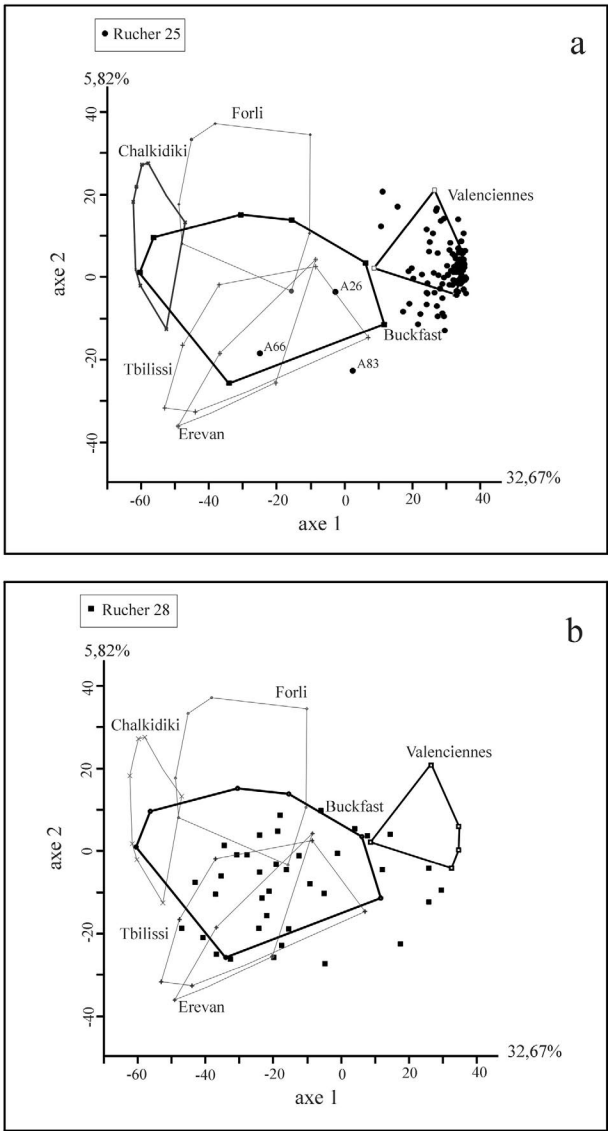

Figure 5 : Projections selon les axes 1-2 de l'analyse en coordonnées principales réalisée sur la matrice des distances inter-individuelles. Le pourcentage de variation exprimé est indiqué sur chaque axe et seules les enveloppes des populations de référence ont été projetées. a) Projections des 122 colonies du rucher 25. La plupart des colonies sont regroupées dans le nuage de la référence Valenciennes. Les numéros des colonies « introgressées » sont indiqués (A66, A26, A83). b) Projection des 40 colonies du rucher 28. La plupart de ces colonies recouvrent le nuage Buckfast. Une seule colonie se trouve dans la distribution de la population de référence Valenciennes.

4. DISCUSSION

4.1. Structure génétique de la population d'abeilles landaises

L'analyse réalisée sur l'ensemble de la population montre qu'elle est en désaccord avec une reproduction panmictique. Ne disposant d'aucune autre information sur une sous-structuration potentielle au sein de la population, la panmixie a été testée au niveau des ruchers. Tous les ruchers semblent être conformes à l'équilibre de Hardy-Weinberg, à l'exception du rucher 31. Ce résultat montre probablement une hétérogénéïté dans la structure génétique de la population. L'absence de panmixie observée pourrait alors correspondre à un effet Walhund lié à une sous structuration de cette population et le déficit en hétérozygotes observé constitue un argument en faveur de cette hypothèse. De plus, la sous structuration de cette population est mise en évidence par la présence d'au moins deux groupes génétiques qui apparaissent sur les phylogénies et sur les projections de l'analyse du tableau de distance. Ces deux groupes bien séparés quelque soit le type d'analyse constituent probablement la raison pour laquelle cette population n'est pas panmictique.

