

**SOMMAIRE**

1. INTRODUCTION	1
1.1 Origine et évolution d'<i>Apis mellifera</i>	2
1.2 Diversité génétique et structure des populations d'<i>Apis mellifera</i>	3
1.3. Problématique et objectifs de l'étude	5
2. MATÉRIELS ET MÉTHODES	7
2.1. Matériel biologique : <i>Apis mellifera</i> à La Réunion	7
2.2. Sites et méthodes d'échantillonnage des colonies	8
2.3. Analyses moléculaires	9
2.3.1. Extraction de l'ADN	9
2.3.2. Amplification de l'ADN mitochondrial et RFLP	9
2.3.3. Amplification de l'ADN et génotypage des microsatellites	10
2.3.3.1. Amplification de l'ADN par PCR des microsatellites	10
2.3.3.2. Génotypage et lecture des profils	10
2.3. Analyses statistiques de génétique	11
2.3.1. Définition des groupes pour les analyses	11
2.3.2. Analyses préliminaires : fréquences alléliques, allèles nuls, déséquilibre de liaison	11
2.3.3. Indices de diversité et F-stats	12
2.3.4. Tests sur la structuration des données microsatellites	13
3. RÉSULTATS	14
3.1. Diversité des lignées maternelles	14
3.2. Diversité génétique nucléaire	15
3.3 Structuration des populations	16
4. DISCUSSIONS	17
4.1. Diversité des sous-espèces d'<i>Apis mellifera</i> à La Réunion	17
4.2. Influence de l'apiculture sur la diversité génétique insulaire	20
5. CONCLUSION & PERSPECTIVES	22
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	
LEXIQUE	
ANNEXES	

INTRODUCTION

Les insectes sont les animaux pollinisateurs¹ les plus diversifiés et participent à la reproduction d'une espèce sur sept d'Angiospermes² (Schoonhoven *et al.* 1998, Danforth *et al.* 2006). Ils tiennent ainsi un rôle clé dans les écosystèmes terrestres naturels mais également cultivés (Breeze *et al.* 2011, Ollerton *et al.* 2011). Parmi eux, la super-famille des *Apoidea* ou abeilles forment le groupe de pollinisateurs le plus large et spécialisé (Michener 2000, Le Conte & Navajas 2008). Cette spécialisation est le résultat d'une longue co-évolution entre le groupe des abeilles et celui des Angiospermes qui aurait débuté suite à des radiations évolutives synchrones au milieu du Crétacé (Danforth *et al.* 2006). Aujourd'hui, 20 000 espèces sont répertoriées, dont 15 000 espèces sont retrouvées dans les Néo tropiques contre seulement 2 500 en Europe (Moure *et al.* 2007, Klingler 2009, Michener 2000, Danforth *et al.* 2006). Les zones tropicales concentrent la plus forte diversité spécifique en raison des conditions climatiques plus favorables au développement des plantes et des insectes. Paradoxalement, l'abondance et la densité des abeilles sont plus élevées en zone tempérée et ce grâce à une espèce en particulier : *Apis mellifera* Linné, 1758 (*Apidae*) (Crane 1976, Michener 2000). Cette espèce, aussi connue sous le nom d'abeille domestique ou mellifère, est exploitée par l'Homme en apiculture depuis environ 7000 ans (Crane 1990). L'intérêt porté à cette abeille est dû à sa capacité à produire du miel, de la gelée royale, de la cire mais aussi de pouvoir récolter du pollen et de la propolis (Crane 1976, 1990). De plus, elle contribue à plus de 80% des services de pollinisation de l'agriculture mondiale (Winston 1987, Carreck & Williams 1998, Breeze *et al.* 2011) qui ont été estimés à 153 milliards d'euros par an (Klein *et al.* 2007, Gallai *et al.* 2009). Aussi, les enjeux écologiques et économiques liés à *A. mellifera* ont favorisé la multiplication des études pour mieux comprendre sa biologie, son écologie ou encore son histoire évolutive. Ces études ont majoritairement été menées sur l'abeille domestique en zone tempérée, comme en Europe où l'apiculture s'est professionnalisée et est intensive (De la Rúa *et al.* 2009, Harpur *et al.* 2012). Pourtant cette espèce est naturellement distribuée dans des régions tropicales et insulaires mais l'apiculture y est souvent plus traditionnelle et localisée. Depuis quelques années, l'abeille domestique en Afrique est de plus en plus étudiée (Franck *et al.* 2001, El-Niweiri & Moritz 2008, 2010, Bellie 2009, Shaibi *et al.* 2009, Shaibi & Moritz 2010, Meixner *et al.* 2011), cependant les connaissances restent encore minces sur les îles avoisinantes comme Madagascar et La Réunion (Schneider 1989, Ralalaharisoa *et al.* 1996).

La Réunion constitue ainsi un site d'étude idéal pour mieux comprendre les traits d'histoires de vie et l'évolution d'*Apis mellifera* en milieu tropical insulaire. Très peu d'études ont été menées sur l'abeille réunionnaise et il est nécessaire d'améliorer nos connaissances sur une espèce pouvant avoir un impact sur la biodiversité végétale présente. Selon des observations menées sur des espèces végétales représentatives de forêt tropicale, 80% des fleurs sont visitées par des *Apidae* et 40% de ces visites sont effectuées par une abeille du genre *Apis* (Castro 2002). De plus, cette activité pollinisatrice peut s'étendre sur toute l'année du fait qu'il n'y ait pas de « réel hiver ». Enfin, la situation insulaire de l'abeille réunionnaise conduit à un isolement

géographique limitant les possibilités de reproduction avec les autres *Apis mellifera* de la planète. Cette étude a pour but de réaliser un premier état des lieux de la diversité génétique de l'abeille à La Réunion.

Pour cela, ce rapport abordera dans une première partie introductive les origines et la mise en place de la biodiversité d'*Apis mellifera* au cours de l'évolution. Puis dans une seconde partie, l'intérêt d'étudier la diversité génétique chez cette espèce et l'influence de certains facteurs structurant cette diversité. Enfin dans la dernière partie d'introduction seront exposés les objectifs de l'étude et problématiques.

1.1 Origine et évolution d'*Apis mellifera*

Le genre *Apis* comprend dix espèces d'abeille qui sont réparties sous des climats très différents (Ruttner 1988, Le Conte & Navajas 2008). Au sein de ce genre, neuf espèces ont une aire de répartition restreinte à l'Asie et en particulier au Sud-Asiatique (Fig. 1). L'espèce *Apis mellifera* présente une aire de répartition naturelle plus large, s'étendant jusqu'à l'Afrique sub-saharienne, le Nord de l'Europe et l'Asie Centrale (Fig. 1) (Ruttner 1988, Smith 1991, Sheppard & Meixner 2003, Arias & Sheppard 2005, Whitfield *et al.* 2006). Elle est présente dans des environnements très variés comme les oasis du désert Africain (Shaibi & Moritz 2010), les montagnes alpines (Le Conte & Navajas 2008), les dômes volcaniques Ethiopien (Meixner *et al.* 2011), la bordure de la toundra (Toullec 2008), les forêts tropicales Africaines (Fletcher 1978) ou encore les îles océaniques tempérées (De la Rúa *et al.* 2001a, 2001b, 2002a, 2006, Carreck 2008) et tropicales (Ralalaharisoa *et al.* 1996, Franck *et al.* 2001).

En 1971, Wilson propose le scénario selon lequel *Apis mellifera* serait d'origine Africaine et aurait par la suite colonisé l'Eurasie (Michener 2000). Des études génétiques confirment que la radiation d'*Apis mellifera* aurait effectivement commencé en Afrique et, qu'elle aurait ensuite colonisé en deux ou trois vagues indépendantes l'Europe et l'Asie à partir de son point d'origine (Whitfield *et al.* 2006). Les populations auraient migré vers l'Europe de l'Ouest en empruntant le détroit de Gibraltar (Garnery *et al.* 1992) et vers l'Asie au travers des terres du Moyen-Orient (Fig. 2). La différenciation des populations et la diversification de l'espèce s'est déroulée en Europe et en Afrique dans une mosaïque d'habitats. Les populations étaient confrontées à des conditions environnementales variées comme le relief, la composition floristique, la prédation, ou encore le climat. Alors qu'en milieu tropical, les saisons sont très peu marquées, en milieu tempéré *A. mellifera* est confrontée à des changements de saison et à des variations cycliques des ressources (Garnery *et al.* 1998, Toullec 2008). En réponse à différentes pressions de sélection naturelle, *A. mellifera* aurait développé une grande variabilité des traits d'histoire de vie menant à certains comportements comme la stratégie de récolte et de d'accumulation de miel pour survivre pendant l'hiver (Ruttner 1988 Ces capacités de production ont su être identifiées et exploitées par l'Homme. Par la suite, ces colonies productives ont été exportées vers les autres continents (Louveaux *et al.* 1966, Le Conte & Navajas 2008). Avec les transports humains, cette espèce a été introduite et s'est établie sur l'ensemble du continent Américain (Nord, Centre et Sud) (Diniz *et al.* 2003, Quezada-Euan *et al.* 2003, Pinto *et al.* 2005, Szalanski & Magnus 2010) mais aussi en Océanie il y a 150 ans

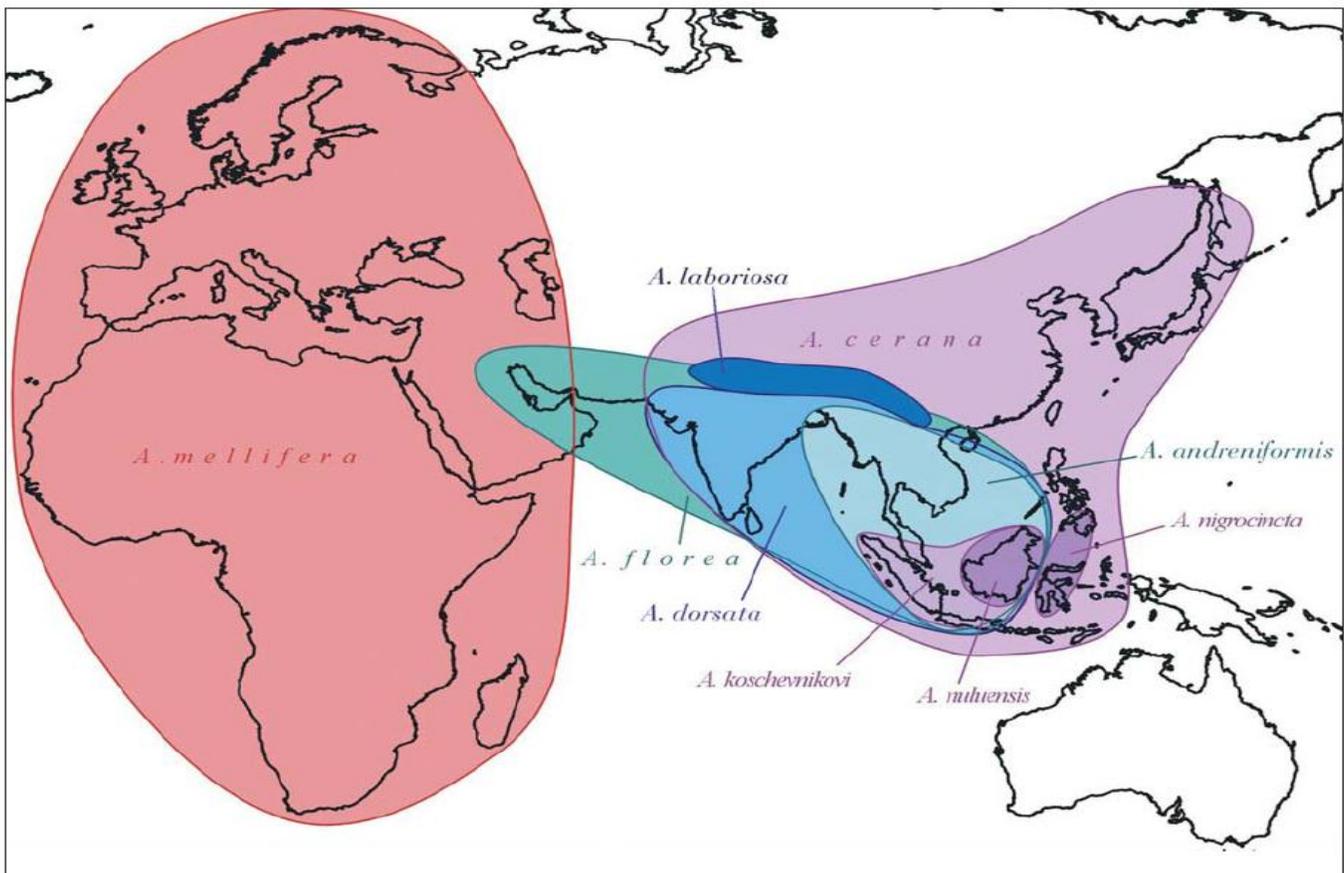


Figure 1 : Carte de l'aire de répartition naturelle des espèces du genre *Apis*. (Sources : d'après Ruttner 1988, Otis 1996, Smith & Hagen 1996 et tiré de Franck 1999).

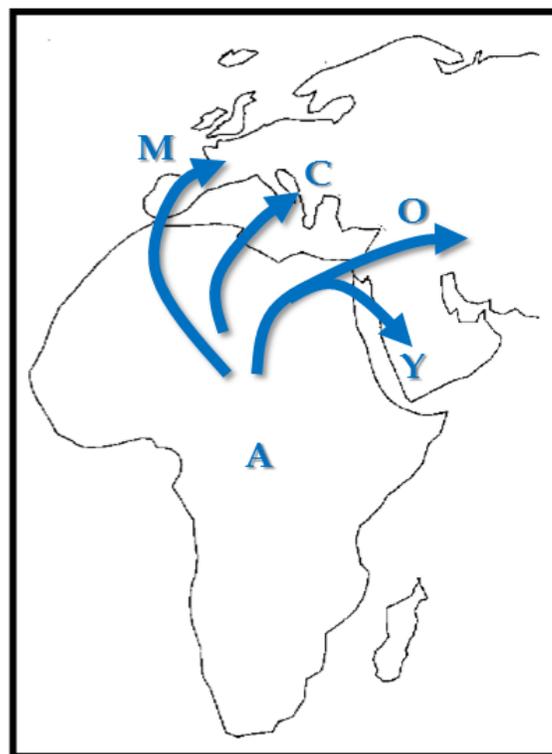


Figure 2 : Scénario évolutif de l'origine et de l'expansion d'*Apis mellifera*, les flèches correspondent à des flux migratoires colonisateurs et les lettres colorées représentent les lignées évolutives A, M, C et O (Source : inspirée de Whitfield et al. 2006).

(Paini 2004, Groom & Schwarz 2011). *A. mellifera* possède aujourd'hui une aire de répartition introduite subcosmopolite où seuls les déserts chauds et froids sont trop inhospitaliers pour être colonisés.

La biodiversité de l'abeille domestique en Afrique, Europe et Moyen Orient s'est mise en place sous l'influence de nombreux facteurs extrinsèques (Shaibi *et al.* 2009). A ce jour, 29 sous-espèces ont été reconnues et décrites sur la base de caractères morphologiques, comportementaux, écologiques et de distributions géographiques (Ruttner 1988, Engel 1999, Sheppard & Meixner 2003, Shaibi *et al.* 2009) (Fig. 3). Ces sous-espèces peuvent se reproduire entre elles car les divergences génétiques, morphologiques et comportementales ne sont pas suffisamment importantes pour constituer des barrières reproductives (ex: morphologie appareil sexuel, période de reproduction, attraction, ...). Elles ont été regroupées sous cinq lignées évolutives: la lignée A (Africaine), la lignée C (Nord-Méditerranéenne), la lignée M (Ouest-Européenne), la lignée O (Orientale) et la lignée Y (Yéménite) (Ruttner 1988, Garnery *et al.* 1992, Arias & Sheppard 1996, Sheppard *et al.* 1997, Franck *et al.* 1998, 2000a, Whitfield *et al.* 2006, Miguel *et al.* 2007, 2011) (Fig. 2). Ces lignées ont d'abord été définies sur la base de caractères morphologiques par Ruttner (1988) puis ont été confirmées par des études génétiques utilisant l'ADN mitochondrial (Smith & Brown 1988, Garnery *et al.* 1992, 1993, 1998, Arias & Sheppard 1996, Franck *et al.* 1998, 2000a, 2001, Palmer *et al.* 2000a, Whitfield *et al.* 2006, Miguel *et al.* 2007).

La lignée Africaine détient plus de la moitié des sous-espèces d'*A. mellifera*, distribuées sur l'ensemble du continent (Fig. 3). La séparation nette entre les branches évolutives M et A au niveau de la Péninsule Ibérique indique que les populations d'*A. mellifera* d'Afrique du Nord et d'Europe occidentale auraient évolué indépendamment les unes des autres (Smith 1991, Garnery *et al.* 1995, Franck *et al.* 1998, 2000a, De la Rúa *et al.* 2002b, 2004a, 2004b, 2005a). L'évolution d'*A. mellifera* en Afrique peut être expliquée par les glaciations quaternaires qui ont provoqué l'isolement et la divergence de certaines populations (Potts & Behrensmeier 1992) (Fig. 3). Certains groupes de populations côtières ont migré vers les îles proches comme Madagascar et ont réussi à s'établir. L'isolement insulaire (limitation des flux de gènes avec le continent) et les adaptations aux pressions de sélection locales ont donné naissance à *A. mellifera unicolor*. Cette sous-espèce endémique de Madagascar serait également celle présente dans les îles océaniques alentours (Ralalaharisoa *et al.* 1996) et a notamment été décrite à La Réunion sur la base de caractères morphométriques (Schneider 1989).

1.2 Diversité génétique et structure des populations d'*Apis mellifera*

Le maintien des populations dans un milieu est lié à plusieurs facteurs dont la diversité génétique. La perte de diversité génétique (dérive génétique³, fragmentation,..) limite le potentiel adaptatif des populations (Zayed 2009). Cette perte associée à une éventuelle dépression de consanguinité⁴ peut mener à l'extinction de populations voire de sous-espèces. Pour pallier à cette perte de diversité, la mise en place de stratégie de conservation permet de préserver des populations possédant un *pool* ou patrimoine génétique particulier et/ou très diversifié.



Figure 3 : Carte de l'aire de répartition naturelle d'*Apis mellifera* qui recouvre l'Afrique (a), l'Europe et le Proche Orient (b). Ici, la carte ne représente que 26 races ou sous-espèces géographiques réparties dans les cinq lignées évolutives (Franck *et al.* 2000a, 2001): Africaine (A), Yéménite (Y) Ouest de la Méditerranée (M), Nord de la Méditerranée (C) et Orientale (O). (Sources: www.mellifica.be)

Lors d'un déclin global dû à des perturbations importantes, ces populations peuvent servir de réservoir génétique. Chez l'abeille, un déclin progressif dans les pays exploitant intensivement les colonies est reporté depuis quelques années (Haubruge *et al.* 2006). En réponse à ce dépérissement d'origine multifactoriel (perturbations climatiques et anthropiques, invasions biologiques, parasites et pathogènes,...), de plus en plus d'études sont menées pour estimer et maintenir la diversité génétique des populations Européennes et Africaines endémiques (Franck *et al.* 2001, Dietemann *et al.* 2009, De la Rúa *et al.* 2006, 2009, Bouga *et al.* 2011, Meixner *et al.* 2011). Selon les principes de la convention de Rio (1992) et de la Communauté Européenne, la mise en place de conservatoires de l'abeille « permet de prendre des mesures afin de préserver le capital génétique des espèces sauvages et domestiquées et de prévenir les processus d'érosion génétique ». Des zones de conservation ont déjà été mises en place pour des sous-espèces ayant un patrimoine génétique particulier comme pour *A. mellifera mellifera* (abeille noire) en France (Toullec 2008). Les populations d'*A. mellifera mellifera* étaient de plus en plus confrontées à des hybridations avec des sous-espèces allochtones, plus douces, comme *A. mellifera ligustica* (Jensen *et al.* 2005, Rortais *et al.* 2011). Les introgressions⁵ entre ces deux sous-espèces causaient la perte d'allèles privés ou rares à un *locus* donné chez *A. mellifera mellifera*. Aussi l'étude de la diversité génétique nucléaire permet d'identifier les populations ayant le moins de pollution génétique afin de proposer des conservatoires permettant de contrôler les pratiques apicoles importatrices (Perrier *et al.* 2003, Jensen & Pedersen 2005, Jaffé & Moritz 2009, Rortais *et al.* 2011).

Les pratiques apicoles ont aussi des répercussions majeures sur la diversité génétique des populations d'abeille (De la Rúa *et al.* 2009, El-Niweiri & Moritz 2010, Cánovas *et al.* 2011). La diversité génétique plus importante des sous-espèces de la lignée A en comparaison à celle de la lignée M pourrait en partie être liée aux pratiques apicoles des continents Européen et Africain (Cornuet & Garnery 1991, Estoup *et al.* 1995, Franck *et al.* 1998, Garnery *et al.* 1998, Harpur *et al.* 2012). En Europe, l'apiculture est souvent professionnelle et s'étend sur l'ensemble des pays alors qu'en Afrique l'apiculture reste plus localisée et traditionnelle ayant moins d'impact sur les populations naturelles (Bellie 2009, El-Niweiri & Moritz 2010). Ces différences de pratiques ont conduit à l'expansion de sous-espèces d'importance économique comme *A. mellifera carnica* et *A. mellifera ligustica* partout en Europe, au détriment des populations indigènes *A. mellifera mellifera*, *A. mellifera siciliana*, *A. mellifera macedonica* et d'autres sous-espèces Européennes (Kandemir *et al.* 2006, Meixner *et al.* 2007, 2010). Il est important d'explorer et de connaître la diversité génétique des sous-espèces endémiques avant d'altérer complètement leur patrimoine génétique avec des hybridations causées par les pratiques apicoles.

Une structuration de la diversité génétique (c.-à-d. la mise en place de *pool* génétique significativement différent) peut se mettre en place suite à l'influence de plusieurs facteurs extrinsèques comme la fragmentation ou la perte d'habitat, des perturbations environnementales au niveau local, des pressions de sélection naturelle ou encore les pratiques apicoles (Cane 2001, Kremen *et al.* 2002, Murray *et al.* 2009, Zayed 2009, El-Niweiri & Moritz 2010, Cánovas *et al.* 2011). Les barrières naturelles (montagnes, océan, désert,...) limitant les flux de

gènes entre populations peuvent provoquer une différenciation génétique et une divergence. En effet, l'analyse microsatellite des populations d'*A. mellifera mellifera* et d'*A. mellifera iberensis* a mis en évidence une isolation temporelle après les glaciations (période avant recolonisation), géographique et topographique (Pyrénées) ayant limité les flux migratoires entre la France et la Péninsule Ibérique (Miguel *et al.* 2007). Dans certains cas, la différenciation des populations peut s'effectuer par rapport à des différences de pressions de sélection locales ou des milieux différents. Cinq microsatellites ont été utilisés chez des populations côtières d'*A. mellifera carnica* en Croatie et ont révélé la présence de deux sous-populations avec des diversités génétiques significativement différentes (Muñoz *et al.* 2009). Cette structuration a pu être corrélée à la présence de deux écotypes différents, chacun adapté aux variations régionales.