Le premier groupe est constitué par les ruchers 1, 7, 9 à 22, 24 à 27, 32 et 33. Ce groupe est très proche de la population Valenciennes, référence de la lignée M. Les courtes longueurs de branches séparant ces ruchers et les faibles valeurs de booststraps associées aux branches attestent de la grande cohésion de ce groupe. La proximité importante de ces ruchers entre eux et avec la population Valenciennes, accompagnée de la grande concentration des individus sur les projections des ATD individuelles viennent confirmer ce fait. Ces ruchers sont tous à l'équilibre de Hardy-Weinberg et seulement l'un d'entre eux présente un déséquilibre de liaison entre deux locus microsatellites. Ils correspondent donc à des ruchers panmictiques et assez homogènes dont les hétérozygoties sont relativement faibles (comprises entre 0,211 et 0,377) ce qui confirme les études antérieures [9], [11], [20]. Ces ruchers possèdent donc les caractéristiques des abeilles de la lignée M et semblent être constitués de colonies dont le compartiment nucléaire est majoritairement composé d'allèles d'origine de la lignée M.

Le second groupe est formé d'un ensemble de ruchers (8, 28, 29, 30, 31, 34, 35, 36) relativement proche de la souche référence Buckfast. Cette souche, est branchée à la base des lignées O et C sur la phylogénie et se trouve en position intermédiaire entre les populations de la lignée C et celles de la lignée M sur l'axe 1 de l'analyse en coordonnées principales. Cette souche a probablement un fond génétique différent de la lignée O puisqu'elles sont opposées selon l'axe 2, mais surtout possède une spécificité qui est exprimée selon l'axe 3 de cette même analyse. Les ruchers précédemment cités montrent les mêmes caractéristiques et semblent essentiellement constitués de colonies de type Buckfast. Ces ruchers montrent également une proportion importante d'haplotypes C (fond

maternel de cette souche) comprise entre 86,21 % et 100 % et appartiennent à un même apiculteur qui nous a confirmé qu'il utilise des abeilles de cette souche. Les hétérozygoties de ces ruchers sont comprises entre 0,491 et 0,664 et sont donc nettement supérieures à celles de l'autre groupe.

Deux ruchers semblent cependant s'individualiser de ces deux groupes génétiques. Les ruchers 23 et 31 sortent à la base de la lignée M sur la phylogénie. Sur les projections de l'analyse en coordonnées principales, ces deux ruchers sortent de la lignée M en direction de la souche Buckfast. Le rucher 31 est le seul qui n'est pas à l'équilibre de Hardy-Weinberg et représente probablement un rucher composite constitué d'un mélange de colonies typiques de la lignée M et de colonies probablement d'origine « Buckfast » (projections non montrées). Le niveau d'introgression mitochondriale par les haplotypes de la lignée C est égal à 57,58 %, et son niveau d'introgression nucléaire par la souche de référence Buckfast est compris entre 22,73 et 34,85 %.

Le rucher 23, présente un niveau d'introgression nucléaire relativement élevé, compris entre 12,5 % et 25 %. Une des huit colonies de ce rucher est caractérisée par un type mitochondrial propre à la souche Buckfast (C3). Sur les projections de l'analyse du tableau de distances individuelles, la même colonie semble particulièrement touchée par les introgressions nucléaires. Ce rucher étant localisé à proximité des ruchers de l'apiculteur travaillant avec la souche Buckfast, il est facile d'imaginer que cette colonie correspond à un essaim capturé et provenant des ruchers de type Buckfast.

4.2. Caractérisation des introgressions mitochondriales et nucléaires

Le typage mitochondrial effectué permet de déterminer l'origine maternelle d'une colonie et de l'affecter à l'une des trois lignées évolutives [8], [17], [18], [26], [40]. Utilisé à l'échelle de la population, il fournit directement le niveau d'introgression maternelle entre les lignées M et C. Ainsi, Le niveau global d'introgression mitochondriale de la population d'abeilles landaises par la lignée C a pu être estimé à 27,80 %.

Dans la mesure où la région des Landes semble être principalement introgressée par des abeilles de souche Buckfast, l'estimation du taux d'introgression nucléaire a été réalisée par rapport aux populations de références Buckfast et Valenciennes. Les méthodes de classement d'individus que nous avons utilisées ont permis d'estimer de manière indirecte des niveaux d'introgression par la souche Buckfast de 18,76 %, 24,03 % et 24,31 %, selon la méthode utilisée.

Du fait de la structuration observée il convient d'estimer de manière séparée les niveaux d'introgression nucléaires et cytoplasmiques des deux groupes observés.

Les niveaux d'introgressions mitochondrial et nucléaire des ruchers du premier groupe (M) sont respectivement de 2,25 % par la lignée C pour l'ADN mitochondrial et 2,64 % (fréquentielle), 2,51 % (bayesienne) et 0,26 % (DAS) par la souche Buckfast pour les locus microsatellites. Ce niveau d'introgression est proche de celui récemment estimé sur un autre échantillonnage réalisé dans la région de Sabres à l'aide d'un indice d'introgression génique qu'il n'était pas possible d'appliquer dans cette étude [20]. Les représentations graphiques des analyses de tableaux de distances effectuées entre les colonies révèlent que quelques colonies appartenant à des ruchers faiblement introgressés, se placent au sein du nuage de points de la souche Buckfast (figure 5 a). Ce sont ces mêmes colonies qui sont classées dans la souche Buckfast avec les méthodes de classification.

Les ruchers constituant le second groupe (Buckfast) présentent un taux d'introgression cytoplasmique par la lignée M de 2,39 % et les pourcentages de classement des individus dans la référence M sont repectivement 16,74 %, 11,55 % et 30,28 % selon la méthode utilisée. L'introgression nucléaire par les abeilles locales apparaît donc supérieure à l'introgression cytoplasmique.

Les estimations des niveaux d'introgression cytoplasmique existant entre ces deux groupes génétiques montrent que les flux de gènes sont de même ordre de grandeur dans les deux groupes (2,39 % pour les flux de M vers C et 2,64 % pour les flux de C vers M). Ceux-ci sont le reflet des essaimages et par conséquent de la migration femelle.

Le taux d'introgression nucléaire est équivalent au taux d'introgression cytoplasmique pour le groupe M, alors qu'il est environ quatre fois plus important pour le groupe « Buckfast ».

L'interprétation possible de ces observations est probablement que les introgressions cytoplasmiques sont le reflet des captures d'essaims sauvages par les apiculteurs et seraient équivalentes dans les deux groupes génétiques. En revanche comme les introgressions nucléaires observées sont plus importantes dans la souche Buckfast que dans lignée M, il semble que les flux de gènes liés à la fécondation par les mâles ne soient pas équilibrés dans le sens Buckfast vers M ou M vers Buckfast. Par conséquent les abeilles d'origine Buckfast ne font pas souche dans la population locale et les flux de gènes des abeilles Buckfast vers les abeilles locales semblent ralentis.

Les variations observées entre les différentes méthodes de classement utilisées proviennent des individus difficiles à classer, car constitués d'un mélange d'allèles des deux références proche de 50 %. C'est la raison pour laquelle nous avons conservé les estimations des trois méthodes. L'analyse du tableau de distances inter-individuelles couplée à cette méthode de classification permet de mieux visualiser ces individus. L'estimation d'un indice d'introgression génique aurait sans doute été plus appropriée, mais la convergence des estima-

tions des introgressions observée entre les méthodes de classement des ruchers M (2,64 %, 2,51 %, 0,26 %) et celle de l'indice d'introgression génique (2,4 %) [20] tendent à valider cette approche, bien que la méthode DAS semble sous estimer les introgressions.

4.3. Lieu d'implantation du conservatoire

Notre étude a donc permis de définir l'impact génétique lié à la présence d'apiculteurs travaillant avec des abeilles allochtones. Il apparait maintenant clairement que deux d'entre eux travaillent avec des abeilles de souche Buckfast. La population landaise semble globalement constituée de deux groupes génétiques : d'une part, un groupe de ruchers fortement introgressés au sud-ouest et, d'autre part, un groupe de ruchers faiblement introgressés au nord. Comme ces deux groupes sont séparés de plusieurs kilomètres et dans la mesure où les flux géniques entre les abeilles locales et les abeilles étrangères semblent limités, la conservation de la population landaise ne paraît pas nécessiter pour l'instant de mesure particulière d'isolement géographique. Le niveau d'introgression de la population d'abeilles landaises par des abeilles allochtones reste globalement assez faible si l'on ne considère pas les ruchers de souche Buckfast. Dans ce contexte, le conservatoire génétique doit trouver sa place dans une zone relativement exempte de colonies d'abeilles étrangères, c'est-à-dire au nord de la région étudiée, à proximité de Moustey. Cette zone est en effet occupée par des apiculteurs dont les ruchers sont principalement constitués d'abeilles locales et d'effectifs importants. Certains de ces ruchers possèdent néanmoins des colonies introgressées et il est désormais possible, grâce aux différents outils utilisés, d'identifier ces colonies et de ne pas les intégrer au sein du sanctuaire.