Les pratiques apicoles ont tendance à favoriser les flux de gènes entre populations en effectuant des transhumances. La mise ou remise en contact de populations va provoquer à long terme une homogénéisation de la diversité génétique. L'utilisation des microsatellites pour étudier la génétique des populations d'*A. mellifera iberensis* au Portugal et en Espagne n'a pas permis d'identifier une structure génétique géographique comme il était attendu (Cánovas *et al.* 2011). Au contraire, les analyses ont proposé la présence d'une seule grande population sur l'ensemble du territoire. Ceci peut s'expliquer par les pratiques apicoles qui ont provoqué l'homogénéisation de la diversité génétique entre ruchers (Cánovas *et al.* 2011). Les apiculteurs de ces pays ont tendance à souvent déplacer leurs colonies avec les transhumances permettant la mise en contact de colonies très éloignées et facilitant les échanges d'individus. Ce même phénomène a été observé pour les populations d'abeille italienne *A. mellifera ligustica* avec la détection d'une grande et unique population malgré la large aire de distribution (Dall'olio *et al.* 2007). Au Soudan, les pratiques apicoles ont non seulement un impact sur les populations exploitées (homogénéisation) mais aussi sur les populations sauvages en contact (El-Niweiri & Moritz 2010). L'utilisation des marqueurs à hérédité biparentale tels que les microsatellites a permis de détecter et de confirmer un métissage entre différentes sous-espèces au Soudan, créant une variabilité génétique distincte de celle observée chez des populations sauvages isolées (El-Niweiri & Moritz 2010).

L'étude de la diversité génétique en milieu insulaire constitue un élément essentiel pour comprendre l'évolution des populations et des phénomènes de colonisation. Lors de la colonisation, seuls quelques individus migrent et réussissent à s'installer sur les îles. Le *pool* génétique n'est donc qu'un échantillon du *pool* continental d'origine et on parle alors de goulet d'étranglement ou « *bottleneck* » (Franck *et al.* 2000b, De La Rúa *et al.* 2001a, 2001b, 2003, 2006, Bouga *et al.* 2011). L'utilisation de marqueurs microsatellites a permis de mettre en évidence ce phénomène dans de nombreuses îles de zone tempérée. Ce modèle évolutif a d'ailleurs pu être observé sur les îles Canaries (De La Ruà *et al.* 2001b) et sur l'île du Cap Vert (Franck *et al.* 2001).

1.3. Problématique et objectifs de l'étude

L'abeille à la Réunion a été décrite comme *A. mellifera unicolor* sur des critères morphologiques par Schneider en 1989. Une seule étude génétique (Franck *et al.* 2001) portant sur 20 individus a effectivement

confirmé qu'elle appartient à la lignée A. Son statut n'est toujours pas défini, certains affirment qu'elle serait indigène (Boucher 1941, Hermann 1920) tandis que d'autres la considèrent exotique (Dubois 1664, Bapoo 1981). Des introductions massives de sous-espèces Européennes *A. mellifera carnica*, *A. mellifera mellifera* et *A. mellifera ligustica* auraient été effectuées à partir de 1894 (Schneider 1989) (Fig. 4). En raison des risques sanitaires liés aux introductions de reines ou de colonies (prolifération de Nosémose en 1978), l'importation d'abeilles à la Réunion est interdite par arrêté préfectoral depuis le 27 mai 1982.

A ce jour, aucune étude génétique approfondie n'avait été faite pour décrire les lignées évolutives et maternelles et explorer la diversité génétique à La Réunion. Seule une étude récente sur les niveaux de polyandrie de 28 colonies d'abeilles à la Réunion (12 sauvages et 16 exploitées), basée sur l'utilisation de 6 couples d'amorces microsatellites, a déjà pu montrer de la diversité génétique (Sadeyen & Techer 2011) avec de 5 à 11 allèles / *locus* en moyenne par colonie. Les reines réunionnaises s'accoupleraient avec 11 à 25 mâles différents et auraient un comportement semblable que ce soit des colonies exploitées ou sauvages (Sadeyen & Techer 2011). Cette première étude génétique sur l'abeille a permis d'établir un pronostic préliminaire sur la diversité génétique mais nécessite d'être approfondie.

C'est pourquoi ce stage, inscrit dans le projet GEVOCA-5 de l'UMR PVBMT, a eu pour objectif de répondre à quatre questions principales au travers d'une approche descriptive:

- Quelles sont les lignées évolutives (maternelles) présentes chez l'abeille réunionnaise?
- Quelle est la diversité génétique nucléaire d'*Apis mellifera* à La Réunion ?
- Est-ce que la diversité génétique d'*Apis mellifera* à La Réunion est structurée ? Si oui, comment et quels sont les facteurs impliqués?
- Est-ce que les lignées évolutives C et M introduites par le passé sont toujours détectées via l'ADN mitochondrial et microsatellite ?

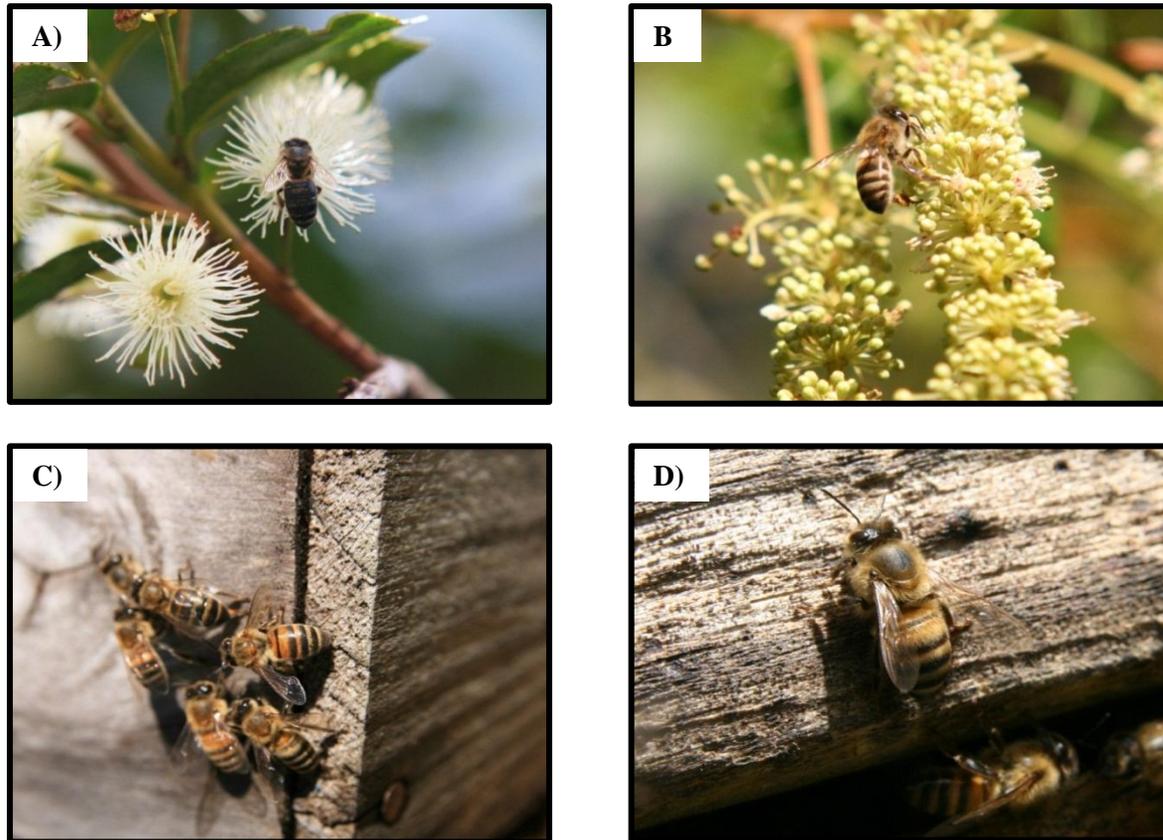


Figure 4 : Photos d'*Apis mellifera* à La Réunion avec différents phénotypes observables. A) Butineuse sur change-écorce (*Aphloia theiformis*) dans la forêt de Bébour, B) Butineuse sur Tan Rouge (*Weinmannia tinctoria*) dans la forêt des Makes, C) Ouvrières sur ruche à Grand Coude et D) Ouvrière sur ruche à Grand Bassin. (Source : TECHER. M)

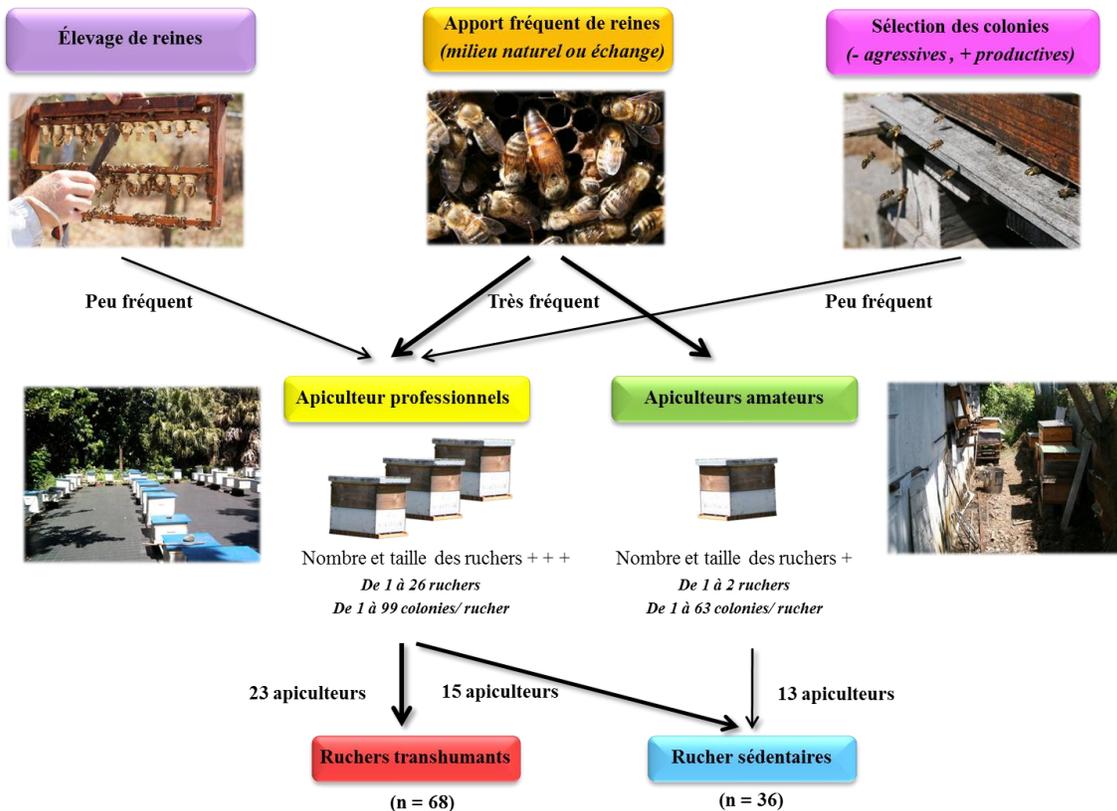


Figure 5 : Schéma résumé des pratiques apicoles présentes sur l'île avec évaluation de la fréquence par rapport aux enquêtes menées sur le terrain lors de la campagne d'échantillonnage. Ces observations ne concernent que les apiculteurs participants à l'étude. (Source : TECHER. M)

2. MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1. Matériel biologique : *Apis mellifera* à La Réunion

Le modèle de cette étude est l'abeille *A. mellifera* dite eusociale⁶ vivant dans des colonies monogynes⁷ hiérarchisées selon trois castes (Wilson 1971). Au sein d'une colonie cohabitent d'une part les sexués : la reine (seule femelle reproductrice) et les mâles et d'autre part les individus stériles plus nombreux que sont les ouvrières (Wilson 1971, Crane 1976). En ce qui concerne la durée de vie, elle varie en fonction de la caste donnée (Annexe 1). Si la colonie est considérée comme un super-organisme alors le temps de génération équivaut à celui d'une reine soit trois à quatre ans alors qu'une ouvrière vit en moyenne cinq semaines (Annexe 1) (Schmid-Hempel & Wolf 1988, Seeley 1989, Moritz & Fuchs 1998, Page & Peng 2001). Son système de reproduction est haplo-diploïde et met en jeu des partenaires avec des niveaux de ploïdie différents (Sinervo 1997, Mahowald & von Wettberg 1999). Les mâles sont issus d'ovules non fécondées et sont haploïdes (*n chromosome*) alors que les femelles proviennent d'œufs fertilisés et sont diploïdes (*2n chromosomes*) (Oldroyd & Fewell 2007). *Apis mellifera* est une espèce polyandre, ce qui veut dire que les femelles se reproduisent avec plusieurs mâles différents au cours d'un vol nuptial (Palmer & Oldroyd 2000b). Ce type de comportement implique des coûts importants (dépense énergétique, prédation, parasitisme,...) mais augmente la diversité génétique intra-coloniale à laquelle serait associés plusieurs bénéfices (Palmer & Oldroyd 2000b, Zeh & Zeh 2001, Girard *et al.* 2010).

Ce modèle biologique a donc été étudié sur l'île volcanique de La Réunion située dans le Sud-Ouest de l'Océan Indien appartenant à l'archipel des Mascareignes (55°39' E ; 21°00' S). Cette île tropicale océanique d'une surface de 2512 km², est composée d'une variété de milieux avec des conditions écologiques différentes dues aux conditions climatiques. La sous-espèce prépondérante d'*Apis mellifera* sur l'île de La Réunion a précédemment été décrite comme la sous-espèce *Apis mellifera unicolor* (endémique de Madagascar) selon six critères morphologiques (Schneider 1989, Ralalaharisoa *et al.* 1996) (Fig. 4). La répartition des colonies est large et s'étend sur l'ensemble de l'île, du milieu naturel aux zones fortement urbanisées et dans tous les cirques (Schneider 1989). En revanche, leurs distributions et densités sont *a priori* hétérogènes au niveau spatio-temporel et fortement influencées par l'exploitation de l'abeille par l'Homme. Depuis environ 200 ans, l'apiculture est perpétuée à La Réunion dans le but de domestiquer des colonies pour en obtenir les produits de la ruche. En 2008, la Direction des Services Vétérinaires (DSV) recensait 20 000 ruches pour 450 apiculteurs déclarés. Leurs pratiques apicoles sont très variées et diffèrent d'un rucher à l'autre (Fig. 5). Certains apiculteurs effectuent jusqu'à quatre transhumances⁸ par an afin de trouver les ressources nécessaires pour une production de miel tout au long de l'année. Ces transhumances se font entre chaque inter-miellée (deux miellées principales par an) et ce dans différents sites de l'île (Ouest-Est, Nord-Sud, Haut-bas,...). Dans d'autres ruchers, les colonies sont sédentaires et peuvent être sur un même site depuis plusieurs générations. En l'absence d'interdiction légale à prélever des colonies sauvages en milieu naturel, certains apiculteurs introduisent plus ou

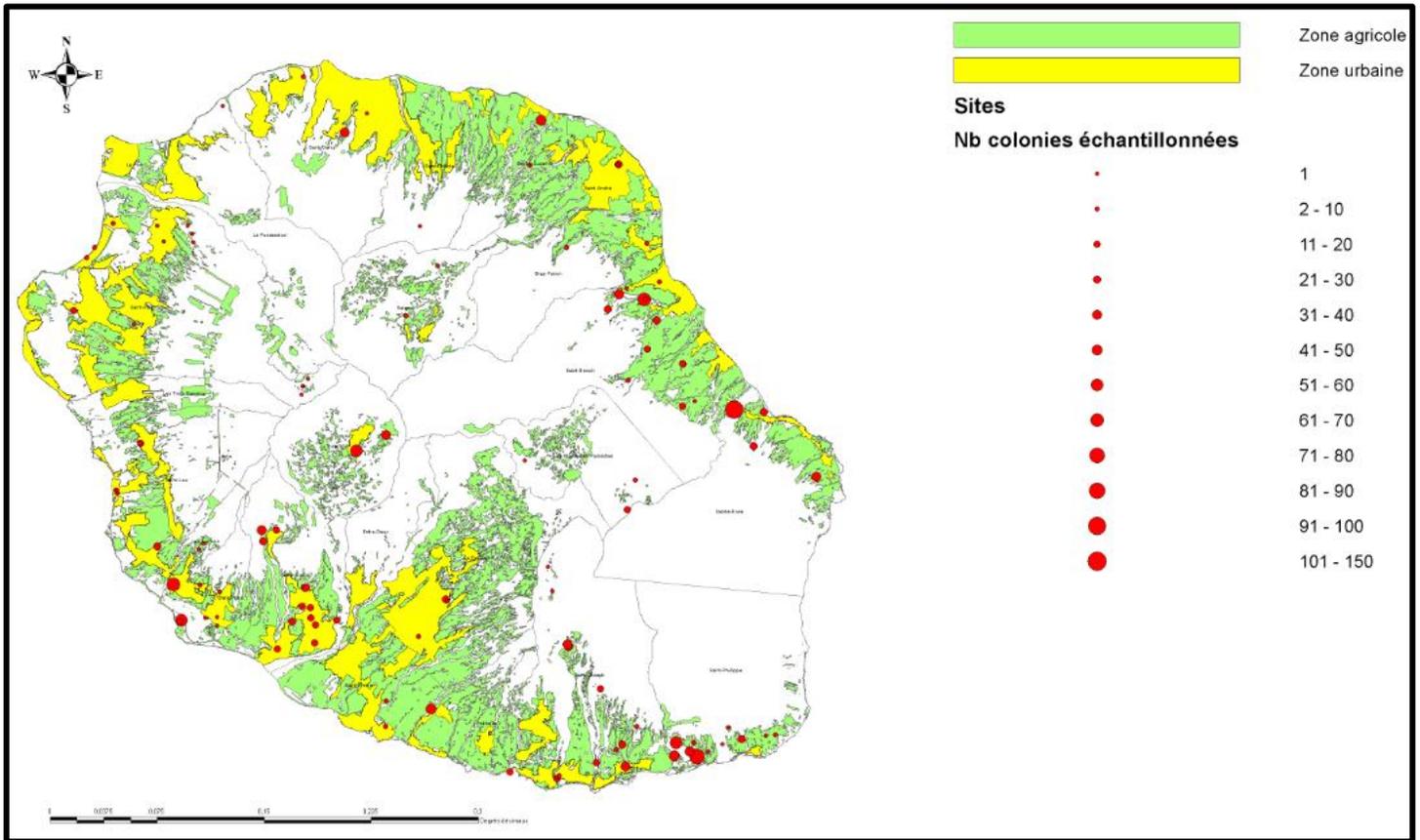


Figure 6 : Carte de l'île de La Réunion avec représentation des 120 sites d'échantillonnage de colonies d'*Apis mellifera* (points rouges). La taille des points est proportionnelle à l'effectif de colonies prélevées sur chaque site. (*Sources* : CIRAD, TURPIN. P et TECHER. M)



Figure 7 : Photos de l'échantillonnage sur colonies exploitées en A) avec récolte d'ouvrières à l'intérieur de la ruche et en B) récolte d'ouvrières sur la planche de vol (entrée/sortie colonie) après observation. (*Sources* : TECHER. M et FRANÇOIS. T)

moins régulièrement de nouvelles reines à leurs ruchers (Fig. 5). D'autres ne préfèrent garder que quelques lignées maternelles et sélectionnent les colonies les moins agressives. De ce fait les pratiques apicoles à La Réunion, la densité des colonies et l'emplacement (urbain, rural) varient d'un rucher à un autre. En ce qui concerne les colonies sauvages présentes en milieu naturel, leur recensement est plus compliqué à obtenir due à la difficulté de localisation. Elle provient en partie de leur capacité à coloniser des niches difficiles d'accès dans les milieux complexes forestiers (anfractuosités des troncs, tunnels de lave, ...) et en partie au braconnage.

2.2. Sites et méthodes d'échantillonnage des colonies

1881 colonies ont été échantillonnées sur 120 sites différents de l'île au cours de deux campagnes d'échantillonnage : de Juin à Décembre 2010 (31 colonies) et de Novembre 2011 à Avril 2012 (1850 colonies) (Fig. 6). La récolte a porté sur 15 colonies sauvages, provenant du milieu naturel et 1866 colonies exploitées provenant de 104 ruchers chez 51 apiculteurs (Annexe 2). L'anonymat des apiculteurs participants a été conservé pour cette étude, et tous les apiculteurs ont été renommés de 1 à 51. Les pratiques apicoles et notamment la transhumance ou non des colonies d'un même rucher ont été renseignées à partir d'une enquête terrain auprès des apiculteurs participants à l'étude (Fig. 5 et annexe 2). 36 ruchers sont transhumants et les 68 autres sont sédentaires (Annexe 2). Sur les quatre apiculteurs ayant plusieurs ruchers sédentaires (apiculteurs 12, 28, 31 et 40), seul l'apiculteur 12 possède des ruchers réellement distants en termes de localisation géographique (Ste Suzanne vs St Gilles) (Annexe 2). Les trois autres apiculteurs possèdent de deux à trois ruchers mais qui sont localisés dans la même région (St Leu, St Joseph, et Bras-Panon) souvent distants de quelques kilomètres.

L'effectif échantillonné répond aux besoins d'une étude génétique de grande ampleur à l'échelle de l'île sur un modèle de type insecte eusocial. L'échantillonnage a été réalisé par l'équipe de l'UMR PVBMT et les apiculteurs. Deux ouvrières par colonie ont été prélevées et immédiatement conservées dans de l'alcool à 95% à -20°C en attente des analyses de laboratoire. La majorité des ruchers échantillonnés comprenaient une forte densité de colonies exploitées au m², souvent juxtaposées entre elles ou espacées de quelques mètres. Afin de pallier au risque de récolte d'abeilles infidèles pouvant biaiser les analyses moléculaires, les ouvrières ont été prélevées à l'intérieur des ruches pour s'assurer de leur appartenance à la colonie et ce dans la mesure du possible (Fig. 7A). Les mauvaises conditions météorologiques lors des sorties terrains ou les contraintes apicoles ont conduit à prélever les ouvrières à l'entrée de la colonie. Pour 46 ruchers, les ouvrières ont été récoltées sur la planche de vol et ce après observations des entrées et sorties de la colonie ou après détection de comportements coloniaux indicateurs de l'appartenance à la colonie (gardiennage de l'entrée ou encore ventilation à l'entrée) (Fig. 7B). Pour les 15 colonies sauvages, la récolte d'ouvrières s'est effectuée à l'entrée des colonies et a surtout permis à ne pas les perturber ou les détruire du fait qu'elles provenaient en grande partie du Parc National de La Réunion.

Encadré 1 : RFLP et région Cytochrome Oxydase I et II

Le génome mitochondrial de l'abeille *Apis mellifera* (16,3kb) a été totalement séquencé (Crozier & Crozier 1993). Il n'est transmis que maternellement. La variabilité génétique intra et inter- populationnelle chez *Apis mellifera* a beaucoup été étudiée à partir du polymorphisme de la séquence de l'ADNmt (haploïde) totale ou de régions amplifiées par PCR. D'ailleurs le polymorphisme de la région inter-génique des gènes *Cytochrome Oxydase I* et *Cytochrome Oxydase II* codant pour des protéines essentielles (Crozier *et al.* 1989, Simon *et al.* 1994), s'est révélé suffisamment informatif pour différencier les différentes lignées évolutives et sous-espèces d'*Apis mellifera*. Il y a dix ans, alors que le séquençage n'était pas une technique économiquement accessible à tous les laboratoires, Garnery *et al.* (1993) ont développé un test rapide d'étude de la variabilité de cette région et de détection de lignées maternelles par PCR-RFLP (*Restricted Fragment Length Polymorphism*).

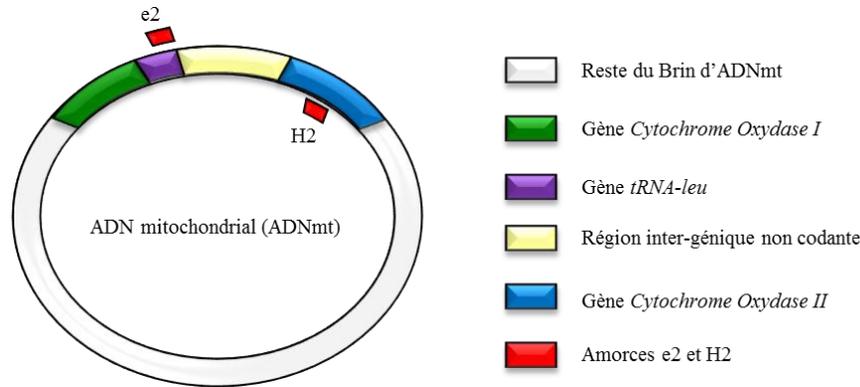
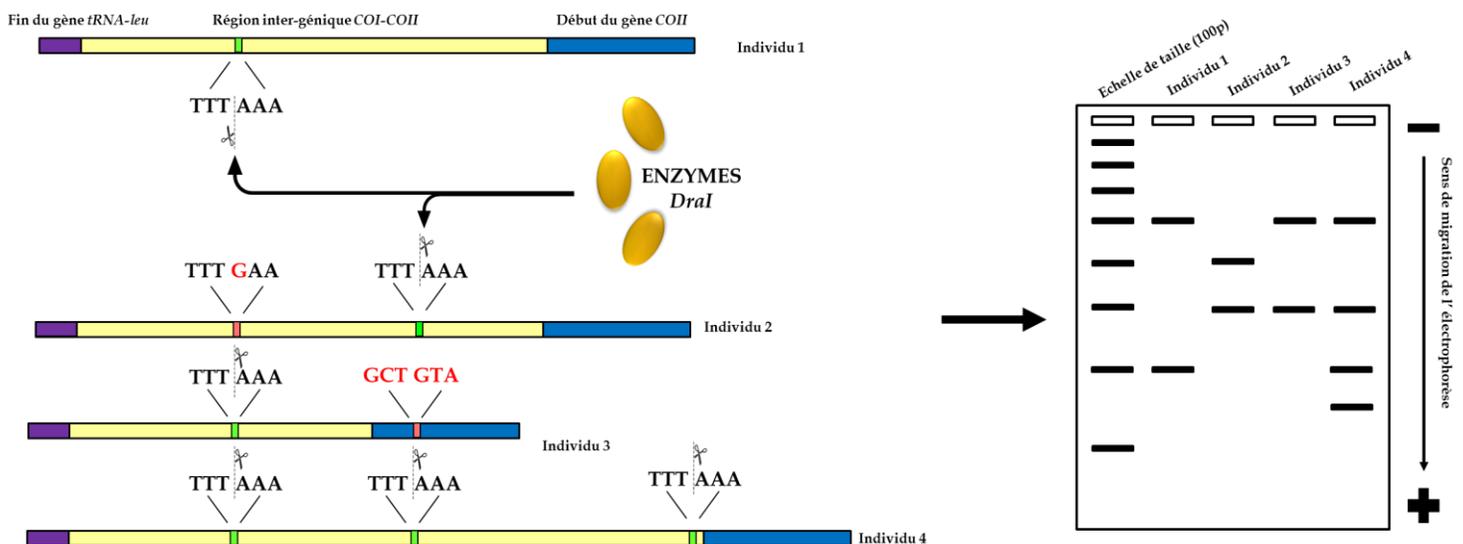


Schéma de l'ADN mitochondrial circulaire, monobrin avec l'enchaînement des gènes et région inter-génique dans la zone d'intérêt chez *Apis mellifera* avec sites d'hybridation des amorces.

La méthode se base d'abord sur l'amplification de la région inter-génique *COI-COII* par PCR avec des fragments amplifiés avec la fin du gène *tRNA-leu* (adjacent au gène *COI*), la région inter-génique et le début du gène *COII*. La RFLP est fondée sur l'étude de la taille de fragments de restriction, par la digestion de l'ADN amplifié sous l'action de l'enzyme *DraI* lorsqu'elle reconnaît des sites de restriction sur le fragment amplifié. Ainsi la RFLP permet d'étudier le polymorphisme de restriction (nombre et la taille des fragments) visualisé sur gels d'agarose après électrophorèse comme avec l'exemple-schéma ci-dessous :



De nombreuses études comme celle de Garnery *et al.* (1998), Franck *et al.* (2001), ou encore De la Rúa *et al.* (2001a, 2002a, 2003) ont déjà définies les sites de restriction pour certains mitotypes* permettant de déterminer la lignée évolutive (A, M, C, O et Y) et maternelle (sous-espèce) des individus. L'avantage de cette méthode est de pouvoir « screener » un grand nombre d'individus en un temps réduit à faible coût. (*Sources des schémas : TECHER. M*)

2.3. Analyses moléculaires

2.3.1. Extraction de l'ADN

L'ensemble des analyses moléculaires de l'ADN mitochondrial et nucléaire ont été réalisées à partir d'une ouvrière par colonie. L'ADN total de chaque ouvrière a été extrait à partir des six pattes (contenant suffisamment d'ADN disponible pour la suite des analyses) et ce en suivant le protocole présenté en Annexe 4. Par la suite, l'ADN extrait a été élué dans 100µl de tampon d'éluion et a été dosé par spectrophotométrie à l'aide du *Nanodrop V8000* dans le but de vérifier la qualité de l'extraction. Une fois les dosages effectués, tous les produits d'extraction ont été dilués à 5ng/µl d'ADN pour optimiser et harmoniser la suite des analyses.

2.3.2. Amplifications de l'ADN mitochondrial et RFLP

Pour déterminer les types et proportion des lignées maternelles d'*Apis mellifera* présentes sur l'île une PC-RFLP sur la région inter-génique des gènes *Cytochrome Oxydase I* et *II* de l'ADN mitochondrial a été réalisé (Rortais *et al.* 2011) (Encadré 1). La région inter-génique COI-COII a été amplifiée par PCR (*Polymerase Chain Reaction*) avec les amorces H2 (5'- CAA TAT CAT TGA TGA CC -3') et e2 (5'- GGC AGA ATA AGT GCA TTG -3') (Garnery *et al.* 1993):

Le volume réactionnel utilisé était de 15µL contenant 0,6µL de MgC₁₂ à 2mM, 0,9µL de dNTPs à 2mM, 3µL de buffer 5X (*Promega*), 1µL de chaque amorce de concentration 20 pmol, 0,4µL de *GoTaq Flexi*® *Promega* (5 unités/µl), 7,6µL d'H₂O et 0,5µL d'ADN extrait. L'amplification PCR a suivi le programme suivant : une étape de dénaturation à 92°C pendant 5 min ; 35 cycles avec 1 min à 92°C, 45 sec à 48°C et 2 min à 62°C ; une étape d'élongation finale à 62°C pendant 7 min. Toutes les PCR ont été réalisés sur les mêmes thermocycleurs afin d'obtenir des amplifications d'ADN similaires. 5µL de produits de l'amplification PCR ont ensuite été chargés avec avec 1µl de bleu-orange de charge (contenant du glycérol qui rend le mélange plus dense que le tampon de migration et le fait tomber au fond des puits sur des gels d'agarose à 1 ou 2% pour être passés en électrophorèse. A la fin de la migration, les produits PCR ont été révélés par un bain de bromure d'éthidium (BET = intercalant fluorescent de l'ADN) et la visualisation des bandes d'ADN a été faite sous UV à l'aide d'une caméra et du logiciel *Clara vision (perfect image V7.7)*. Une fois la qualité de l'amplification contrôlée par la présence de bandes fluorescentes, les fragments amplifiés ont été digérés par l'enzyme *DraI*.

La digestion s'est déroulée dans un volume réactionnel de 10µL contenant 1µL d'enzyme *DraI* (10 unités/µL), 1µL de buffer B 10X, 0,2µL de BSA (albumine bovine), 2,8µL d'H₂O et 5µL de produit PCR. Les volumes réactionnels ont été placés dans des étuves à 37°C (température optimale de l'activité enzymatique) pendant 24h. Pour augmenter les probabilités de rencontre enzyme-ADN et limiter le culotage des enzymes au fond des tubes par le glycérol (solvant de l'enzyme), les volumes de digestion ont été vortexés si possible toutes les 8h. Ensuite, les produits de digestions ont été visualisés sur gel d'agarose MetaPhor à 5%, ayant une meilleure résolution que l'agarose normal et permettant de mieux séparer les fragments de tailles proches.

Tableau 1 : Détails de la composition des mix microsattellites PCR avec T°(H) : température d'hybridation des amorces, nom des amorces, séquences nucléotidique, nature des motifs répétés, intervalles de tailles attendues pour les allèles et fluorochrome (ou fluorophore) utilisé pour marquer les amorces (avec indication de la couleur émise). (*Sources* : Solignac et al. 2003 et DELATTE. H)

Multiplex	T° (H)	Amorces	Séquence nucléotidique	Motifs répétés	Intervalles de tailles attendues	Fluorochrome
Mix 1	55°C	AP55-1	5'- GATCACTTCGTTTCAACCGT -3'	(TC)9..(TC)12	170 - 180 pb	PET
		AP55-2	5'- CATTCCGGTATGGTACGACCT -3'			
		A7-F	5'- GTTAGTGCCTCTCTTGC -3'			
		A7-R	5'- CCCTTCCTCTTTCATCTTCC -3'	(CT)24	90 - 150 pb	VIC
		A113-F	5'- CTCGAATCGTGGCGTCC -3'	(TC)5TT(TC)8TT(TC)5	180 - 220 pb	VIC
		A113-R	5'- CCTGTATTTTGCAACCTCGC -3'			
		AP81-1	5'- GGATCGTCGAGGCGTTGA -3'	(GT)8	120 - 140 pb	NED
		AP81-2	5'- GAAAAGTATTCCGCCGAGCA -3'			
		AC306-a	5'- GAATATGCCGCTGCCACC -3'	(CT)11	150 - 200 pb	FAM
		AC306-b	5'- TTTCGTTGCATCCGAGCG -3'			
		A24-F	5'- CACAAGTTCCAACAATGC -3'	(CT)11	80 - 105 pb	FAM
		A24-R	5'- CACATTGAGGATGAGCG -3'			
		Mix 2	52°C	AP273-a	5'- GATCTTGTGTTAAACAGCCG -3'	(CT)8
AP273-b	5'- GATCTCTGGCAGACGAAGAG -3'					
B124-1	5'- GCAACAGGTCGGGTTAGAG -3'			(CT)8..(CT)14..(GGCT)8	215 - 250 pb	PET
B124-2	5'- CAGGATAGGGTAGGTAAGCAG -3'					
A28-F	5'- GAAGAGCGTTGGTTGCAGG -3'			(AG)6(GAG)6	100 - 180 pb	FAM
A28-R	5'- GCCGTTTCATGGTTACCACG -3'					
A88-F	5'- CGAATTAACCGATTTGTGCG -3'			(CT)10..(GGA)7	70 - 150 pb	VIC
A88-R	5'- GATCGCAATTATTGAAGGAG -3'					
A107-1	5'- CCGTGGGAGGTTTATTGTGCG -3'			(CT)23	155 - 200 pb	VIC
A107-2	5'- GGTTTCGTAACGGATGACACC -3'					
AP289-a	5'- AGCTAGGTCTTTCTAAGAGTGTTG -3'			(GA)5	155 - 205 pb	NED
AP289-b	5'- TTCGACCGCAATAACATTC -3'					
A29-2	5'- CAACTTCAACTGAAATCCG -3'			(CA)24	80 - 150 pb	NED
A29-1	5'- AAACAGTACATTTGTGACCC -3'					
Mix 3	52°C			AP66-1	5'- TTGCATTCGGTCTCCAGC -3'	(CT)11
		AP66-2	5'- ACTTGCCGCGGTATCTGA -3'			
		A8-1	5'- CGAAGGTAAGGTAATGGAAC -3'	(GA)15...(GCTCG)5	120 - 220 pb	VIC
		A8-2	5'- GGCGGTTAAAGTTCTGG -3'			
		A35-1	5'- GTACACGGTTGCACGGTTG -3'	(GT)14	70 - 110 pb	FAM
		A35-2	5'- CTTCGATGGTCGTTGTACCC -3'			
		AP43-1	5'- GGCGTGCACAGCTTATTCC -3'	(TA)6GATA(GA)10	110 - 180 pb	FAM
		AP43-2	5'- CGAAGGTGGTTTCAGGCC -3'			
		A43-1	5'- CACCGAAACAAGATGCAAG -3'	(CT)12	110 - 160 pb	PET
		A43-2	5'- CCGCTCATTAAGATATCCG -3'			
		AP33-1	5'- TTTCTTTTTGTGGACAGCG -3'	(CT)15	190 - 250 pb	PET
		AP33-2	5'- AAATATGGCGAAACGTGTG -3'			
		AP36-1	5'- CTACGCGCTTACAGGGCA -3'	(GA)21	90 - 175 pb	NED
		AP36-2	5'- GCCGAAATTC AACGCTCA -3'			
		A14-1	5'- GTGTGCAATCGACGTAACC -3'	(CT)13...(GGT)9	180 - 260 pb	NED
A14-2	5'- GTCGATTACCGATCGTGACG -3'					

La révélation du nombre et des tailles de fragments de restriction après migration de 3h à 110V s'est faite avec l'association bromure d'éthidium et UV. Tous les gels ont été pris en photos et enregistrés à l'aide d'une caméra-photo et du logiciel *ClaraVision v.7* pour procéder aux lectures des profils de restriction par la suite. Les profils de restriction obtenus ont été comparés et à ceux déjà publiés (Garnery *et al.* 1998, Franck *et al.* 1998, 2001) dont certains sont présentés en annexe 3. Une fois les haplotypes déterminés, une vérification a été effectuée par le séquençage de plusieurs individus (10 individus/ profil de restriction si possible) afin de voir s'il y a bien une congruence avec les données bibliographiques.

2.3.3. Amplification ADN et géotypage des microsatellites

2.3.3.1. Amplification ADN par PCR des microsatellites

Des amplifications ADN par PCR ont été réalisées à partir de 21 couples d'amorces microsatellites nucléaires (Encadré 2) déjà décrites comme polymorphes chez *A. mellifera* : AP273, A28, A88, AP289, A107, B124, A29, AP55, A7, A113, AP81, AC306, A24, AP66, A8, A35, AP43, AP33, AP36 et A14 (Solignac *et al.* 2003) (Tab.1). Les couples d'amorces ont été marqués par des fluochromes émettant des couleurs à des longueurs d'ondes d'émission différentes et en prenant en compte les intervalles de tailles attendues (Tab.1). Cela a permis d'éviter de confondre des allèles d'un *locus* à ceux d'un autre. Les couples ont été rassemblés dans trois ensembles de multiplexage (ici appelés Mix 1, Mix 2 et Mix 3) lorsque les concentrations en $MgCl_2$ et les températures d'hybridations coïncidaient (Tab. 1). Ces regroupements ont été réalisés pour réduire le nombre de réactions nécessaires et de diminuer les coûts associés. Les réactions ont eu lieu dans un volume total de 10 μ L dont 0,5 μ L d'ADN extrait (dosé à 5ng/ μ L), 5 μ L de Master Mix Type-it 2X *Qiagen* (contenant du $MgCl_2$, des dNTPs et de la *Taq* polymérase), 0,2 μ L de chaque amorce à 20pmol/ μ L avec pour le Mix 1, 2 et 3 respectivement 1,6 μ L, 1,2 μ L et 0,8 μ L d' H_2O . Le programme PCR qui a été utilisé pour l'amplification d'ADN a été le suivant : une pré-dénaturation à 94°C pendant 5min, 35 cycles avec une étape de dénaturation pendant 30 sec à 94°C, d'hybridation pendant 30 sec à 55°C et une étape d'élongation pendant 45 sec à 72°C ; une élongation finale à 72°C pendant 20min (Fig. 8). La seule modification qui a été effectuée pour les Mix 2 et 3 est la température d'hybridation à 52°C au lieu de 55°C. Par la suite la quantité d'ADN amplifiée pour 16 individus sur 96 a été contrôlée sur des gels d'agarose à 1 ou 2% après une migration sous électrophorèse. Les produits PCR ont été révélés avec l'association bromure d'éthidium (BET) et UV à l'aide d'une caméra et du logiciel *Clara vision (perfect image V7.7)*.

2.3.2.2. Géotypage et lecture des profils

Le géotypage des individus a suivi le protocole présenté en annexe 5, et a été réalisée avec un séquenceur-géotypeur ABI 3130xL (*Applied Biosystems*). Les produits d'amplification par PCR des *loci* microsatellites ont été dilués pour éviter d'avoir des quantités d'ADN saturantes pour le géotypeur. 1 μ L de la dilution par individu a été ajouté à un 10,3 μ L de formamide (agent dénaturant de l'ADN) et 0,7 μ L du marqueur

Encadré 2 : Les marqueurs microsatellites, bons outils en génétique des populations

Les microsatellites sont des séquences non codantes constituées de motifs nucléotidiques simples (moins de 10 paires de bases) répétés en tandem (Hajeer *et al.* 2000). Ces marqueurs sont très abondants et dispersés sur l'ensemble du génome des eucaryotes (Hancock 1999). Les microsatellites ou *SSR* (*Simple Sequence Repeat*) sont des marqueurs codominants à hérédité mendélienne (transmission biparentale), hautement polymorphes (variabilité individuelle), multi-alléliques et neutres (non soumis à la sélection naturelle) (Estoup *et al.* 1993, Hughes & Queller 1993, Zane *et al.* 2002). Le polymorphisme de taille de ces marqueurs est dû à l'apparition de mutations au cours de l'évolution (délétions-insertions) et à des *crossing-over* inégaux (ajout ou suppression de motifs entiers). Leur rôle dans le génome reste encore un mystère mais leur propriété et pouvoir discriminant à l'échelle des individus et des populations en font de puissants outils en génétique des populations. Les théories en génétique des populations reposent sur des concepts de neutralité, d'indépendance et de grande variabilité auxquels les microsatellites répondent.

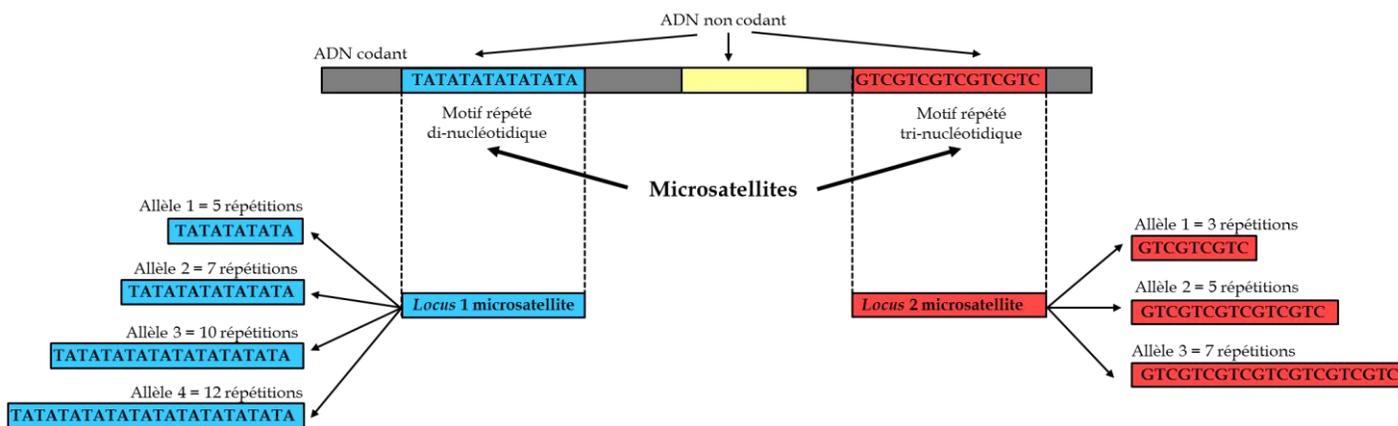


Schéma présentant deux exemples de *locus* microsatellites multi alléliques sur un brin d'ADN avec le détail des motifs nucléotidiques et du nombre de répétitions. Un allèle correspond à une taille. (*Sources des schémas : TECHER. M.*)

Le génome d'*Apis mellifera* ayant été complètement séquencé, Solignac *et al.* (2003) ont développé 550 marqueurs microsatellites polymorphes qui sont aujourd'hui très utilisés et ont permis de mener des études populationnelles chez l'abeille domestique (Estoup *et al.* 1995, Franck *et al.* 1998, Garnery *et al.* 1998, Shaibi *et al.* 2008). Les microsatellites de par leur évolution rapide et leur transmission biparentale sont préférentiellement utilisés pour comprendre ce qui se passe actuellement dans une population alors que l'ADNmt permet de retracer l'histoire évolutive (transmission maternelle).