4.4. Perpectives

Un groupe de ruchers est actuellement mis en place dans la région de Moustey et doit servir de base pour la constitution du conservatoire génétique. En parallèle, il est envisagé de suivre l'évolution des introgressions des ruchers situés dans la zone de contact entre les deux groupes génétiques afin d'analyser les flux de gènes réciproques. Ainsi, l'analyse de la contribution des colonies à la formation des congrégations de mâles [31], [33] et le suivi de l'évolution des fréquences allèliques dans les colonies avoisinantes devrait nous apporter des informations importantes sur les flux géniques entre ces deux communautés de ruchers. Ces connaissances qui se révèlent indispensables à la compréhension du fonctionnement de cette population nous fourniront les clés de la stratégie de conservation chez l'abeille.

REMERCIEMENTS

Nous remercions le Bureau des Ressources Génétiques (BRG) pour le soutien financier accordé à ces recherches. Cette étude n'aurait sans doute pas pu avoir lieu sans le soutien logistique du Parc naturel régional des landes de Gascogne et plus particulièrement de MM. L. Lemaire et F. Billy. Nous adressons également nos plus vifs remerciements à l'ensemble des apiculteurs ayant participé à la collecte des échantillons ainsi qu'à G. Arnold pour la relecture du manuscrit.

RÉFÉRENCES

[1] Arias M.C., Sheppard W.S., Molecular phylogenetics of honey bees subspecies (*Apis mellifera* L.), Mol. Phylogenet. Evol. 5 (1996) 557-566.

[2] Cavalli-Sforza L.L., Edwards A.W.F., Phylogenetic analysis: models and estimation procedures, Am. J. Hum. Genet. 19 (1967) 233-257.

[3] Chakraborty R., Jin L., A unified approach to study hypervariable polymorphism : statistical considerations of determining relatedness and population distances, in Pena S.D.J Chakraborty R., Eplen J.T., Jeffreys A.J. (Eds.) DNA fingerprinting state of the Science , Birkhauser Verlag, Basel, 1993, pp. 153 –175.

[4] Cornuet J.M., Fresnaye J., étude biométrique de colonies d'abeilles d'Espagne et du Portugal, Apidologie 20 (1979) 93-101.

[5] Cornuet J.M., Albisetti J., Mallet N., et Fresnaye J., étude biometrique d'une population d'abeilles landaises, Apidologie 13 (1982) 3-13.

[6] Cornuet J.M., Garnery L., Mitochondrial DNA variability in honeybees and its phylogeographical implications, Apidologie 22 (1991) 627-642.

[7] Cornuet J.M., Piry S., Luikart G., Estoup A., Solignac M., Comparison of methods employing multilocus genotypes to select or exclude populations as origins of individuals, Genetics 153 (1999) 1989-2000.

[8] De la Rùa P., Serrano J., Gallià J., Mitochondrial DNA variability in the Canary Islands honeybees (*Apis mellifera* L.), Mol. Ecol. 7 (1998) 1543-1547.

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

[10] Estoup A., Lagarder C.R., Perrot E., Chourrout D., Rapid one-tube test DNA extraction for reliable PCR detection of fish polymorphic markers and transgenes, Molecular marine biology and biotechnology 5 (1996) 295-298.

[11] Franck P., Garnery L., Solignac M., Cornuet J.M., The origin of the west european subspecies of honeybees (*Apis mellifera*): New insight from microsatellite and mitochondrial data, Evolution 52 (1998) 1119-1134.

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

[13] Franck P., Garnery L., Loiseau A., Oldroyd B.P., Hepburn H.R., Solignac M., Cornuet J.M., Genetic diversity of the honeybee in Africa : microsatellite and mitochondrial data, Heredity 86 (2001) 420-430.

[14] Fresnaye J., Lavie P., Boesiger E., La variabilité de la production du miel chez l'abeille de race noire et chez quelques hybrides interraciaux, Apidologie 5, 1 (1974) 1-20.

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

[16] Garnery L., Cornuet J.M., Solignac M., Evolutionary history of the honey bee *Apis mellifera* infered from mitochondrial DNA analysis, Mol. Ecol. 1 (1992) 145-154.

[17] Garnery L., Solignac M., Celebrano G., Cornuet J.M., A simple test using restricted PCR-amplified mitochondrial DNA to study the genetic structure of *Apis mellifera* L., Experientia 49 (1993) 1016-1021.

[18] Garnery L., Mohssine E.H., Oldroyd B.P., Cornuet J.M., Mitochondrial DNA variation in moroccan and spanish honey bee populations, Mol. Ecol. 4 (1995) 465-471.