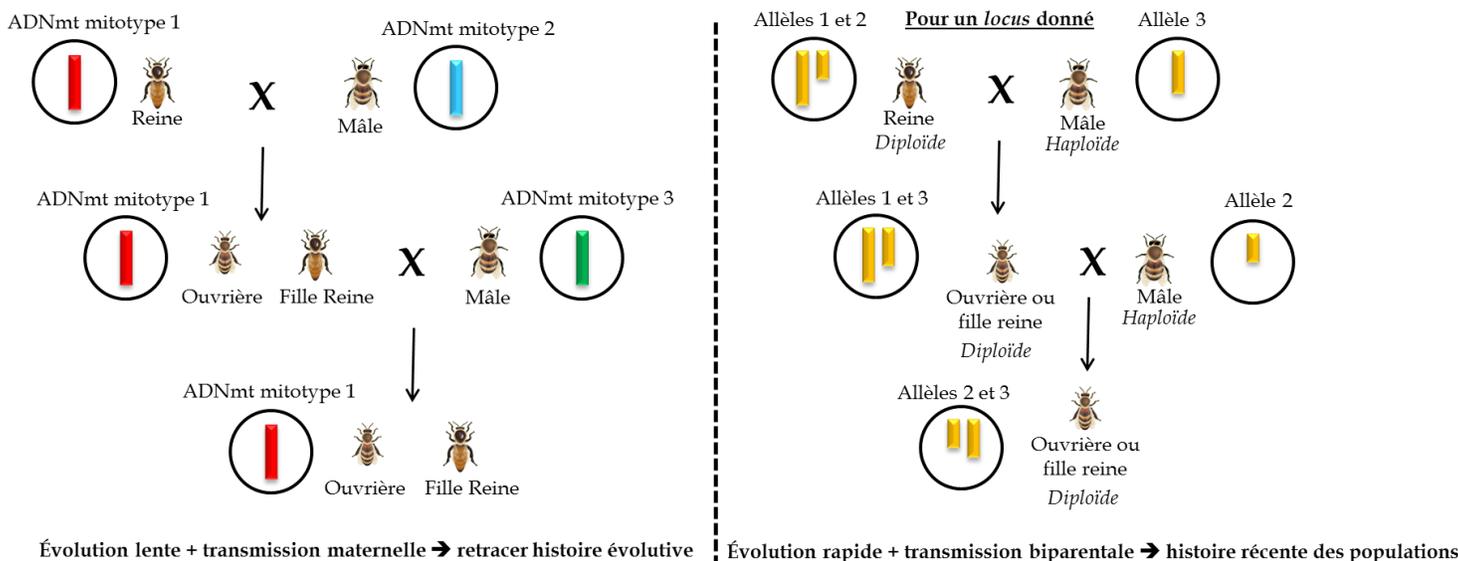


Schéma exemple de comparaison entre la transmission du patrimoine génétique mitochondrial et nucléaire chez l'abeille.

de taille marqué : *Gene Scan 500 Liz Size Standard (Applied Biosystem)* utilisé par le génotypeur en tant que référence de tailles de fragments. Le principe du génotypage est schématisé dans la figure 8. Une fois le génotypage effectué, les résultats sous formes de profils (un allèle = 1 pic) ont été lus à l'aide du logiciel *GeneMapper v.4 (Applied Biosystem)* (Fig. 8). Chaque génotype a été déterminé après plusieurs relectures en prenant bien garde aux artefacts comme les pics parasites ou « *stutters** ». Les individus ont été considérés comme correctement amplifiés et génotypés lorsque les profils de 13 *loci* (60% de réussite) ont pu être lus et déterminés.

2.3. Analyses statistiques de génétique

2.3.1. Définition des groupes pour les analyses

Afin d'analyser les données obtenues en génétique des populations, les colonies ont été regroupées par apiculteur. Cependant quatre apiculteurs ont présenté des gestions de ruchers particulières qui ont conduit à séparer des groupes de colonies selon la manière suivante (Annexe 2):

- Apiculteur 12 ➔ 12_1 (rucher « a » sédentaire à Ste Suzanne)
- ➔ 12_2 (rucher « b » sédentaire à St Gilles)
- Apiculteur 17 ➔ 17_1 (ruchers « a, b, d et e » transhumants)
- ➔ 17_2 (rucher « c » sédentaire de St Louis)
- Apiculteur 25 ➔ 25_1 (ruchers « a, c et d » transhumants)
- ➔ 25_2 (rucher « b » sédentaire de St Louis)
- Apiculteur 26 ➔ 26_1 (rucher « a » sédentaire de Ste Rose)
- ➔ 26_2 (ruchers « b, c et d » transhumants)

Même si la séparation s'effectue chez le même apiculteur, les nouveaux groupes seront nommés comme par exemple : Apiculteur 12_1 et 12_2 pour éviter une confusion de niveau entre ruchers et apiculteur dans les analyses suivantes. Les ruchers des apiculteurs restants ont été regroupés sous l'unité « apiculteur » puisque les mêmes conduites apicoles ont été appliquées (Annexe 2). Pour la suite des analyses, l'origine des colonies de l'apiculteur 19 (22 ruchers) a été considérée comme au Tampon (centre de la gestion apicole, de création des colonies et de fécondation des nouvelles reines) étant donné que les sites de récolte ne correspondent qu'aux sites temporaires de transhumances (2 ou 3 mois).

➔ Tous les apiculteurs ayant moins de 5 colonies ont été exclus des analyses statistiques de génétique suivantes.

2.3.2. Analyses préliminaires : fréquences alléliques, allèles nuls, déséquilibre de liaison

Les analyses statistiques ont été effectuées avec plusieurs logiciels gratuits disponibles sur internet (Tab. 2 et Fig. 9). Etant donné que le format d'entrée diffère d'un logiciel à un autre, le complément Excel (*Microsoft*) : GENALEx 6 (Peakall & Smouse 2006) a surtout été utilisé pour convertir les fichiers et déterminer les indices de diversité (Fig. 9). Les fréquences alléliques pour chaque *locus* ont été calculées avec le

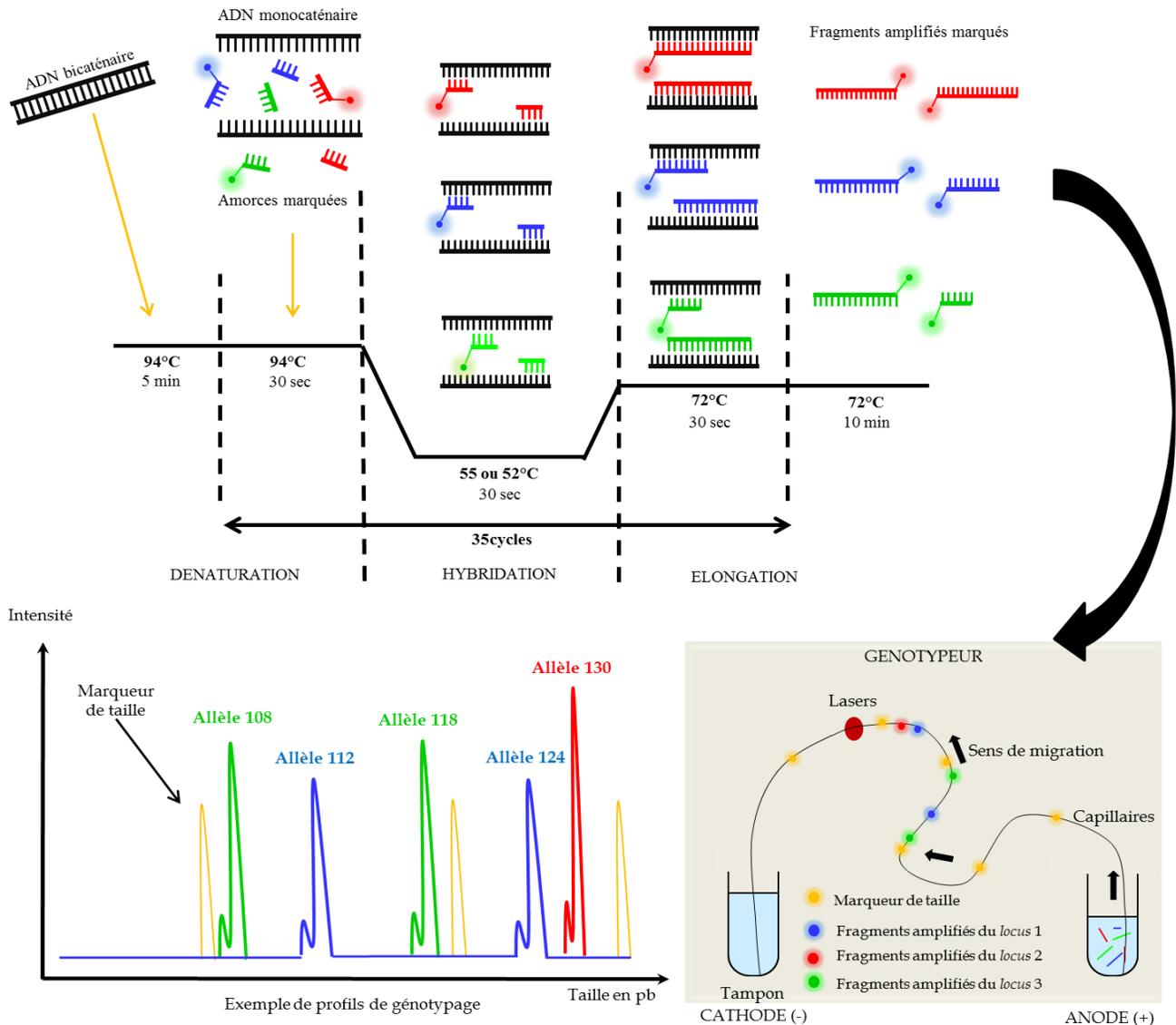


Figure 8 : Schéma des principes d'amplification d'ADN, marqué avec des fluorochromes, par méthode PCR (programme utilisé pour amplification des *loci* microsatellites de cette étude), et génotypage des individus au travers d'une électrophorèse capillaire avec exemple de sortie des profils de génotypage (représentation des allèles pour trois *loci* chez un individu). (*Source: TECHER. M*)

Encadré 3 : Le modèle d'équilibre d'Hardy-Weinberg

Le modèle d'Hardy-Weinberg suggère que tous les individus d'une population se reproduisent au hasard (panmixie) et que les fréquences alléliques sont à l'équilibre d'une génération à l'autre. Pour cela, le modèle suppose que :

- La population est en panmixie et en pangamie (croisement aléatoire des gamètes et individus)
- Fécondité identique d'un individu à l'autre
- Pas de biais méiotique
- Pas de mutations, ni de sélection, ni de migration
- L'effectif de la population est infini (pas de dérive génétique)
- Les générations sont non chevauchantes
- Individus diploïde

logiciel SPAGeDi 1.3 (Hardy & Vekemans 2002). Pour ce qui est de la fréquence des allèles nuls pour chaque apiculteur et *locus*, elle a été estimée partir du logiciel FreeNA (Chapuis & Estoup 2007) en utilisant l'algorithme EM (*Expectation-maximization*) de Dempster, Laird et Rubin (1977) et un nombre d'itérations de 10^3 . Le déséquilibre de liaison des *loci* étudiés a été calculé pour chaque paire de *loci* à l'aide du logiciel FSTAT 2.9.3.2 (Goudet 1995) en effectuant $4,2 \cdot 10^3$ permutations au seuil de risque 5% (H_0 = le génotype à un locus est indépendant du génotype à un autre locus). Cela permet de regarder l'indépendance des *loci* pris deux à deux car le déséquilibre de liaison décrit les associations préférentielles entre les allèles de deux *loci* et conduit à une perte d'information.

2.3.3. Indices de diversité et F-stats

Le nombre total d'allèles pour chaque *locus* (N) et le nombre moyen d'allèles par locus (N_a) et par apiculteur ont été calculés à partir de GENALEX 6. Des tests sur chaque apiculteur ont été menés pour voir si ceux-ci étaient à l'équilibre panmictique d'Hardy-Weinberg (tous les croisements se font au hasard, Encadré 3) en utilisant les estimateurs F-stats de Wright (1951): F_{IS} et F_{ST} .

$$\text{où } F_{IS} = 1 - H_s/H_o \text{ et } F_{ST} = 1 - H_s/H_t$$

H_t = l'hétérozygotie moyenne attendue pour tous les apiculteurs ensemble sous l'hypothèse de Hardy-Weinberg

H_s = l'hétérozygotie moyenne attendue par apiculteur sous l'hypothèse de Hardy-Weinberg

H_o = l'hétérozygotie moyenne observée par individu pour chaque apiculteur

L'estimateur F_{IS} calcule l'écart à l'équilibre de Hardy-Weinberg par rapport à la différenciation des individus à l'intérieur des populations (au travers des taux d'hétérozygotie). Il permet également d'informer sur le régime de reproduction et est un indicateur de la consanguinité. D'un autre côté, le F_{ST} mesure lui, l'écart à l'équilibre de Hardy-Weinberg dû à la différenciation des populations (apiculteurs ici) par rapport à l'ensemble considéré (tous les individus ou les individus de deux populations = apiculteurs).

D'abord, les taux d'hétérozygoties attendus (H_e) et observés (H_o) ont été calculés par locus et par apiculteur avec le logiciel Genepop 4.00.10 (on the web <http://genepop.curtin.edu.au/> Raymond & Rousset 1995). Les F_{IS} par locus et par apiculteur, ainsi que les tests exacts multi-*locus* d'écart à l'équilibre d'Hardy-Weinberg (H_0 : pas de déficit en hétérozygotes au seuil de risque 5%) ont également été effectués avec Genepop 4.00.10. La méthode utilisée a été celle des chaînes de Markov (Guo & Thompson 1992) en effectuant 10^3 itérations. Des AFC (analyse factorielle de correspondances) exploratoires ont été effectuées à partir de Genetix 4.05.2 (Belkhir *et al.* 1996-2004) pour avoir une première idée de la répartition de la diversité génétique par apiculteur. L'estimation de la différenciation génétique entre chaque apiculteur au travers des calculs de F_{ST} a été réalisée sous Arlequin 3.5.1.2 (Excoffier *et al.* 2005). Les tests statistiques sur les F_{ST} ont été effectués sur ce même logiciel en utilisant des chaînes de Markov, avec comme hypothèse nulle que la matrice testée soit proche d'une matrice de même taille sous l'hypothèse de panmixie.

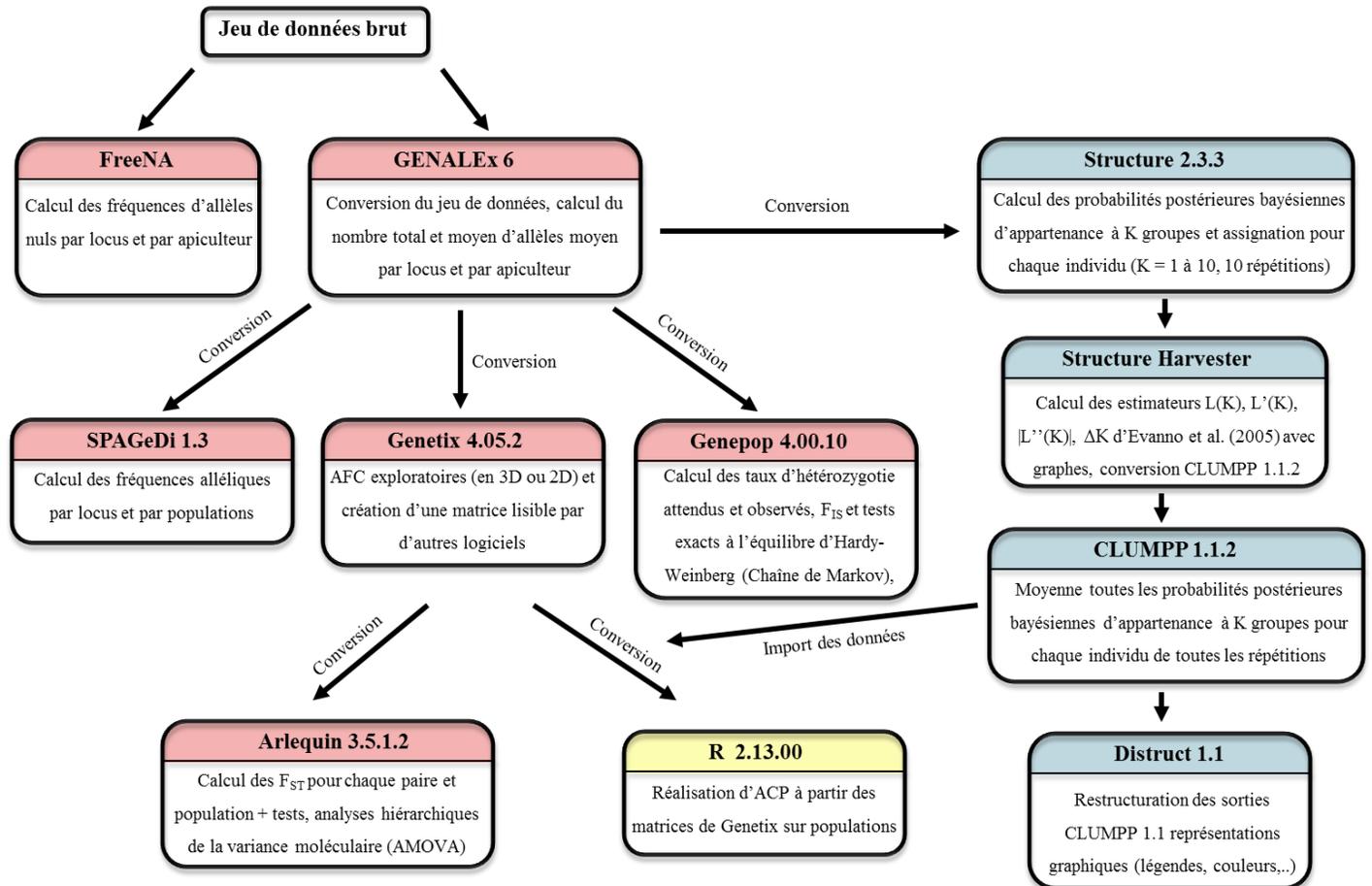


Figure 9: Schéma de la démarche analytique utilisée dans cette étude pour exploiter les données microsatellites obtenues à l'aide de différents logiciels de génétique des populations et de statistiques. (Source : TECHER M.)

Tableau 2 : Liste des logiciels gratuits utilisés pour les analyses de génétique des populations dans cette étude avec indication de la source web pour téléchargement et informations. (Source : modifié d'Excoffier & Heckel 2006)

Logiciels de génétique	Sites web
Arlequin	http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3/
FreeNA	http://www1.montpellier.inra.fr/URLB/
FSTAT	http://www2.unil.ch/popgen/software/fstat.htm
Genepop	http://ftp.cefe.cnrs.fr/PC/MSDOS/GENEPOP
GENETIX	http://www.univ-montp2.fr/~genetix/genetix/genetix.htm
GENALEx	http://www.anu.edu.au/BoZo/GenALEx/
SPAGeDi	http://www.ulb.ac.be/sciences/ecoevol/spagedi.html
Structure	http://pritch.bsd.uchicago.edu/software/structure2_1.html
Structure Harvester	http://taylor0.biology.ucla.edu/struct_harvest/
CLUMPP	http://www.stanford.edu/group/rosenberglab/clumpp.html
Distruct	http://www.stanford.edu/group/rosenberglab/distruct.html

2.3.4. Tests sur la structuration des données microsatellites

Dans l'optique de détecter une structuration des colonies en populations génétiquement différentes, le logiciel Structure 2.3.3 (Pritchard et al. 2000) a été utilisé. Ce logiciel a permis de différencier des populations sur la base des fréquences alléliques par locus. L'assignation des individus à une population s'est fondée sur les probabilités postérieures bayésiennes d'appartenance à K groupe (où K est défini par l'utilisateur). Une fois les assignations réalisées, Structure 2.3.3 donne une valeur de vraisemblance pour le K défini (valeur de *likelihood*). Il a ainsi été possible d'estimer le nombre de populations le plus vraisemblable grâce à la méthode d'Evanno *et al.* (2005) au travers d'une série de calcul se basant sur ces valeurs de vraisemblance Ln (logarithme népérien de la vraisemblance des données sachant K). Le modèle bayésien utilisé ici a supposé des croisements entre tous les individus et populations en se basant sur des corrélations de fréquences alléliques. Les résultats se sont basés sur des simulations d'1 000 000 de chaînes de Monte-Carlo avec suppression des 100 000 premières itérations. 10 répétitions de chaque $K = 1$ à 10 ont été effectuées sur le jeu de données contenant uniquement les individus correctement amplifiés (60% de réussite) pour estimer la valeur de K la plus vraisemblable. A partir du Ln ou $L(K)$ est obtenu avec le taux de variation de Ln au premier ordre $L'(K)$, au second ordre $|L''(K)|$, et pour la totalité des valeurs ΔK . Selon cette méthode, la valeur la plus vraisemblable de K apparaît lors du décrochage des valeurs de $L(K)$ et sous un pic de valeurs de ΔK . Tous les fichiers de résultats bruts ont été importés sous le programme en ligne Structure Harvester (<http://taylor0.biology.ucla.edu/structureHarvester/> Earl & vonHoldt 2012) qui a permis de calculer directement les $L'(K)$, $|L''(K)|$, et ΔK tout en les représentant graphiquement. Structure Harvester a également permis d'exporter les données brutes de Structure en format d'entrée du logiciel CLUMPP 1.1.2 (Jakobsson & Rosenberg 2007) moyennant toutes les probabilités postérieures bayésiennes d'appartenance de chaque individu à une population en considérant toutes les répétitions. Une fois que cette étape a été effectuée, les fichiers de sortie CLUMPP 1.1.2 ont été utilisés dans le logiciel Distruct 1.1 (Rosenberg 2004) qui a permis de présenter et retravailler graphiquement les sorties Structure pour les K choisis (modification de couleurs, étiquettes, ...).

Une analyse exploratoire multivariée des données microsatellites avec une ACP (Analyse en composantes principales) a permis de représenter graphiquement la variabilité des individus et des populations définies par STRUCTURE 2.3.3. L'ACP a été réalisée avec le logiciel statistique R 2.13.00 (Ihaka & Gentleman 1996) en utilisant les packages « MASS », « adegenet » et « ade4 » à partir d'un fichier Genetix. Les *eigenvalues* (ou valeurs des axes factoriels) ont été calculés pour vérifier la valeur statistique de l'ACP.

La structure génétique et le niveau de différenciation des individus en groupes définis ont été testés et calculés à l'aide d'AMOVA (Analyses hiérarchisées de la variance moléculaire) sous Arlequin 3.5.1.2 (Excoffier *et al.* 2005). Les groupes définis pour ces AMOVA, ont été les groupes mitochondriaux (races ancestrales) et les groupes géographiques (en fonction de la localisation NORD, EST, OUEST, SUD et CENTRE).

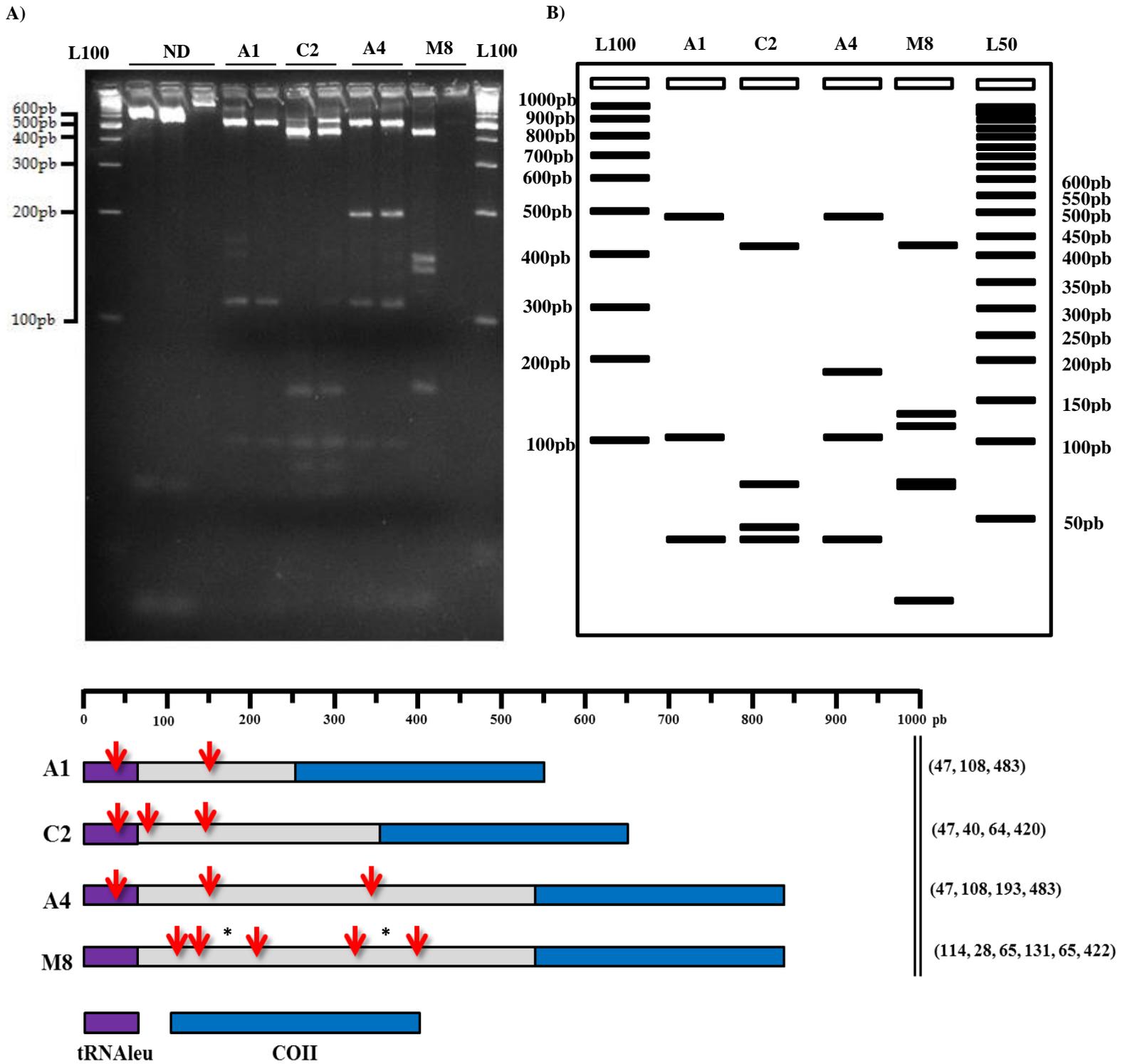


Figure 10 : En A) Photo d'un gel de migration (MetaPhor 5%) avec L = échelle de taille de 100pb, avec en ND les produits d'amplification PCR de la région intergénique COI-COII non digérés par l'enzyme *DraI* et les quatre profils de restrictions obtenus après digestion *DraI* (A1, C2, A4 et M8). En B) Schéma détaillé d'un gel avec les différents fragments obtenus avec digestion *DraI* sur les quatre haplotypes détectés avec L50 et L100 les échelles de taille de 50 et 100pb respectivement. En C) Schéma des longueurs des séquences amplifiées, sites de restriction (→) et tailles des fragments de restriction (les astéris indiquent des fragments de tailles identiques) chez les colonies d'*Apis mellifera* à La Réunion (Source : *TECHER. M et C) inspiré de Franck et al. 2001 et De la Ruà et al. 2001*)

3. RÉSULTATS

3.1. Diversité mitochondriale et lignées maternelles

Sur les 1881 échantillons d'ADN extraits, la région inter génique COI-COII a été correctement amplifiée pour 1760 d'entre eux (soit 6,43% des colonies dont la lignée maternelle n'a pas été déterminée). La visualisation sur gels des produits d'amplification PCR a permis de détecter trois fragments différents, de taille comprise entre 500pb et 800pb (Fig. 10A). Après digestion des fragments amplifiés par l'enzyme *DraI*, quatre profils de restrictions ont pu être observés (Fig. 10A, B, C). D'après le nombre et la taille des fragments de restriction, ces profils correspondent à quatre haplotypes connus: A1, C2, A4 et M8 (Garnery *et al.* 1992, Franck *et al.* 2001 et De la Ruà *et al.* 2001). L'identification des haplotypes a été confirmée par le séquençage du fragment amplifié entier (Fig. 10C). Les séquences de 65 individus pris au hasard dans le groupe mitochondrial A1, 25 pour le groupe C2, trois pour A4 et trois pour M8 ont été comparés à celles déjà répertoriées dans la base de données en ligne GenBank (NCBI). Ainsi, l'algorithme « Blastn » a trouvé des séquences présentant 100 % d'identité nucléotidique sur les séquences complètes avec les profils C2 (accession GU979499), A4 (accession FJ477987) et M8 (accession FJ478007). En revanche, la comparaison des séquences d'individus ayant des profils de restrictions indiquant l'haplotype A1 montre une similarité nucléotidique de 95 à 99% avec plusieurs autres haplotypes : A25 (FJ477989) A27 (FJ477983), A9 (FJ477982) et notamment A1 (AF503555). Les séquences des 65 individus avec l'haplotype A1 ont été comparées avec les séquences d'*Apis mellifera unicolor* de Madagascar (Delatte *et al.* données non publiées) et il en ressort des similarités nucléotidiques de 100%. Les haplotypes A1 et A4 correspondent donc à deux sous-espèces de lignée Africaine : *Apis mellifera unicolor* et *Apis mellifera scutellata* respectivement. En revanche, les haplotypes C2 et M8 trouvés correspondent à des haplotypes de deux sous-espèces de lignées Européennes C : *Apis mellifera carnica* et M *Apis mellifera iberiensis*.

L'haplotype majoritaire sur l'île est A1, présent chez 1675 colonies (95,17%) tandis que les trois autres haplotypes sont plus rares avec C2 retrouvé chez 77 colonies (4,38%), A4 chez trois colonies (0,17%) et M8 chez cinq colonies (0,28%) (Fig. 11A). L'haplotype A1 a été retrouvé chez tous les apiculteurs (n = 51) et chez toutes les colonies sauvages (n =15 où sauvage 1 provient en fait d'un rucher Annexe 2). Il s'étend donc sur toute l'île Fig. 11B y compris les cirques de Cilaos et Mafate ou encore sur le site isolé de Grand Bassin. (Fig. 11B). Malgré la plus faible proportion de l'haplotype C2, celui-ci est présent sur 27 ruchers différents dont Grand Bassin, échantillonnés chez un total de 16 apiculteurs. Cet haplotype est plus fréquent dans le Sud de l'île (soit 54 colonies) où l'effort d'échantillonnage a été le plus élevé (1035 colonies) que dans l'Est (13 colonies), le Nord (9 colonies) et l'Ouest (1 colonie). Pour ce qui est des haplotypes les plus rares (<1%) A4 et M8, ils sont restreints à la zone Sud de l'île sur respectivement deux et quatre sites (Fig. 11B). Dans les cirques de Cilaos et Mafate, seul l'haplotype A1 a été détecté.

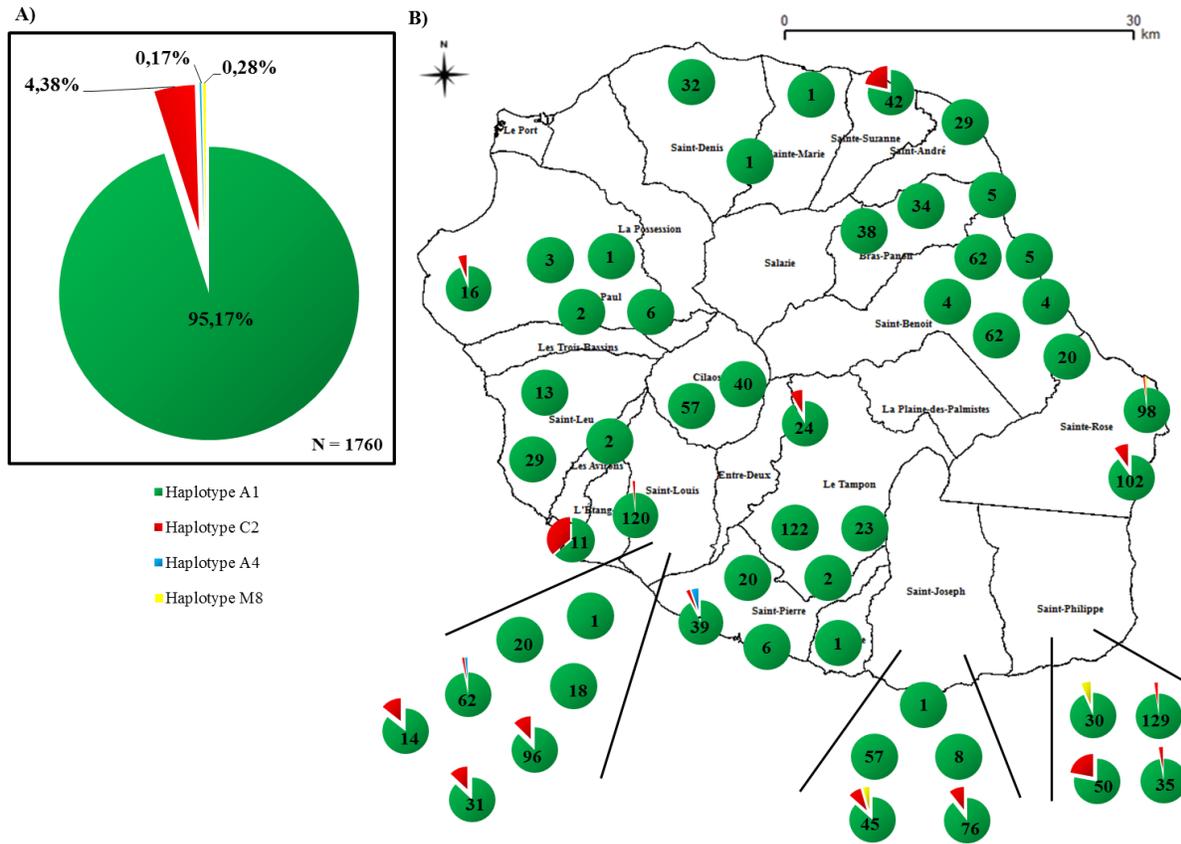


Figure 11 : En A) Proportion de chaque haplotype mitochondriaux de la région COI-COII, détecté sur 1760 colonies d’*Apis mellifera* à La Réunion et en B) répartition et proportion des haplotypes selon l’apiculteur ou la colonie sauvage avec au centre des diagrammes le nombre de colonies totales pour chaque site. (*Source carte : QGIS couche IGN*)

Tableau 3 : Indices de diversité génétique par locus avec N : nombre d’allèles total, He : taux d’hétérozygotie attendu (+ écart-type), Ho : taux d’hétérozygotie observé (+ écart-type), Fis et HW : significativité des tests à l’équilibre d’Hardy-Weinberg avec * p-value > 0,05 et ns p-value < 0,05. (*Sources : Genalex, Genetix et Genepop*)

Locus microsatellite	N	He	Ho	FIS	HW
A8	23	0,675 (± 0,040)	0,350 (± 0,039)	0,481	*
A29	22	0,536 (± 0,039)	0,478 (± 0,042)	0,110	*
A43	22	0,536 (± 0,033)	0,490 (± 0,046)	0,085	*
AP36	19	0,469 (± 0,037)	0,291 (± 0,036)	0,380	*
A113	18	0,588 (± 0,033)	0,612 (± 0,038)	-0,041	*
B124	16	0,631 (± 0,042)	0,660 (± 0,046)	-0,047	*
A107	14	0,523 (± 0,039)	0,495 (± 0,039)	0,054	*
AP33	14	0,446 (± 0,033)	0,436 (± 0,041)	0,024	*
AP289	13	0,151 (± 0,019)	0,120 (± 0,023)	0,206	*
AP66	12	0,528 (± 0,026)	0,587 (± 0,034)	-0,111	*
A14	11	0,498 (± 0,026)	0,568 (± 0,039)	-0,142	ns
A35	11	0,591 (± 0,032)	0,631 (± 0,036)	-0,067	*
AP55	10	0,546 (± 0,029)	0,615 (± 0,036)	-0,128	ns
AX	10	0,572 (± 0,032)	0,240 (± 0,038)	0,580	*
A88	10	0,503 (± 0,037)	0,531 (± 0,041)	-0,054	*
AP28	10	0,514 (± 0,036)	0,258 (± 0,030)	0,497	*
AP306	8	0,556 (± 0,030)	0,419 (± 0,034)	0,245	*
AP81	8	0,479 (± 0,031)	0,287 (± 0,032)	0,402	*
A7	7	0,556 (± 0,024)	0,641 (± 0,038)	-0,153	*
A24	6	0,545 (± 0,024)	0,630 (± 0,037)	-0,155	ns
AP273	5	0,421 (± 0,026)	0,469 (± 0,039)	-0,115	ns
Moyenne + écart-type:	12,81 (± 5,37)	0,517 (± 0,102)	0,467 (± 0,157)		

3.2. Diversité génétique nucléaire

Au total, 1588 individus ont été génotypés avec succès avec un minimum de 13 *loci*. Si pour la majorité des *loci*, les allèles ont pu être déterminés sans ambiguïté, la lecture des profils de génotypage pour le locus AP43 s'est avérée difficile et pour éviter de biaiser les analyses suivantes par des erreurs de codage, ce locus a été éliminé. Comme il a été montré dans l'étude de Sadeyen & Techer 2011, les amorces A7-1 et A7-2 amplifient deux *loci* microsatellites qui ont été renommés A7 et AX pour cette étude. Les 15 colonies sauvages isolées ainsi que les huit apiculteurs ayant fournis moins de cinq colonies (ou mauvaises amplifications) ont été supprimées des analyses (Apiculteurs 4, 7, 8, 20, 23, 33, 48, 49).

Sur les 210 combinaisons de paires de loci, seules 15 sont significativement liés (p -value $> 0,05$) mais ce résultat est négligeable et donc les 21 *loci* ont été conservés pour la suite des analyses. Il est à préciser que les paires AX et A7 n'ont pas été trouvées significativement liées. Sur l'ensemble des individus, toutes origines confondues, le nombre d'allèles par *locus* varie de 5 allèles pour AP273 à 23 allèles pour A8, et le nombre d'allèles moyen par locus est de 12,81 ($\pm 5,37$) (Tab. 3). Les *loci* les plus polymorphes sont A8, A29 et A43 (> 20 allèles au total) contrairement à A24 (6 allèles) et AP273 (5 allèles) peu polymorphes (Tab. 3). Le détail des fréquences alléliques pour chaque locus est présenté dans l'annexe 6. Des allèles utilisés dans le diagnostic de présence de lignée maternelle ont été détectés : 101 (codé en paire ici 100), 103 (102), 105 (104) pour le locus A24, 232 et 234 pour le locus A113 (De la Rúa *et al.* 2002a). Sur les 21 *loci* microsatellites, 17 ont des valeurs de F_{IS} indiquant une déviance significative à l'équilibre d'Hardy-Weinberg due à un excès d'hétérozygotes pour les loci A113, A7, A88, B124, A35 et AP66 (P -value $> 0,05$) et 11 autres *loci* dû à un déficit en hétérozygotes (Tab. 3). Néanmoins si les F_{IS} sont significatifs, le déficit global en hétérozygotes est faible avec un taux attendu de 0,517 ($\pm 0,102$) alors que le taux observé est de 0,467 ($\pm 0,157$) (Tab. 3).

Les fréquences d'allèles nuls sont négligeables par apiculteur avec en moyenne 8,88% ($\pm 0,01$). Seules neuf populations ont des fréquences d'allèles nuls comprises entre 10,0 et 12,0% mais aucune ne se distingue significativement des autres (Tab. 4).

Pour ce qui est du nombre moyen d'allèles par *loci* et par apiculteur, il varie de 2,80 pour l'apiculteur 9 ($n = 5$ colonies) à 8,33 pour l'apiculteur 22 ($n = 199$ colonies). Un déficit d'hétérozygotes a été observé chez tous les apiculteurs allant de 16,4% de différence pour l'apiculteur 41 à 7% pour l'apiculteur 32 (Tab. 4). Les valeurs de F_{IS} confirment la déviance des populations au modèle d'équilibre panmictique d'Hardy-Weinberg avec une significativité chez tous les apiculteurs échantillonnés (p -value $> 0,05$).

La différenciation génétique entre chaque paire d'apiculteur a été évaluée par les calculs de F_{ST} avec des valeurs allant de -0,074 (Apiculteur 11 et 51) à 0,116 (Apiculteur 9 et 17_2) (Annexe 7). Le groupe de colonies de l'apiculteur 17_2 se différencie systématiquement des autres apiculteurs (exceptés les 35, 47 et 51) dont l'apiculteur 17_1 ($F_{ST} = 0,060$, p -value $> 0,05$) et très fortement des apiculteurs 11 et 9 (respectivement $F_{ST} =$

Tableau 4 : Indices de diversité génétique par population d'apiculteurs ayant un effectif minimale de 5 colonies avec Na : nombre moyen d'allèles par locus, He : taux d'hétérozygotie attendu (+ écart-type), Ho : taux d'hétérozygotie observé (+ écart-type), Fis et HW : significativité des tests à l'équilibre d'Hardy-Weinberg avec * p-value > 0,05 et ns p-value < 0,05. (*Sources* : Genalex, Genepop, Genetix et FreeNA)

Groupe	Effectif	Na	He	Ho	Fis	HW	Allèles nuls
Apiculteur 4	2	/	/	/	/	/	/
Apiculteur 7	4	/	/	/	/	/	/
Apiculteur 8	4	/	/	/	/	/	/
Apiculteur 9	5	2,67	0,483 (± 0,219)	0,368 (± 0,306)	0,248	*	0,114
Apiculteur 10	20	5,05	0,608 (± 0,142)	0,571 (± 0,235)	0,043	*	0,059
Apiculteur 11	26	5,14	0,590 (± 0,172)	0,454 (± 0,256)	0,217	*	0,100
Apiculteur 12_1	33	6,38	0,613 (± 0,035)	0,479 (± 0,048)	0,216	*	0,094
Apiculteur 12_2	16	4,81	0,594 (± 0,022)	0,484 (± 0,052)	0,186	*	0,094
Apiculteur 13	5	3,38	0,553 (± 0,168)	0,441 (± 0,210)	0,170	*	0,079
Apiculteur 14	59	7,57	0,669 (± 0,141)	0,523 (± 0,209)	0,223	*	0,097
Apiculteur 15	20	5,52	0,633 (± 0,115)	0,484 (± 0,176)	0,239	*	0,101
Apiculteur 16	16	5,00	0,621 (± 0,143)	0,471 (± 0,239)	0,229	*	0,103
Apiculteur 17_1	48	7,14	0,620 (± 0,038)	0,483 (± 0,051)	0,249	*	0,090
Apiculteur 17_2	7	3,43	0,513 (± 0,036)	0,421 (± 0,051)	0,186	*	0,070
Apiculteur 18	40	6,57	0,642 (± 0,136)	0,517 (± 0,206)	0,194	*	0,087
Apiculteur 19	115	8,29	0,649 (± 0,152)	0,506 (± 0,209)	0,202	*	0,088
Apiculteur 20	1	/	/	/	/	/	/
Apiculteur 21	25	6,05	0,636 (± 0,163)	0,502 (± 0,223)	0,179	*	0,089
Apiculteur 22	119	8,33	0,645 (± 0,133)	0,517 (± 0,198)	0,188	*	0,086
Apiculteur 23	2	/	/	/	/	/	/
Apiculteur 24	11	5,19	0,624 (± 0,115)	0,544 (± 0,237)	0,113	*	0,083
Apiculteur 25_1	80	8,14	0,655 (± 0,030)	0,510 (± 0,041)	0,215	*	0,089
Apiculteur 25_2	19	5,24	0,623 (± 0,029)	0,539 (± 0,057)	0,117	*	0,084
Apiculteur 26_1	31	5,71	0,623 (± 0,034)	0,479 (± 0,046)	0,211	*	0,098
Apiculteur 26_2	64	7,33	0,647 (± 0,033)	0,489 (± 0,046)	0,218	*	0,098
Apiculteur 27	12	4,67	0,594 (± 0,159)	0,479 (± 0,213)	0,178	*	0,092
Apiculteur 28	28	5,71	0,604 (± 0,174)	0,481 (± 0,183)	0,176	*	0,078
Apiculteur 29	34	6,38	0,606 (± 0,139)	0,445 (± 0,211)	0,268	*	0,109
Apiculteur 30	61	6,95	0,589 (± 0,176)	0,451 (± 0,247)	0,258	*	0,104
Apiculteur 31	45	6,86	0,635 (± 0,139)	0,507 (± 0,245)	0,195	*	0,090
Apiculteur 32	7	3,81	0,588 (± 0,195)	0,566 (± 0,310)	0,044	*	0,065
Apiculteur 33	1	/	/	/	/	/	/
Apiculteur 34	81	7,71	0,619 (± 0,141)	0,503 (± 0,205)	0,195	*	0,084
Apiculteur 35	45	6,86	0,664 (± 0,129)	0,516 (± 0,219)	0,214	*	0,104
Apiculteur 36	48	6,86	0,636 (± 0,154)	0,518 (± 0,211)	0,177	*	0,082
Apiculteur 37	26	5,67	0,594 (± 0,154)	0,506 (± 0,227)	0,148	*	0,075
Apiculteur 38	45	6,67	0,640 (± 0,122)	0,514 (± 0,192)	0,201	*	0,086
Apiculteur 39	53	6,52	0,633 (± 0,139)	0,511 (± 0,207)	0,215	*	0,085
Apiculteur 40	26	5,57	0,611 (± 0,149)	0,511 (± 0,243)	0,148	*	0,085
Apiculteur 41	14	5,14	0,644 (± 0,158)	0,480 (± 0,250)	0,231	*	0,111
Apiculteur 42	6	3,43	0,586 (± 0,150)	0,460 (± 0,331)	0,235	*	0,120
Apiculteur 43	20	6,00	0,626 (± 0,124)	0,524 (± 0,223)	0,181	*	0,083
Apiculteur 44	95	8,33	0,650 (± 0,136)	0,519 (± 0,190)	0,195	*	0,090
Apiculteur 45	36	5,81	0,588 (± 0,142)	0,453 (± 0,170)	0,219	*	0,086
Apiculteur 46	14	4,81	0,622 (± 0,179)	0,598 (± 0,281)	0,029	*	0,058
Apiculteur 47	21	5,71	0,666 (± 0,106)	0,618 (± 0,232)	0,065	*	0,062
Apiculteur 48	1	/	/	/	/	/	/
Apiculteur 49	1	/	/	/	/	/	/
Apiculteur 50	52	6,43	0,633 (± 0,173)	0,527 (± 0,253)	0,156	*	0,080
Apiculteur 51	38	5,95	0,606 (± 0,160)	0,477 (± 0,228)	0,205	*	0,095
Sauvage	6	/	/	/	/	/	/
Total =	1588						

0,104 et 0,116 ; p -value > 0,05). L'apiculteur 12_1 est le deuxième groupe de colonies à le plus se différencier des autres apiculteurs (18 paires) avec des valeurs de F_{ST} significatives mais inférieures à 0,100. En revanche, le groupe de colonies de l'apiculteur 12_1 ne se différencie pas significativement du groupe de colonies de l'apiculteur 12_2. Les apiculteurs 11, 14, 17_1, 18, 21, 25_2, 26_1 et 2, 35 et 47 se différencient tous significativement d'au moins 10 autres groupes. Les apiculteurs 25_1 et 25_2 est se différencie faiblement mais significativement avec des valeurs significatives de F_{ST} observés de 0,002 et la même observation est faite pour les apiculteurs 26_1 et 26_2 ($F_{ST} = 0,003$, p -value > 0,05). Enfin l'apiculteur 13 ne se différencie pas significativement de l'ensemble des autres apiculteurs excepté l'apiculteur 17_2 ($F_{ST} = 0,055$, p -value > 0,05) et les apiculteurs 10 ne se différencie que de l'apiculteur 17_2 ($F_{ST} = 0,056$, p -value > 0,05) et 43 ($F_{ST} = 0,004$, p -value > 0,05).