[19] Garnery L., Franck P., Baudry E., Vautrin D., Cornuet J.M., Solignac M., Genetic biodiversity of the West European honey bee (*Apis mellifera mellifera* and *Apis mellifera iberica*), I mitochondrial DNA, Genet. Sel. Evol. 30 (1998) 31-47.

[20] Garnery L., Franck P., Baudry E., Vautrin D., Cornuet J.M., Solignac M., Genetic biodiversity of the West European honey bee (*Apis mellifera mellifera* and *Apis mellifera iberica*). II microsatellites loci, Genet. Sel. Evol. 30 (1998) 49-74.

[21] Jouve F., Le grand livre du miel et des abeilles, Editions Solar Paris, 1997, 144 p.

[22] Koulianos S., Crozier R.H., Two ancient mitochondrial alleles in Australian honey-bees, Apidologie 22 (1991) 621-626.

[23] Louveaux J., The acclimatization of bees to a heather region, Bee world 54 (1973) 105-111.

[24] Louveaux J., Albisetti J.M., Theurkauff M., Les modalités de l'adaptation des abeilles (*Apis mellifica* L.) au milieu naturel, Ann. Abeille 9 (4) (1966) 323-350.

[25] McMichael M., Hall H.G., DNA RFLPs at a highly polymorphic locus distinguishing european and african subspecies of the honey bee (*Apis mellifera* L.) and suggest geographical origin of new world honey bees, Mol. Ecol. 5 (1996) 403-416.

[26] Moritz R.F.A., Cornuet J.M., Kryger P., Garnery L., Hepburn H.R., Mitochondrial DNA variability in south african honeybees (*Apis mellifera* L.), Apidologie 25 (1994) 169-178.

[27] Nei M., Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals, Genetics 47 (1978) 253-259.

[28] Nei M., Tajima F., DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases, Genetics 97 (1981) 145-163.

[29] Oldroyd B.P., Sheppard W.S., and Stelzer J.A., Genetic characterisation of the bees of Kangaroo Island, South Australia, J. Apic. Res. 31 (1993) 141-148.

[30] Paetkau D., Calvert W., Stirling I., Strobeck C., Microsatellite analysis of population structure in canadian polar bear., Mol. Ecol. 4 (1995) 347-354.

[31] Peer D. F., Further studies on the mating range of the honey bee, *Apis mellifera* L., The canadian entomologist 89 (1957) 108-110.

[32] Raymond M., Rousset F., Genepop (Version 1.2): population genetics sofware for exact test and ecumenism, J. Hered. 86 (1995) 248-250.
[33] Ruttner F., The mating choice of the honey bee, Bee world (1956) 2-15.
[34] Ruttner F., Biogeography and taxonomy of honey bees, Springer-Verlag, Berlin, 1988, 284 p.
[35] Ruttner F., Naturgeschichte der honigbienen, Ehrenwirth, München, 1992, 357 p.
[36] Saitou N., Nei M., The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees, Mol. Biol. Evol. 4 (1987) 406-425.
[37] Sheppard W.S., A history of the introduction of honey bee races into the states, Am. Bee. J. 129 (1989) 617-619, 664-667.
[38] Sheppard W.S., Huettel M.D., Biochemical genetic markers, intraspecific variation, and population genetics of the honey bee, *Apis mellifera*, In Africanized honey bees and bee mites Needham G.R., Page R.E. Jr., Delphinado-Baker M and Bowman C.E.(eds) Ellis Horwood, Chichester, 1988, pp. 281-286.
[39] Sheppard W.S., Arias M.C., Grech A., Meixner M.D. *Apis mellifera ruttneri*, a new honey bee subspecies from malta. Apidologie 28 (1997) 287-293.
[40] Sheppard W.S., Rinderer T.E., Garnery L., Shimanuki H., Analysis of africanized honey bee mitochondrial DNA reveals further diversity of origin, Gen. Mol. Biol. 22 (1) (1999) 73-75.
[41] Smith D.R., Mitochondrial DNA and honey bee biogeography, in Smith D.R. (ed.) Diversity of the genus *Apis*, Westview Press, Oxford and IBH Publishing Co, 1991, pp. 131-176.
[42] Smith D.R., African bees in the americas: insight from biogeography and genetics, Trends Ecol. Evol 6 (1991) 17-21.
[43] Takezaki N, Nei M., Genetic distances and reconstruction of phylogenetic trees from microsatellite DNA, Genetics 144 (1996) 389-399.