3.3 Structuration des populations

Les analyses bayésiennes de recherche de structuration réalisées par STRUCTURE montrent un décrochage des valeurs de vraisemblance des données à $K = 3$ ($\Delta K = 83,94$) selon la méthode d'Evanno *et al.* (2005) (Fig. 12). Cette structuration des données microsatellites en trois groupes génétiques (nommés populations ci-après) est représentée par trois couleurs différentes (population 1 = bleu, population 2 = rouge et population 3 = jaune) sur la figure 13. L'apport du $K = 3$ par rapport au $K = 2$ est la différenciation du groupe rouge en population 1 (bleu) et 2 (rouge) et à $K = 4$ la population 2 se différencie des trois autres. La représentation graphique de la structuration à $K = 3$ permet de voir qu'un grand nombre d'individus sont assignés à plusieurs groupes représentés par un mélange des trois couleurs. Seuls 254 individus appartiennent à la population 1, 256 à la population 2 et 326 à la population 3 au seuil de probabilité postérieure d'appartenance choisit de 70%. Les individus appartenant à la population 1 sont essentiellement retrouvés chez les apiculteurs 11, 12_2, 14, 21, 25_2, 26_2, 7, 8 et 9. Tandis que les individus appartenant à la population 2 proviennent surtout des apiculteurs 12_1, 37 à 44, et 45. Chez l'apiculteur 16, les individus sont majoritairement assignés à la population 3 excepté pour un individu. Pour l'apiculteur 44, les colonies du rucher « a » appartiennent à la population 2 tandis que la majorité du rucher « b » appartient à la population 3 (Fig. 13 et annexe 2). Un apiculteur peut avoir des colonies appartenant à la population 1, d'autres à la population 2 et encore d'autres à la population 3 comme c'est le cas pour l'apiculteur 22 ou encore 25_1.

Cette structuration en trois groupes est aussi observée par un autre type d'analyse (exploratoire) basé sur des distances euclidiennes (ACP) (Fig. 14). Lorsque tous les individus sont assignés à une population (seuil de probabilité à 30%) (Fig. 14A) alors il devient difficile d'observer la structuration, en revanche en ne représentant que les individus avec une probabilité postérieure supérieure ou égale à 70% alors trois groupes de points sont discernables (Fig. 14B). Toutefois, les ellipses de confiance des trois populations se chevauchent, avec des individus de la population 1 plus proches génétiquement des individus de la population 2 et ainsi de

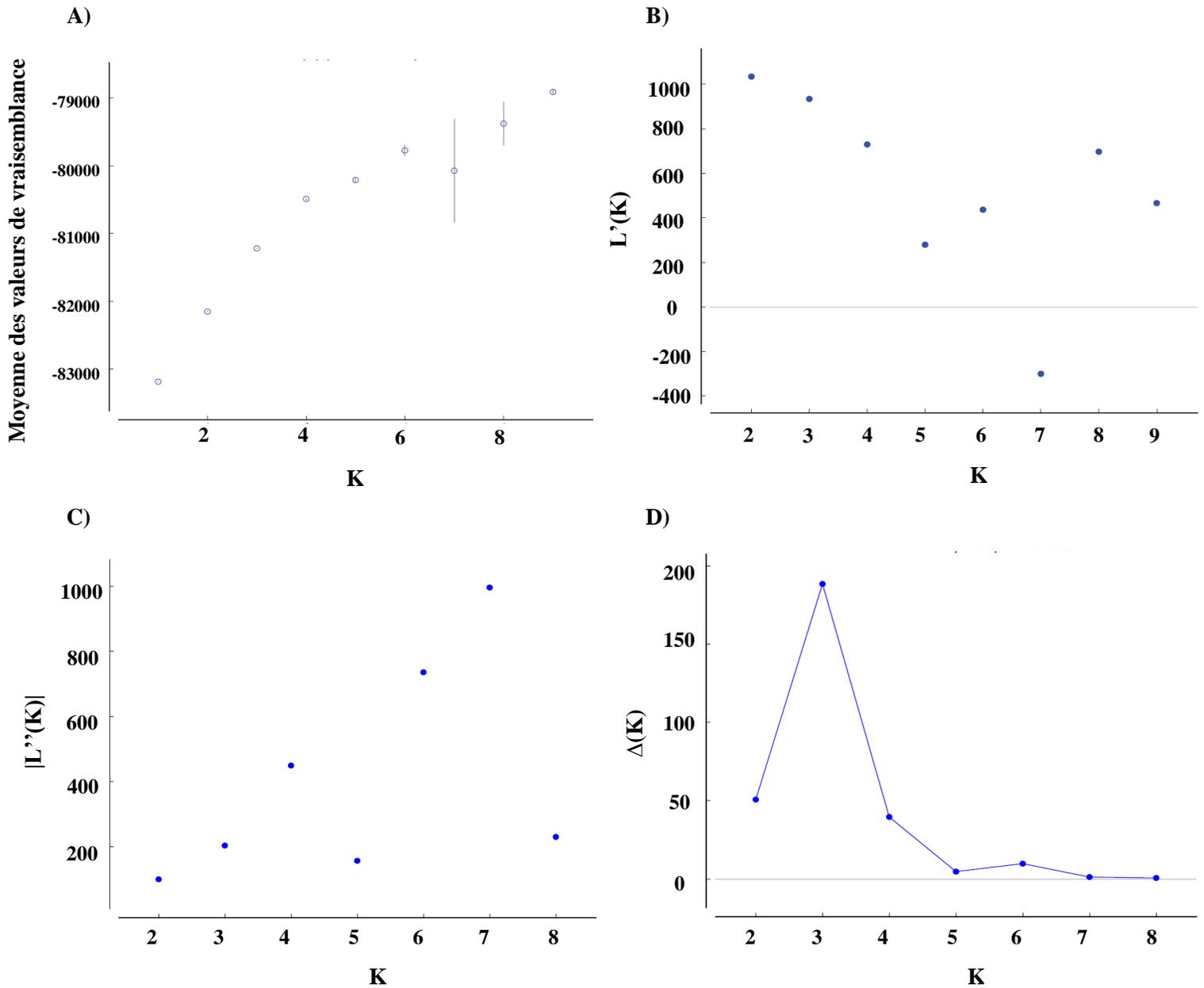


Figure 12 : Détermination du K optimal selon la méthode de calcul d'Evanno *et al.* 2005 avec en A) $L(K)$ en fonction de K où $L(K)$ est la vraisemblance des données sachant K, B) $L'(K)$ en fonction de K où $L'(K) = L(K) - L(K-1)$, C) $|L''(K)|$ en fonction de K où $|L''(K)| = |L'(K+1) - L'(K)|$ et en D) $\Delta(K)$ en fonction de K où $\Delta(K) = m(|L''(K)|)/s[L(K)]$ avec m = moyenne de toutes les répétitions de chaque K et s = écart-type. (Sources : STRUCTURE 2.3.3 et modifié de STRUCTURE HARVEST http://taylor0.biology.ucla.edu/struct_harvest/)

suite. En revanche, cette analyse n'a aucune valeur d'un point de vue statistique si l'on se base sur la valeur des axes (moins de 5% de la variance entre les 42 variables = 42 allèles expliquée par les facteurs choisis).

Les résultats des AMOVA réalisées pour tester une structuration en fonction des groupes mitochondriaux montrent les groupes mitochondriaux ($N_{A1} = 1447$, $N_{C2} = 63$, $N_{A4} = 3$ et $N_{M8} = 5$ colonies) n'explique que 0,07% de (p-value = $0,021 < 0,05$) de la variance totale. La quasi-totalité de la variance (99,92%) est expliquée au niveau intra-apiculteur (intra-rucher pour les apiculteurs 12_1, 12_2, 17_1, 17_2, 25_1, 25_2, 26_1 et 26_2) (Tab. 5A). Les groupes géographiques n'expliquent aucune variation (p-value = $0,582 > 0,05$) et toute la variation expliquée reste au sein des apiculteurs (Tab. 5B).

4. DISCUSSION

Cette étude a permis non seulement de caractériser la diversité génétique des colonies d'*Apis mellifera* à La Réunion mais aussi d'identifier les différentes lignées évolutives présentes sur l'île.

4.1. Diversité des sous-espèces d'*Apis mellifera* à La Réunion

Les analyses moléculaires de l'ADN mitochondrial sur les colonies d'*Apis mellifera* à La Réunion ont mis en exergue la présence de quatre haplotypes A1, A4, C2 et M8 avec une prédominance (>95%) de l'haplotype A1. Cette dernière observation corrobore les résultats de l'étude de Franck *et al.* (2001) qui avaient déjà mis en évidence la présence de l'haplotype A1 sur l'île ($n = 20$ individus). La transmission exclusivement maternelle de l'ADN mitochondrial permet de caractériser une colonie à partir d'un seul individu et de connaître son origine évolutive maternelle (Meusel & Moritz 1990). Néanmoins, les profils mitochondriaux obtenus à partir de la méthode RFLP de Garnery *et al.* (1993) ne permettent pas de définir la date d'arrivée des lignées maternelles sur l'île sans analyses approfondies. Toutefois il peut être dit, que l'île de La Réunion abrite quatre lignées maternelles d'*Apis mellifera* appartenant aux lignées évolutives Africaines (A) Nord-Européenne (M) et Sud-Européenne (C) (Garnery *et al.* 1992). La présence de plusieurs lignées maternelles informe sur une cohabitation passée et/ou présente de plusieurs sous-espèces : *Apis mellifera unicolor* (A1), *Apis mellifera scutellata* (A4), *Apis mellifera carnica* (C2) et *Apis mellifera iberiensis* (M8) (Ruttner 1988). La présence de colonies de lignée maternelle *Apis mellifera unicolor* et *Apis mellifera carnica* sur l'île avait déjà été rapportée par l'étude morphologique de Schneider (1989). En revanche, la détection d'haplotype d'*Apis mellifera scutellata* et *Apis mellifera iberiensis* est pour la première fois décrite à La Réunion par la présente étude. La diversité haplotypique d'*Apis mellifera* à La Réunion est légèrement plus faible que sur les îles tempérées Européennes faisant partie de la zone dynamique apicole, avec neuf haplotypes à Madère ($n = 48$), cinq aux Açores ($n = 50$) (De la Rúa *et al.* 2006), cinq sur les îles Canaries ($n = 117$) (Franck *et al.* 2001).

La forte proportion de colonies ancestralement issues de la sous-espèce *Apis mellifera unicolor* répond à une logique géographique, étant donné la proximité de La Réunion par rapport à Madagascar. Les résultats indiquent donc l'existence d'une relation entre La Réunion et Madagascar d'où cette sous-espèce est originaire

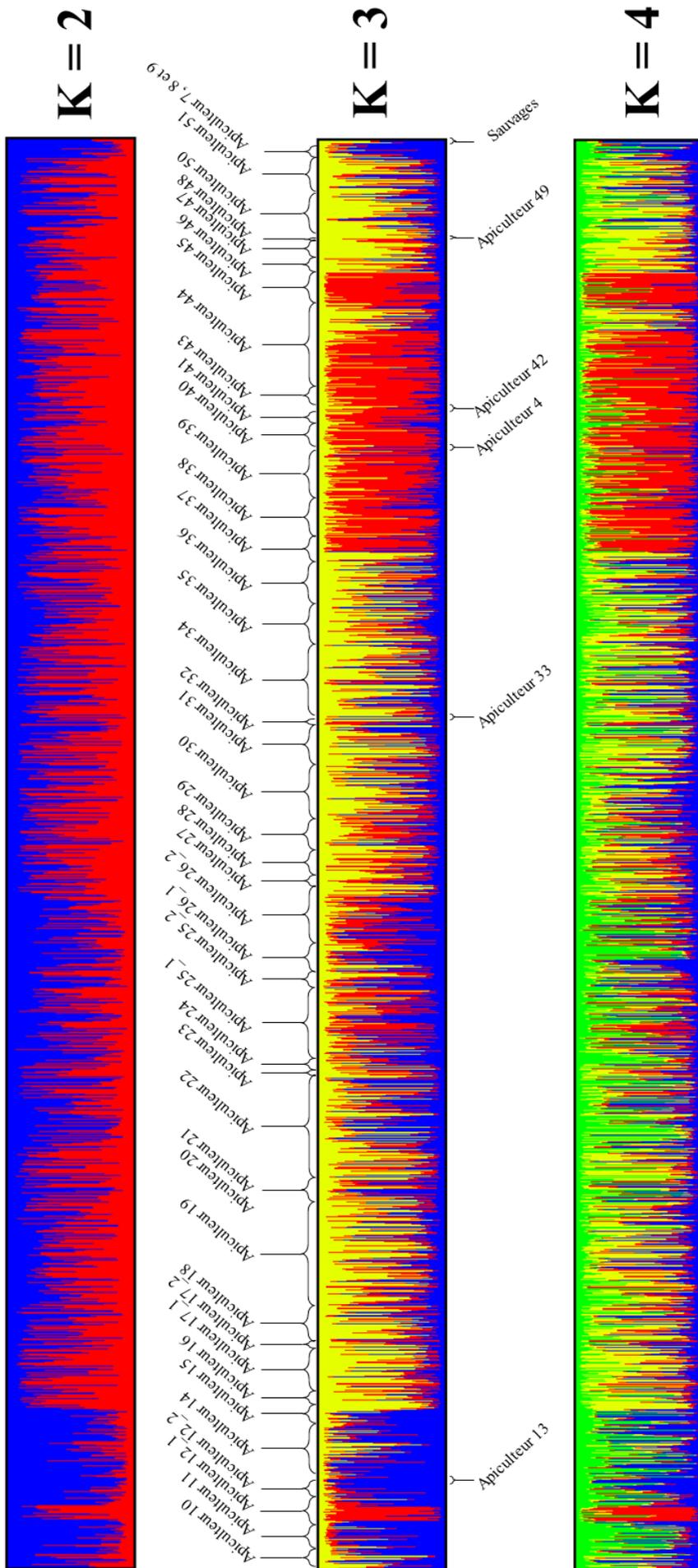


Figure 13 : Représentation graphique de la sortie STRUCTURE selon $K = 2, 3$ ou 4 , où chaque barre représente un individu et chaque couleur la probabilité postérieure d'appartenance bayésienne à une population (Population 1 = Bleu, Population 2 = Rouge, Population 3 = Jaune, Populations 4 = vert) avec $N = 1588$ individus / colonies d'*Apis mellifera* à La Réunion. (Sources = STRUCTURE 2.3.3 et Distruct 1.1)

et endémique (Ralalaharisoa *et al.* 1996). L'origine de son arrivée sur l'île reste floue quant à savoir si elle était présente avant l'arrivée de l'Homme comme le suggèrent Boucher (1941) et Hermann (1920) ou bien introduite à partir de 1964 (Dubois 1964). En revanche, la distribution des colonies de lignée *Apis mellifera unicolor* sur toute l'île (Nord-Sud, Ouest-Est, les bas et hauts) y compris dans les cirques permet de supposer que la colonisation est plus ancienne que pour les autres lignées (Cánovas *et al.* 2007). Sa dominance sur les autres lignées maternelles peut s'expliquer par une adaptation aux conditions environnementales comme il a été vu de façon plus extrême chez les populations d'*Apis mellifera jementica* d'Arabie (Alqarni *et al.* 2011) et par une forte compétitivité dans l'exploitation des ressources. Une autre explication serait que les pratiques apicoles favoriseraient la multiplication des colonies de lignée Africaine *Apis mellifera unicolor* par l'élevage de reine ou par la sélection en privilégiant les colonies les plus productives et les moins agressives comme *Apis mellifera ligustica* (Jensen *et al.* 2005, Bouga *et al.* 2011).

Si l'haplotype A1 d'*Apis mellifera unicolor* est majoritaire, il n'en reste pas moins qu'un nombre important de colonies (5%) ont été identifiées avec l'haplotype Européen (Nord-Méditerranée) C2 de l'abeille carnolienne *Apis mellifera carnica*. La présence de colonies issues de lignée maternelle *Apis mellifera carnica* avait déjà été décrite dans le cirque de Cilaos par Schneider (1989) sur critères morphologiques. Toutefois avec le présent échantillonnage, aucune colonie ancestralement carnolienne n'a été retrouvée dans Cilaos. L'une des explications possibles de l'absence de l'haplotype C2 dans le cirque pourrait être liée à l'échantillonnage, où seuls deux apiculteurs de Cilaos ont pu participer à cette étude. En effet, les ruchers de cette zone ont subi récemment des mortalités inexplicables et des ruchers entiers ont été décimés (selon plusieurs apiculteurs questionnés). Il se pourrait ainsi que l'échantillonnage effectué à ce moment ne soit pas représentatif de la richesse mitochondrial du cirque de Cilaos avant les mortalités. Il est intéressant de noter que les colonies de lignée maternelle carnolienne ne sont pas restreintes aux zones isolées des cirques comme décrites par Schneider (1989) et que leur aire de distribution s'étend sur toute l'île y compris dans le village enclavé de Grand Bassin. La présence de la lignée Sud-Européenne (C) sur une île volcanique de l'Océan Indien ne peut être expliquée que par des introductions humaines volontaires comme cela a été le cas en Norvège (Bouga *et al.* 2011), Pologne (Oleksa *et al.* 2011) ou encore sur les îles Macaronésiennes (De la Rúa *et al.* 2006). D'ailleurs des colonies d'*Apis mellifera carnica* ont été introduites pour des besoins apicoles durant les guerres de 1914-1918 et massivement en 1894 selon la DSV (Schneider 1989). La répartition et la fréquence des haplotypes C2 suggèrent que cette sous-espèce s'est bien adaptée aux conditions environnementales de l'île. L'extension de son aire de répartition sur l'île a pu être favorisée par les pratiques apicoles de transhumances consistant à déplacer des colonies plusieurs fois par an selon la disponibilité des ressources comme cela est couramment pratiqué en Espagne (Cánovas *et al.* 2007).

L'haplotype A4 a été détecté à une très faible fréquence (<1%) dans le Sud de l'île et indique la présence de lignées maternelles de la sous-espèce *Apis mellifera scutellata* originaire de l'Afrique sub-

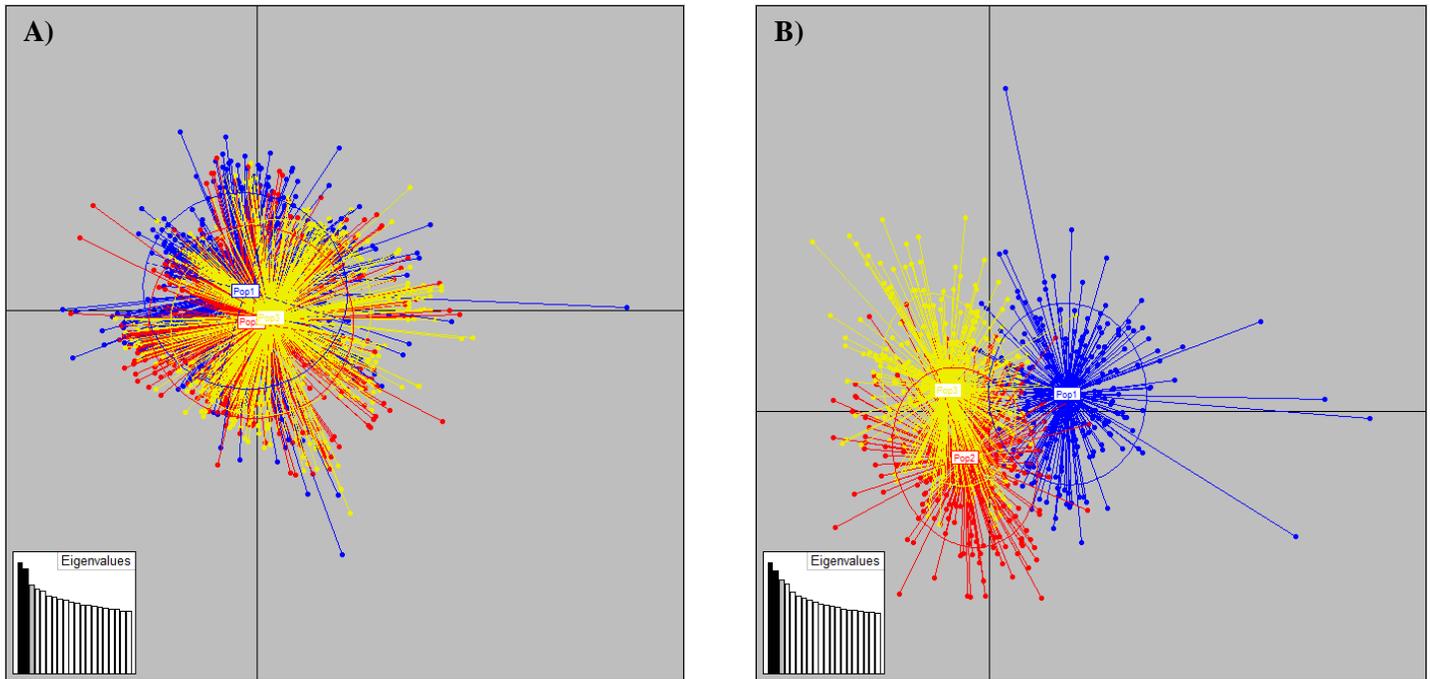


Figure 14 : Analyses en composantes principales basées sur les 42 variables issues des données microsatellites de 21 *loci* de 1588 individus/colonies d'*Apis mellifera* à La Réunion. En A) ACP des trois populations définies par Structure 2.3.3 en considérant qu'un individu appartient à une population avec un minimum de 30% de probabilité postérieure bayésienne (Axe 1 = 3,63 et Axe 2 = 3,42% avec N = 1588 individus ; pop1 = 502, pop2 = 486, pop3 = 600) et en B) ACP des trois populations définies par STRUCTURE en ne représentant que les individus ayant une probabilité d'assignation à une population supérieure ou égale à 70%. (Axe 1 = 4,11% et et Axe 2 = 3,81% avec N = 836 ; pop1 = 254, pop2 = 256, pop3 = 326). (*Source* : R 2.13.0)

Tableau 5 : Résultats des AMOVA calculées sur des F_{ST} entre différentes composantes hiérarchiques en A) groupes mitochondriaux (A1, C2, A4 et M8), apiculteurs et individus et en B) groupes géographiques en fonction des sites de chaque apiculteur (NORD-SUD-OUEST-EST) apiculteurs et individus, avec pourcentage de la variation et indices de fixation. (*Source* : Arlequin 3.5.1.2)

A) Source de la variation	Degrés de liberté	Somme des carrés des écarts	Variance attendue	Pourcentage de la variation	Indices de fixation
Entre groupes mitochondriaux	3	1,59	0,0004	0,07	FCT = 0,0007 (p-value = 0,021)
Entre apiculteurs à l'intérieur des groupes	69	34,36	0,00003	0,01	FSC = 0,00007 (p-value = 0,421)
Au sein des apiculteurs	2963	1471,32	0,49656	99,92	FST = 0,00081 (p-value = 0,284)
Total	3035	1507,27	0,49697		

B) Source de la variation	Degrés de liberté	Somme des carrés des écarts	Variance attendue	Pourcentage de la variation	Indices de fixation
Entre groupes géographiques (NORD-SUD-OUEST-EST et CENTRE)	4	1,99	0,00000	0,00	FCT = -0,00001 (p-value = 0,582)
Entre apiculteurs à l'intérieur des groupes	64	32,05	0,00002	0,00	FSC = 0,00004 (p-value = 0,102)
Au sein des apiculteurs	3107	1553,36	0,49995	100,00	FST = 0,00003 (p-value = 0,111)
Total	3175	1587,41	0,49997		

saharienne (Ruttner 1988). Aucune trace historique n'indique l'importation de cette sous-espèce avant l'arrêté préfectoral interdisant l'import d'abeilles sur l'île en 1982. Les explications de la présence de cette sous-espèce à un moment donné sur l'île pourraient être l'importation non référencée passée ou récente ou la colonisation naturelle de l'île. Cette sous-espèce est connue pour avoir été grandement commercialisée et exportée par le passé vers les continents américains et océanien (Diniz *et al.* 2003, Quezada-Euan *et al.* 2003, Paini 2004, Groom & Schwarz 2011). Elle a notamment été très étudiée pour l'impact de ses hybridations avec d'autres sous-espèces Européennes, donnant lieu à des pertes de patrimoine génétique par introgression et apparition d'hybrides « *Africanized honeybee* » ou abeilles Africanisées agressives (Winston 1992, Kraus, Franck & Vandame 2007, Elis & Elis <http://edis.ifas.ufl.edu/in790>). Avec l'échantillonnage de cette étude, seules trois colonies d'haplotype A4 *Apis mellifera scutellata* ont été détectés. Il se peut que d'autres colonies possédant cet haplotype soient présentes sur l'île mais n'aient pas été détectés par cet échantillonnage représentant 10% des colonies recensées sur l'île par la DSV en 2008. Etant donné sa grande adaptabilité en milieu tropical (Taylor 1985) comme il a été observé au Brésil et en Uruguay (Diniz *et al.* 2003, Collet *et al.* 2006), le fait que seules trois colonies avec l'haplotype A4 aient été observées permet de privilégier l'hypothèse d'une introduction récente de petit effectif, ou d'introduction passée (massive ou non) où les colonies observées représentent des reliquats ayant survécus aux pressions environnementales.

Enfin cinq colonies avec l'haplotype M8 ont été identifiées dans le Sud de l'île correspondant à l'haplotype retrouvé chez la sous-espèce *Apis mellifera iberiensis* aussi nommée *Apis mellifera iberica* appartenant à la lignée Nord-Ouest Européenne (Engel 1999, Garnery *et al.* 1992). Cette sous-espèce tient son nom du fait qu'elle soit native de la péninsule ibérique et des îles alentours (Ruttner 1988, De la Rúa *et al.* 2001a, 2001b 2002, 2006, Cánovas *et al.* 2007). Aussi sa présence sur l'île de La Réunion est de fait liée à une introduction de colonies, mais tout comme pour *Apis mellifera scutellata*, il n'existe pas de traces écrites connues décrivant une potentielle importation déclarée de cette sous-espèce. Toutefois, Schneider (1989) avait déjà noté que les abeilles réunionnaises représentaient au niveau morphologique un intermédiaire entre les sous-espèces Africaines et Européennes dont *Apis mellifera iberiensis*. Il est possible que ces colonies aient été importées avant 1989 sans avoir été référencées (premiers colons,...) ou récemment malgré les restrictions d'importation. Quelle que soit l'origine de l'arrivée des colonies d'*Apis mellifera iberiensis* à La Réunion, elle y est présente en très faible proportion dans l'échantillonnage réalisé. Il est donc impossible d'affirmer si elle est présente sur d'autres zones de l'île sans augmenter l'effort d'échantillonnage.

L'un des résultats intéressants de cette étude est l'absence d'haplotypes de lignée Européenne C appartenant à la sous-espèce *Apis mellifera ligustica* détectée morphologiquement par Schneider en 1989 notamment dans l'Est de l'île. Celle-ci aurait été introduite massivement en 1982, mais semblait ne se répartir que dans les zones fortement humides et pluvieuses de l'île (Schneider 1989). Les hypothèses qui peuvent être émises pour expliquer ces non observations seraient que l'échantillonnage n'a pas permis de détecter les

colonies ancestralement *Apis mellifera ligustica*, abeille italienne ou bien qu'elles aient toutes périé. Ces colonies ne se sont peut-être pas adaptées aux conditions environnementales de l'île ou n'ont pas su être suffisamment compétitives face aux colonies de lignée Africaine (A1) pour les ressources. Il est aussi possible que les forts épisodes cycloniques de 1989, 2002 et de 2007 aient constitué des perturbations trop importantes pour la survie et le maintien des colonies italiennes. Les résultats obtenus confirment l'observation effectuée sur critères morphologiques (Schneider 1989) de l'absence de colonies de lignée maternelle *Apis mellifera mellifera* (abeille noire française) pourtant massivement importée en 1982. Cette sous-espèce n'aurait probablement pas pu s'adapter au vu des pressions environnementales différentes de son aire d'origine (Garnery *et al.* 1998, Rortais *et al.* 2011).

4.2. Influence de l'apiculture sur la diversité génétique insulaire

Les résultats des analyses nucléaires montrent que la diversité génétique d'*Apis mellifera* à La Réunion est en moyenne forte (12,8 allèles/locus) pour les *loci* étudiés. Cette observation est d'autant plus intéressante que le nombre d'allèles moyen pour six *loci* : B124, A113, A24, A28, A7 et A8 est de 13,3 allèles c'est à dire supérieur à ce qui a été observé sur les îles Baléares (entre 2,8 et 7,7), sur les îles Macaronésiennes (Madère : 4,2 allèles moyen /locus ; Açores : 4,33 allèles moyen /locus) ou encore sur les îles Canaries (de 3,9 à 7,2 allèles en moyenne/locus) abritant également plusieurs lignées maternelles (De la Rùa *et al.* 2001b, 2003, 2006). En théorie la diversité génétique des îles est plus faible que celle d'une région continentale équivalente (Frankham 1997). Ce genre de phénomène peut résulter de « goulet d'étranglement » qui suggère que la diversité génétique observée sur des populations insulaire ne représente qu'un échantillon de la diversité génétique de la zone continentale d'origine de ces populations d'où des individus colonisateurs (naturels ou introduits) sont provenus. Au vu des autres observations effectuées en milieu insulaire pour *Apis mellifera*, il aurait pu être supposé que la diversité génétique sur l'île serait plus faible. Toutefois, en étudiant en détail les fréquences alléliques de certains *locus* chez les colonies d'abeilles à La Réunion, il apparaît certains allèles caractéristiques de lignée évolutive Africaine comme les allèles 100-101, 102-103 et 104-105 pour le *locus* A24 et de lignée Européenne (M) avec les allèles 232 et 234 pour le *locus* A113 (De la Rùa *et al.* 2002a). D'autres allèles diagnostiques des lignées C et M ont été retrouvés sur l'ensemble des colonies comme l'allèle 128 du *locus* A7 ou encore 125 du *locus* AP36 (Garnery *et al.* 1998). D'autres parts, des allèles observés chez des populations d'*Apis mellifera carnica* de Slovénie (c.-à-d. leur aire de répartition naturelle) en forte fréquence sont également retrouvés chez les colonies réunionnaises avec des fréquences non négligeables comme l'allèle 147 du *locus* A88 (Annexe 6) (Susnik *et al.* 2004). En étudiant plus en détails, les allèles par individu des colonies réunionnaises, il ressort que de nombreux individus de lignée maternelle *Apis mellifera unicolor* possèdent des allèles diagnostiques de lignée M et que tous les individus de lignée Européenne C (77 colonies) *Apis mellifera carnica* ont des allèles caractéristiques de lignée Africaine. Il apparaît donc qu'au niveau nucléaire les colonies

d'*Apis mellifera* à La Réunion possèdent des allèles de lignées évolutives différentes. Cette observation permet d'émettre l'hypothèse que la diversité génétique observée résulte d'un apport d'allèles au *pool* génétique global par la cohabitation de plusieurs lignées évolutives hautement divergentes qui se seraient hybridées comme dans les populations d'Italie et de Sicile (Franck *et al.* 2000) ou encore comme à Chypre (Kandemir *et al.* 2006). Ce genre de phénomène est notamment très observé aux Etats-Unis où la diversité génétique en zone apicole est plus forte que dans les régions d'origine des sous-espèces introduites (Magnus *et al.* 2010, Haupur *et al.* 2012). Cette observation pourrait être un premier élément indicateur de métissage avec l'apparition d'une asymétrie génétique où le patrimoine mitochondrial est différent du patrimoine nucléaire suite aux croisements sur plusieurs générations de reines et de mâles issues de colonies de lignées évolutives différentes.

En ce qui concerne la diversité génétique à l'échelle des apiculteurs, elle n'est pas répartie de façon homogène puisque la diversité moyenne par apiculteur est plus faible que la diversité globale observée et ce malgré de grands effectifs de ruchers comme pour l'apiculteur 19. Cela signifie que les apiculteurs ne partagent pas un *pool* génétique commun unique mais ont un patrimoine génétique propre. En ce qui concerne les colonies sauvages, l'étude des fréquences alléliques n'a pas révélé d'allèles privés et indique l'existence de flux de gènes entre les colonies du milieu naturel et des zones exploitées.

Les analyses ont montré que les taux d'hétérozygotie observés sont en moyenne comparables ($H_e = 0,46$) aux autres populations insulaires d'*Apis mellifera*, mais plus faibles que des régions continentales comme au Maroc ($H_o = 0,80$), en Guinée ($H_o = 0,82$) (Franck *et al.* 2000) ou en Europe chez des populations italiennes ($H_o = 0,64$) ou grecques ($H_o = 0,79$) (Muñoz *et al.* 2009). Le faible degré d'hétérozygotie global sur l'île est surtout influencé par les *loci* A8, AP36, AP289, AX, AP28 et AP81. Les tests d'équilibre d'Hardy-Weinberg sur les ruchers des apiculteurs ont montré des valeurs de F_{IS} positives et significatives indiquant un écart au modèle. Cette déviance pourrait être due à plusieurs facteurs, notamment l'estimateur F_{IS} est très sensible aux erreurs de codage, aux migrations et à l'échantillonnage mais aussi au régime de reproduction. Les erreurs de codage peuvent être indiquées par de fortes fréquences d'allèles, or ce n'est pas le cas ici. En ce qui concerne l'effort d'échantillonnage, celui-ci a permis d'échantillonner au mieux la diversité génétique de l'île (évolution du nombre d'allèles moyens en fonction du nombre de colonie = annexe 8). Les fortes valeurs significatives de F_{IS} par apiculteur (entre 0,043 chez l'apiculteur 10 et 0,268 chez l'apiculteur 29) suggèrent qu'il existe une sous-structuration de l'ensemble des colonies d'abeilles en groupes génétiques comme sur les îles Baléares (De la Rúa *et al.* 2003).

Cet effet a pu être mis en relief par les valeurs de F_{ST} montrant des différenciations génétiques significatives entre apiculteurs voire ruchers surtout chez les apiculteurs 12 et 17. Aussi le fait que chaque apiculteur possède un *pool* de colonies différent génétiquement par rapport aux autres est un argument allant dans le sens d'une structuration génétique. Comme il a été précisé plus haut, l'absence de panmixie peut fortement influencer le F_{IS} . Au travers des valeurs de F_{ST} et de F_{IS} , il est possible d'avancer que les pratiques

apicoles appliquées sur l'île ont tendance à favoriser les croisements entre individus apparentés entre certaines colonies, induisant une consanguinité. La conséquence des croisements consanguins est la maximisation de la différenciation entre apiculteurs. Le modèle bayésien établi par Structure suggère qu'il existe bel et bien une sous-structuration en trois groupes génétiques qui pourrait être due à l'origine de plusieurs aires de croisements (accouplements) sur l'île ou par l'influence des conduites apicoles (De la Rúa *et al.* 2003). Etant donné que les zones de congrégation de mâles ne sont pas connues à La Réunion, cette dernière hypothèse ne peut pas être écartée. Elle rejoint la définition de population chez *Apis mellifera* que Garnery *et al.* 1992 ont établi comme « l'ensemble des colonies partageant la même aire de congrégation de mâles ». La présence des trois populations ou groupes génétiques n'est selon les AMOVA réalisées ni expliquée par des groupes de lignées maternelles ni par la répartition géographique des colonies. Cette sous-structuration n'exclut pas les échanges entre populations génétiques, la sortie Structure et les ACP ont permis de voir qu'il existe un flux de gènes entre ces populations. Le fait est que la structuration n'est pas liée à la diversité mitochondriale suggère que les colonies échantillonnées sont issues d'hybridations. Ce phénomène a déjà été largement décrit chez *Apis mellifera* aux Etats-Unis entre la sous-espèce Africaine *Apis mellifera scutellata* et Européennes *Apis mellifera mellifera*, *Apis mellifera ligustica*, *Apis mellifera caucasia* et *Apis mellifera carnica* (Pinto *et al.* 2005, 2007, Magnus *et al.* 2010). Suite à ces croisements entre sous-espèces, favorisés par les introductions humaines, des descendants hybrides apparaissent ayant à la fois des gènes Africains et Européens (Pinto *et al.* 2005). Des études en Argentine, Brésil et Uruguay ont permis de montrer que ces hybridations peuvent être asymétriques dans le sens où le patrimoine génétique d'une sous-espèce va dominer sur d'autres (Collet *et al.* 2006). Les conséquences des hybridations peuvent apparaître très vite comme au Mexique où trois ans après la mise en contact de sous-espèces Africaines et Européennes, les flux géniques ont conduit à l'apparition de gènes Africains dans les colonies de lignées Européennes et en 10 ans ont résulté en un changement radical du patrimoine génétique des abeilles mexicaines (Clarke *et al.* 2002). Dans d'autres cas, les hybridations entre lignées évolutives a pu mener à la formation de nouvelles sous-espèces comme *Apis mellifera sicula* de Sicile et *Apis mellifera ligustica* d'Italie qui sont les descendantes de plusieurs lignées évolutives avec un patrimoine génétique mitochondrial à la fois composé de lignées Européennes (M et C) et Africaines (A) (Franck *et al.* 2000). Néanmoins les hybridations peuvent aussi représenter une menace de la diversité génétique par la perte de patrimoine particulier par introgression comme c'est le cas chez *Apis mellifera mellifera* en France (Perrier *et al.* 2003, Rortais *et al.* 2011).

5. CONCLUSION ET PERSPECTIVES :

L'étude a permis de mettre en évidence, la présence de quatre lignées maternelles issues des lignées Européennes et Africaine avec la plus forte proportion de cette dernière. La présence de ces différentes lignées résulte d'introduction pour les lignées Européennes tandis que l'origine des lignées Africaines reste incertaine. Les croisements entre ces lignées et les pratiques apicoles ont favorisé la mise en place d'une forte diversité

génétique des colonies d'abeilles *Apis mellifera* à La Réunion avec une répartition hétérogène. Cette diversité est sous-structurée en trois populations qui ne sont ni expliquées par la localisation ou l'isolement des colonies, ni par la différenciation génétique des lignées. En revanche, les pratiques apicoles telles que les transhumances et les croisements contrôlés semblent être des facteurs plus explicatifs et pourraient être à l'origine d'une différenciation génétique entre le *pool* de colonies d'un apiculteur à un autre. Les identités mitochondriales, nucléaires et la sous-structuration des populations pourraient être à l'origine d'hybridations entre différentes lignées maternelles induisant des introgressions de patrimoine génétique Européen chez des colonies ancestralement Africaines et inversement. Aussi cette étude apporte les premiers indices d'un possible métissage entre les lignées A, M et C d'*Apis mellifera* à La Réunion.

Toutefois pour comprendre les mécanismes impliqués et à l'origine de ce possible métissage il serait intéressant d'ajouter des individus témoins purs de lignée évolutive différentes à l'étude pour les comparer aux échantillons réunionnais. De plus, l'analyse du métissage pourrait être approfondie par l'étude du déséquilibre cyto-nucléaire (entre génotypes nucléaires et haplotype mitochondriaux) comme il a été effectué par Diniz *et al.* (2003) au Brésil ou encore par De la Rúa *et al.* (2002b, 2005) en Espagne. L'une des autres limites de cette étude a été la difficulté d'obtenir des informations fiables auprès des apiculteurs sur les conduites apicoles réelles ou sur l'origine des colonies. Aussi il est difficile de connaître l'origine de la sous-structuration observée sans avoir connaissance de tous les facteurs qui peuvent l'influencer. Il serait intéressant d'analyser plus de colonies sauvages afin de voir si les observations principalement faite en milieu exploité sont aussi présentes en milieu naturel. Afin de voir si la consanguinité varie d'un rucher ou apiculteur à l'autre, il serait bien de calculer des indices d'apparentement entre colonies afin de les corrélérer avec les conduites apicoles. La comparaison des données génétiques avec des données morphologiques pourrait apporter des nouveaux éléments de réponse quant à la présence réelle d'hybridation entre sous-espèces sur l'île comme l'a montré l'étude de Schneider *et al.* 2003, où les croisements d'*Apis mellifera carnica* et *Apis mellifera ligustica* peuvent être détectés par rapport à la morphologie alaire des hybrides. Enfin, il serait intéressant de comparer la diversité génétique sur l'île de La Réunion avec celle de Madagascar d'où provient la lignée dominante *Apis mellifera unicolor* de l'île (95%). La comparaison avec les colonies malgaches permettrait de voir l'impact génétique de l'apport de lignées évolutives Européennes sur l'île de La Réunion.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Alqarni, A.S., M.A. Hannan, A.A. Owayss, and M.S. Engel. 2011. The indigenous honey bees of Saudi Arabia (Hymenoptera, Apidae, *Apis mellifera jemenitica* Ruttner): Their natural history and role in beekeeping. *Zookeys*, 134: 83-98.
- Arias, M.C., and W.S. Sheppard. 1996. Molecular phylogenetics of honeybee subspecies (*Apis mellifera* L.) inferred from mitochondrial DNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 5: 557-566.
- Arias, M.C., and W.S. Sheppard. 2005. Phylogenetic relationships of honey bees (Hymenoptera: Apinae: Apini) inferred from nuclear and mitochondrial DNA sequence data. *Mol. Phylogenet. Evol.* 37: 25-35.
- Belkhir, K., P. Borsa, L. Chikhi, N. Raufaste, and F. Bonhomme. 1996-2004. GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. *Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier (France)*.
- Bellie, T. 2009. Honeybee Production and Marketing Systems, Constraints and Opportunities in Burie District of Amhara Region, Ethiopia. *Ph. D thesis, Bahir Dar University*, 131p.
- Boucher, A. 1941. Mémoire d'Antoine Boucher sur l'île de Bourbon en 1710. *Recueil trimestriel de documents et travaux inédits pour servir à l'histoire des Mascareignes françaises*, 340p.
- Bouga, M., C. Alaux, M. Bienkowska, R. Büchler, N.L. Carreck, E. Cauia, R. Chlebo, B. Dahle, R. Dall'Olio, P. De la Rúa, A. Gregorc, E. Ivanova, A. Kence, M. Kence, N. Kezic, H. Kiprijanovska, P. Kozmus, P. Kryger, Y. Le Conte, M. Lodesani, A.M. Murilhas, A. Siceanu, G. Soland, A.Uzunov, and J. Wilde. 2011. A review of methods for discrimination of honey bee populations as applied to European beekeeping. *Journal of Apicultural Research* 50: 51-84.
- Breeze, T.D., A.P. Bailey, K.G. Balcombe, and S.G. Potts. 2011. Pollination services in the UK: How important are honeybees? *Agriculture, Ecosystems and Environment* 142:137-143.
- Cane, J.H. 2001. Habitat fragmentation and native bees: a premature verdict? *Conserv. Ecol.* 5 : 3.
- Cánovas F., P. De la Rúa, J. Serrano, and J. Galián. 2007. Geographic patterns of mitochondrial DNA variation in *Apis mellifera iberiensis* (Hymenoptera: Apidae), *Journal of Zoology and Systematics Evolution*, 46: 24-30.
- Cánovas, F., P. De la Rúa, J. Serrano, and J. Galián. 2011. Microsatellite variability reveals beekeeping influences on Iberian honeybee populations. *Apidologie* 42: 235-251.
- Carreck, N.L., and I. Williams. 1998. The economic value of bees in the UK. *Bee World* 79: 115-23.
- Carreck, N.L. 2008. Are honey bees (*Apis mellifera* L.) native to the British Isles? *J. Apic. Res.* 47: 318-322.
- Castro, M.S. 2002. Bee fauna of some tropical and exotic fruits: potential pollinators and their conservation. *In Pollination bees, Ministry of Environment, Brasília*, p275-288.
- Chapuis, M.P. and A. Estoup, 2007. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular Biology and Evolution* 24: 621-631.
- Clarke, K., T.E. Rinderer, P. Franck, J.G. Quezada-Euan, and B.P. Oldroyd. 2002. The Africanization of honeybees (*Apis mellifera* L.) of the Yucatan: a study of a massive hybridization event across time. *Evolution* 56: 1462-1474.

- Collet, T., K.M. Ferreira, M.C. Arias, A.E.E. Soares, and M.A. Del Lama. 2006. Genetic structure of Africanized honeybee populations (*Apis mellifera* L.) from Brazil and Uruguay viewed through mitochondrial DNA COI–COII patterns. *Heredity*, 97: 329-335.
- Cornuet, J.M., and L. Garnery. 1991. Mitochondrial DNA variability in honeybees and its phylogeographic implications. *Apidologie* 22: 627- 642.
- Crane, E. 1976. The world's beekeeping - past and present. *Dadant and Sons (ed.), The Hive and the Honey Bee*. Dadant and Sons, Inc, Hamilton, Illinois, U.S.A., p1- 38.
- Crane, E. 1990. Bees and Beekeeping: Science, Practice and World Resources. *Comstock Publishing Associates (Cornell University Press), Ithaca, New York*.
- Crozier, R.H., Y.C. Crozier, and A.G. Mackinlay. 1989. The CO-I and CO-II region of the honeybee mitochondrial DNA: evidence for variation in insect mitochondrial evolutionary rates. *Mol Biol Evol* 6: 399–695.
- Crozier, R.H., and Y.C. Crozier. 1993. The mitochondrial genome of the honeybee *Apis mellifera*: complete sequence and genome organization. *Genetics*, 133:97-117.
- Dall'olio, R., A. Marino, M. Lodesani, and R.F.A. Moritz. 2007. Genetic characterization of Italian honey bees, *Apis mellifera ligustica*, based on microsatellite DNA polymorphisms. *Apidologie* 38: 207-217.
- Danforth, B.N., S. Sipes, J. Fang, and S.G. Brady. 2006. The history of early bee diversification based on five genes plus morphology. *PNAS* 103: 15118-15123.
- De la Rúa, P., J. Galián, J. Serrano, and R.F.A Moritz. 2001a. Molecular characterization and population structure of the honeybees from the Balearic Islands (Spain). *Apidologie* 32: 417-427.
- De la Rúa, P., J. Galián, J. Serrano, and R.F.A. Moritz. 2001b. Genetic structure and distinctness of *Apis mellifera* L. populations from the Canary Islands. *Molecular Ecology* 10: 1733–1742.
- De la Rúa, P., J. Serrano, and J. Galián. 2002a. Biodiversity of *Apis mellifera* populations from Tenerife (Canary Islands) and hybridisation with East European races. *Biod. Cons.* 11: 59-67.
- De la Rúa, P., J. Galián, J. Serrano, and R.F.A. Moritz. 2002b. Microsatellite analysis of non-migratory colonies of *Apis mellifera iberica* from south-eastern Spain. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 40: 164-168.
- De la Rúa, P., J. Galián, J. Serrano, R.F.A. Moritz. 2003. Genetic structure of Balearic honeybee populations based on microsatellite polymorphism. *Genet. Sel. Evol.* 35: 1-12.
- De la Rúa, P., R. Hernández-García, B.V. Pedersen, J. Galián, and J. Serrano. 2004a. Molecular diversity of honeybee *Apis mellifera iberica* L (Hymenoptera: Apidae) from western Andalusia. *Archivos de Zootecnia* 53: 195-203.
- De la Rúa, P., Y. Jiménez, J. Galián, and J. Serrano. 2004b. Evaluation of the biodiversity of honey bee (*Apis mellifera*) populations from eastern Spain. *J. Apic. Res.* 43: 162-166.

- De la Rúa, P., R. Hernandez-Garcia, Y. Jiménez, J. Galián, and J. Serrano. 2005. Biodiversity of *Apis mellifera iberica* (Hymenoptera: Apidae) from northeastern Spain assessed by mitochondrial analysis. *Insect Syst. Evol.* 36: 21-28.
- De la Rúa, P., J. Galián, B.V. Pedersen, and J. Serrano. 2006. Molecular characterization and population structure of *Apis mellifera* from Madeira and the Azores. *Apidologie* 37: 699-708.
- De la Rúa, P., R. Jaffé, R. Dall'olio, I. Muñoz, and J. Serrano. 2009. Biodiversity, conservation and current threats to European honey bees. *Apidologie* 40: 263-284.
- Dietemann, V., C.W.W Pirk, and R. Crewe. 2009. Is there a need for conservation of honeybees in Africa? *Apidologie* 40: 285-295.
- Diniz, N.M., A.E.E. Soares, W.S. Sheppard, and M.A. Del Lama. 2003. Genetic structure of honey bee populations from southern Brazil and Uruguay. *Genetics and Molecular Biology* 26: 47-52.
- Earl, D.A., and B.M. vonHoldt. 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, 4: 359-361.
- El-Niweiri, M.A.A., and R.F.A. Moritz. 2008. Mitochondrial discrimination of honeybees (*Apis mellifera*) of Sudan. *Apidologie* 39: 566-573.
- El-Niweiri, M.A.A., and Moritz R.F.A. 2010. The impact of apiculture on the genetic structure of wild honeybee populations (*Apis mellifera*) in Sudan. *Journal Insect Conservation* 14:115–124.
- Engel, M. 1999. The taxonomy of recent and fossil honey bees (Hymenoptera: Apidae; *Apis*). *Journal of Hymenoptera Research* 8: 165-196.
- Estoup, A., M. Solignac, M. Harry, and J.M. Cornuet. 1993. Characterization of (GT)_n and (CT)_n microsatellites in two insect species: *Apis mellifera* and *Bombus terrestris*. *Nucleic Acids Research*, 21: 1427-1431.
- Estoup, A., L. Garnery, M. Solignac, and J.M. Cornuet. 1995. Microsatellite variation in honey bee (*Apis mellifera*) populations: hierarchical genetic structure and test of infinite and stepwise mutation models. *Genetics* 140: 679-695.
- Evanno, G., S. Regnault, and J. Goudet. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure. A simulation study. *Molecular ecology*, 14: 2611-2620.
- Excoffier, L., G. Laval, and S. Schneider. 2005. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1: 47-50.
- Excoffier, L., and G. Heckel. 2006. Computer programs for population genetics data analysis: a survival guide. *Genetics*, 7: 745-758.
- Fletcher, D.J.C. 1978. The African bee, *Apis mellifera adansonii*, in Africa. *Annual Review of Entomology* 23 : 151-171.
- Franck, P., L. Garnery, M. Solignac, and J.M. Cornuet. 1998. The origin of west European sub-species of honey bees (*Apis mellifera*): New insights from microsatellite and mitochondrial data. *Evolution* 52: 1119-1134.

- Franck, P. 1999. Approche génétique des questions évolutives associées à la sociobiologie et à la phylogéographie de l'abeille domestique (*Apis mellifera* L.). *Thèse de doctorat, Ecole nationale supérieure agronomique de Montpellier*, 146 p.
- Franck, P., L. Garnery, M. Solignac, and J.M. Cornuet. 2000a. Molecular confirmation of a fourth lineage in honeybees from the Near East. *Apidologie* 31:167–180.
- Franck, P., L. Garnery, G. Celebrano, M. Solignac, and J.M. Cornuet. 2000b. Hybrid origin of honey bees from Italy (*Apis mellifera ligustica*) and Sicily (*A. m. sicula*). *Molecular Ecology* 9: 907-921.
- Franck, P., L. Garnery, A. Loiseau, B.P. Oldroyd, H.R. Hepburn, M. Solignac, and J.M. Cornuet. 2001. Genetic diversity of the honeybee in Africa: microsatellite and mitochondrial data. *Heredity* 86: 420-430.
- Gallai, N., J.M. Salles, J. Settele, and B.E. Vaissiere. 2009. Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecol. Econ.* 68: 810-821.
- Garnery, L., J.M. Cornuet, and M. Solignac. 1992. Evolutionary history of the honey bee *Apis mellifera* inferred from mitochondrial DNA analysis. *Mol. Ecol.* 1: 145-54.
- Garnery, L., M. Solignac, G. Celebrano, and J.M. Cornuet. 1993. A simple test using restricted PCR-amplified mitochondrial-DNA to study the genetic-structure of *Apis mellifera* L. *Experientia* 49: 1016-1021.
- Garnery L., E.H. Mosshine, B.P. Oldroyd, and J.M. Cornuet. 1995. Mitochondrial-DNA variation in Moroccan and Spanish honey-bee populations. *Mol. Ecol.* 4: 465-471.
- Garnery L., P. Franck, E. Baudry, D. Vautrin, J.M. Cornuet, and M. Solignac. 1998. Genetic diversity of the west European honey bee (*Apis mellifera* and *A. m. iberica*): I. Mitochondrial DNA, II. Microsatellite loci. *Genetics Selection Evolution* 30: 49-74.
- Girard, M.B., H.R. Mattila, and T.D. Seeley. 2010. Recruitment-dance signals draw larger audiences when honey bee colonies have multiple patriline. *Insectes sociaux* 58: 77-86.
- Goudet, J. 1995. FSTAT (Version 1.2): A computer program to calculate F-Statistics. *Journal of Heredity*, 86: 485-486.
- Groom, S.V.C., and M.P. Schwarz. 2011. Bees in the Southwest Pacific: Origins, diversity and conservation. *Apidologie* 42: 759-770.
- Guo, S.W., and E.A. Thompson. 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics*, 48: 361-72.
- Harpur, B.A., S. Minaei, C.F. Kent, and A. Zayed. 2012. Management increases genetic diversity of honey bees via admixture. *Molecular ecology*, Online Version of Record published before inclusion in an issue.
- Hajeer, A., J. Worthington, and S. John. 2000. SNP and microsatellite genotyping: markers for genetic analysis. *Eaton Publishing, Manchester*, 152p.
- Hancock, J.M. 1999. Microsatellite and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. In: *Microsatellites: Evolution and Application*. (ed. Goldstein DB, Schlötterer C), pp1-9, Oxford university Press, Oxford.

- Haubruge, E., B.K. Nguyen, J. Widart, J.P. Thome, P. Fickers, and E. Depauw. 2006. Le dépérissement de l'abeille domestique, *Apis mellifera* L. 1758 (*Hymenoptera* : *Apidae*) : faits et causes probables. *Notes fauniques de Gembloux* 59 : 3-21.
- Hardy, O.J., and X. Vekemans. 2002. SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Molecular Ecology Notes* 2: 618-620.
- Hermann, P. 1920. Apiculture pratique aux colonies tropicales. 97p.
- Hugues, C.R. and D.C. Queller. 1993. Detection of highly polymorphic microsatellites loci in a species with little allozyme polymorphism. *Molecular ecology*, 2: 131-137.
- Ihaka, R., and R. Gentleman, R. 1996. R: A language for data analysis and graphics". *Journal of Computational and Graphical Statistics*, 5: 299-314.
- Jakobsson, M., and N.A. Rosenberg. 2007. *CLUMPP*: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics* 23: 1801-1806.
- Jaffé, R., and R.F.A. Moritz. 2009. Beekeeping and the conservation of native honeybees in Europe. *In: Atlas of Biodiversity Risks: From Europe to the Globe and from Stories to Maps. ALARM Project.*
- Jensen, A.B., K.A. Palmer, J.J. Boomsma, and B.V. Pedersen. 2005. Varying degrees of *Apis mellifera ligustica* introgression in protected populations of the black honey bee, *Apis mellifera mellifera*, in northwest Europe. *Molecular Ecology* 14: 93-106.
- Jensen, A.B., and B.V. Pedersen. 2005. Honey bee conservation; a case study from Læsø Island (DK). *In: M Lodesani; C Costa (Eds) Beekeeping and conserving biodiversity of honey bees Northern Bee Books; Hebden Bridge, UK.* 142-164.
- Kandemir, I., M.D. Meixner, A. Ozkan, and W.S. Sheppard. 2006. Genetic characterization of honey bee (*Apis mellifera cypria*) populations in northern Cyprus, *Apidologie* 37: 547-555.
- Klein, A.M., B.E. Vaissiere, J.H. Cane, I. Steffan-Dewenter, S.A. Cunningham, C. Kremen, and T. Tscharntke. 2007. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proc. R. Soc. B: Biol. Sci.* 274: 303-313.
- Klingler, C. 2009. *Même les abeilles sauvages déclinent. La Recherche n° 436 Sophia Publications*, p65-67.
- Kraus, F.B., P. Franck, and R. Vandame. 2007. Asymmetric introgression of African genes in honeybee populations (*Apis mellifera* L.) in Central Mexico. *Heredity*, 99: 233-240.
- Kremen, C., N.M. Williams, and R.W. Thorp. 2002. Crop pollination from native bees at risk from agricultural intensification. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 99: 16812-16816.
- Le Conte, Y., and M. Navajas. 2008. Climate change: impact on honey bee populations and disease. *In Climate change: impact on the epidemiology and control of animal diseases. Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 27 : 499-510.
- Louveaux, J., M. Albisetti, M. Delangue, and J. Theurkauff. 1966. Les modalités de l'adaptation des abeilles (*Apis mellifica* L.) au milieu naturel. *Ann. Abeille* 9: 323-350.

- Mahowald, M., and E. von Wettberg. 1999. Détermination de sexe chez les Hyménoptères. *Université de Swarthmore*, <http://www.sccs.swarthmore.edu/users/99/mahowald/hymenoptera.html>.
- Magnus, R.M., and A.L. Szalanski. 2010. Genetic evidence of *honey bees* belonging to the Middle East lineage in the United States. *Sociobiology* 55: 285-296.
- Meixner, M.D., M. Worobik, J. Wilde, S. Füchs, and N. Koeniger. 2007. *Apis mellifera mellifera* in eastern Europe-morphometric variation and determination of its range limits. *Apidologie* 38: 191-197.
- Meixner, M.D., C. Costa, P. Kryger, F. Hatjina, M. Bouga, E. Ivanova, and R. Böhler. 2010. Conserving diversity and vitality for honey bee breeding. *J. Apic. Res.* 49: 85-92.
- Meixner, M.D., M.A. Leta, N. Koeniger, and S. Füchs. 2011. The honey bees of Ethiopia represent a new subspecies of *Apis mellifera* – *Apis mellifera simensis* n. ssp. *Apidologie* 42: 425-437.
- Meusel, M.S. and R.F.A. Moritz. 1992. Mitochondrial DNA length variation in the cytochrome oxidase region of honey bee (*Apis mellifera* L). *Apidologie*, 23: 147-150.
- Michener, C.D. 2000. The bees of the world. *John Hopkins Univ. Press, Baltimore, Maryland, USA*, 913p.
- Miguel, I., M. Iriondo, L. Garnery, W.S. Sheppard, and A. Estonba. 2007. Gene flow within the M evolutionary lineage of *Apis mellifera*: role of the Pyrenees, isolation by distance and post-glacial re colonization routes in the western Europe. *Apidologie* 38: 141-155.
- Miguel, I., M. Baylac, M. Iriondo, C. Manzano, L. Garnery, and A. Estonba. 2011. Both geometric morphometric and microsatellite data consistently support the differentiation of the *Apis mellifera* M evolutionary branch. *Apidologie* 42: 150-161.
- Moritz, R.F.A., and S. Füchs. 1998. Organization of honeybee colonies: characteristics and consequences of a superorganism concept. *Apidologie* 29: 7-21.
- Moure, J.M., D. Urban, and G.A.R. Melo. 2007. Catalogue of bees (Hyménoptera, Apoidea) in the neotropical region. *Sociedade Brasileira de Entomologia, Curitiba*, 1058p.
- Muñoz, I., R. Dall'olio, M. Lodesani, and P. De la Rúa. 2009. Population genetic structure of coastal Croatian honey bees (*Apis mellifera carnica*). *Apidologie* 40: 617-626.
- Murray, T.E., M. Kuhlmann, and S.G. Potts. 2009. Conservation ecology of bees: populations, species and communities. *Apidologie* 40: 211-236.
- Oldroyd, B.P., and J.H. Fewell. 2007. Genetic diversity promotes homeostasis in insect colonies. *Trends Ecol. Evol.* 22: 408-413.
- Oleksa, A., I. Chybicki, A. Tofilski, and J. Burczyk. 2011. Nuclear and mitochondrial patterns of introgression into native dark bees (*Apis mellifera mellifera*) in Poland. *Journal of Apicultural Research*, 50: 116-129.
- Ollerton, J., R. Winfree, and S. Tarrant. 2011. How many flowering plants are pollinated by animals? *Oikos* 120: 321-326.
- Otis, G.W. 1996. Distributions of recently recognized species of honey bees (Hyménoptera: Apidae; *Apis*) in Asia. *Journal of Kansas Entomol.Soc.* 69: 311-333.

- Paini, D. 2004. The impact of the European Honey bee (*Apis mellifera*) on Australian Native Bee. *Ph. D thesis, University of Western Australia*, 165p.
- Page Jr., R.E., and Y.S.C. Peng. 2001. Aging and development in social insects with emphasis on the honey bee, *Apis mellifera* L.. *Exp. Gerontol.* 36: 695–711.
- Palmer, M.R., D.R. Smith, O. Kaftanoglu. 2000a. Turkish honeybees: genetic variation and evidence for a fourth lineage of *Apis mellifera* mtDNA. *J. Hered.* 91: 42-6.
- Palmer, K.A., and B.P. Oldroyd. 2000b. Evolution of multiple mating in the genus *Apis*. *Apidologie*, 31: 235–248.
- Peakall, R., and P. E. Smouse. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6: 288-295.
- Perrier, C., J. Strange, O. Langella, W.S. Sheppard, and L. Garnery. 2003. Diversité génétique, introgressions mitochondriales et nucléaires dans une population d'abeilles des Landes de Gascogne. *Les Actes du Bureau de Recherches Génétiques* 4 : 79-100.
- Pinto, M.A., Rubink W.L., Patton J.C., Coulson R.N. & Johnston J.S. 2005. Africanization in the United States: replacement of feral European honeybees (*Apis mellifera* L.) by an African hybrid swarm. *Genetics* 170: 1653-1665.
- Potts, R., and A.K. Behrensmeyer. 1992. Late Cenozoic terrestrial ecosystems. In: *Terrestrial ecosystems through time: evolutionary paleoecology of terrestrial plants and animals*, ed. By A.K. Behrensmeyer, J.D. Damuth, W.A. DiMichelle, R. Potts, H.D. Sues and S.L. Wing, University of Chicago Press, Chicago, 419-451.
- Pritchard, J.K., M. Stephens, and P. Donnelly. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945–959.
- Quezada-Euán, J.J.G., E. Perez-Castro, and W.D.J. May-Itza. 2003. Hybridization between European and African-derived honeybee populations (*Apis mellifera*) at different altitudes in Perú. *Apidologie* 34: 217–225.
- Ralalaharisoa-Ramamonjisoa, Z., H. Ralimanana, and D. Lobreau-Callen. 1996. Comportement de butinage d'*Apis mellifera* var. *unicolor* (Hymenoptera, Apidae) dans divers biotopes. In : Lourenço W.R. (ed.) *Biogéographie de Madagascar = Biogeography of Madagascar*. Paris : ORSTOM, p. 517-522.
- Raymond, M., and F. Rousset. 1995. Genepop (version-1.2) – population-genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Hered* 86: 248–249.
- Rortais, A., G. Arnold, M. Alburaki, H. Legout, and L. Garnery. 2011. Review of the DraI COI-COII test for the conservation of the black honeybee (*Apis mellifera mellifera*). *Conservation Genet Resour* 3: 383-391.
- Rosenberg, N.A. 2004. Distruct: a program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology Notes*, 4: 137-138.
- Ruttner, F. 1988. Biogeography and Taxonomy of Honeybees. *Springer-Verlag, Berlin, Germany*, 284p.
- Sadeyen, J., and M. Techer. 2011. Niveaux de polyandrie et diversité génétique chez les colonies d'abeilles à La Réunion. *Rapport de stage Master 1 Biodiversité et Ecosystèmes Tropicaux (BEST)*, Université de La Réunion, 62p.

- Schmid-Hempel, P., and T. Wolf. 1988. Foraging effort and life span of workers in a social insect. *J. Anim. Ecol.* 57: 500-521.
- Schneider, F. 1989. Biométrie des abeilles à la Réunion. *Thèse École Doctorale Vétérinaire, Maison Alfort*, 91p.
- Schneider, S.S., L.J. Leamy, L.A. Lewis, and G. DeGrandi-Hoffman. 2003. The influence of hybridization between African and European honeybees, *Apis mellifera*, on asymmetries in wing size and shape. *Evolution*, 57: 2350-2364.
- Schoonhoven, L.M., T. Jermy, and J.J.A. van Loon. 1998. Insect-Plant Biology: From Physiology to Evolution. *Chapman & Hall, London, UK*, 409p.
- Seeley, T.D., 1989. The honey bee colony as a superorganism. *Am. Sci.* 77, 546-553.
- Shaibi, T., H.M.G. Lattorff, and R.F.A. Moritz. 2008. A microsatellite DNA toolkit for studying population structure in *Apis mellifera*. *Mol. Ecol. Resources* 8: 1034-1036.
- Shaibi, T., I. Muñoz, R. Dall'Olio, M. Lodesani, P. De La Rúa, and R.F.A. Moritz. 2009. *Apis mellifera* evolutionary lineages in northern Africa: Libya, where orient meets occident. *Insects Soc.* 56: 293-300.
- Sheppard, W.S., M.C. Arias, A. Greech, and M.D. Meixner. 1997. *Apis mellifera ruttneri*, a new honey bee sub-species from Malta. *Apidologie* 28: 287-293.
- Sheppard, W.S., and M.D. Meixner. 2003. *Apis mellifera pomonella*, a new honey bee sub-species from Central Asia. *Apidologie* 34: 367-375.
- Sinervo, B. 1997. Kin Selection and Haplodiploidy in Social Hymenoptera. Online: http://bio.research.ucsc.edu/~barrylab/classes/animal_behavior/LEVELS.HTML
- Simon, C., F. Frati, A. Beckenbach, B. Crespi, H. Liu, and P. Flook. 1994. Evolution, weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann Entomol Soc Am.* 87: 651-701.
- Smith, D.R., and W.M. Brown. 1988. Polymorphisms in mitochondrial DNA of European and Africanized honey bees (*Apis mellifera*). *Experientia* 44: 257-260.
- Smith, D.R. 1991. Mitochondrial DNA and honeybee biogeography. In: *DR Smith (eds.), Diversity in the genus Apis*. Westview, Boulder, CO, 131-176.
- Smith, D.R., and R.H. Hagen. 1996. The biogeography of *Apis cerana* as revealed by mitochondrial DNA sequence data. *J Kansas Entomol. Soc.* 69: 294-310.
- Solignac, M., D. Vautrin, A. Loiseau, F. Mougel, E. Baudry, A. Estoup, L. Garnery, M. Haberl, and J.M. Cornuet. 2003. Five hundred and fifty microsatellite markers for the study of the honey bee (*Apis mellifera* L.) genome. *Molecular Ecology Notes* 3: 307-311.
- Susnik, S., P. Kozmus, P. Poklukar, and J. Meglic. 2004. Molecular characterisation of indigenous *Apis mellifera carnica* in Slovenia. *Apidologie* 35: 623-636.

- Szalanski, A.L., and R.M. Magnus. 2010. Mitochondrial DNA diversity of Africanized honey bee (*Apis mellifera* L.) populations from south central United States. *Journal of Apicultural Research* 49: 177-185.
- Taylor, O.R. 1985. African bees: potential impact in the United States. *Bull. Entomol. Soc. Am.* 31: 14-24.
- Toullec, A.N.K. 2008. Abeille noire, *Apis mellifera mellifera*, Historique et sauvegarde. *Thèse École Doctorale Vétérinaire, Maison Alfort*, 168p.
- Whitfield, C.W., S.K. Behura, S.H. Berlocher, A.G. Clark, J.S. Johnston, W.S. Sheppard, D.R. Smith, A.V. Suarez, D. Weaver, and N.D. Tsutsui. 2006. Thrice out of Africa: ancient and recent expansions of the honey bee, *Apis mellifera*. *Science* 314: 642-645.
- Wilson, E.O. 1971. The Insect Societies. In: *Belknap Press, Harvard University, Cambridge Massachusetts*, 548p.
- Winston, M. L. 1987. The biology of the honey bee. *Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, USA*, 281p.
- Winston, M.L. 1992. The biology and management of Africanized honey bees. *Annu. Rev; entomol.* 37: 173-193.
- Wright, S. 1951. The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics*:323-354.
- Zane, L., L. Bargelloni, and T. Patarnello. 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular ecology* 11:1-16.
- Zayed, A. 2009. Bee genetics and conservation. *Apidologie* 40: 237-262.
- Zeh, J.A., and D.W. Zeh. 2001. Reproductive mode and the genetic benefits of polyandry. *Animal Behaviour* 61: 1051-1063.

LEXIQUE :

1- Pollinisateur (n. mas) : vecteur externe permettant le transfert de pollen depuis les anthères (organes mâles) vers le stigmate (organe femelle) d'une fleur ou sur une autre fleur.

2- Angiospermes (n. fem) : Plantes à fleurs portant des graines à l'intérieur d'un compartiment protecteur appelé ovaire.

3- Dérive génétique (n. fem) : Fluctuations imprévisibles dans les fréquences alléliques d'une génération à l'autre en raison de la taille finie d'une population.

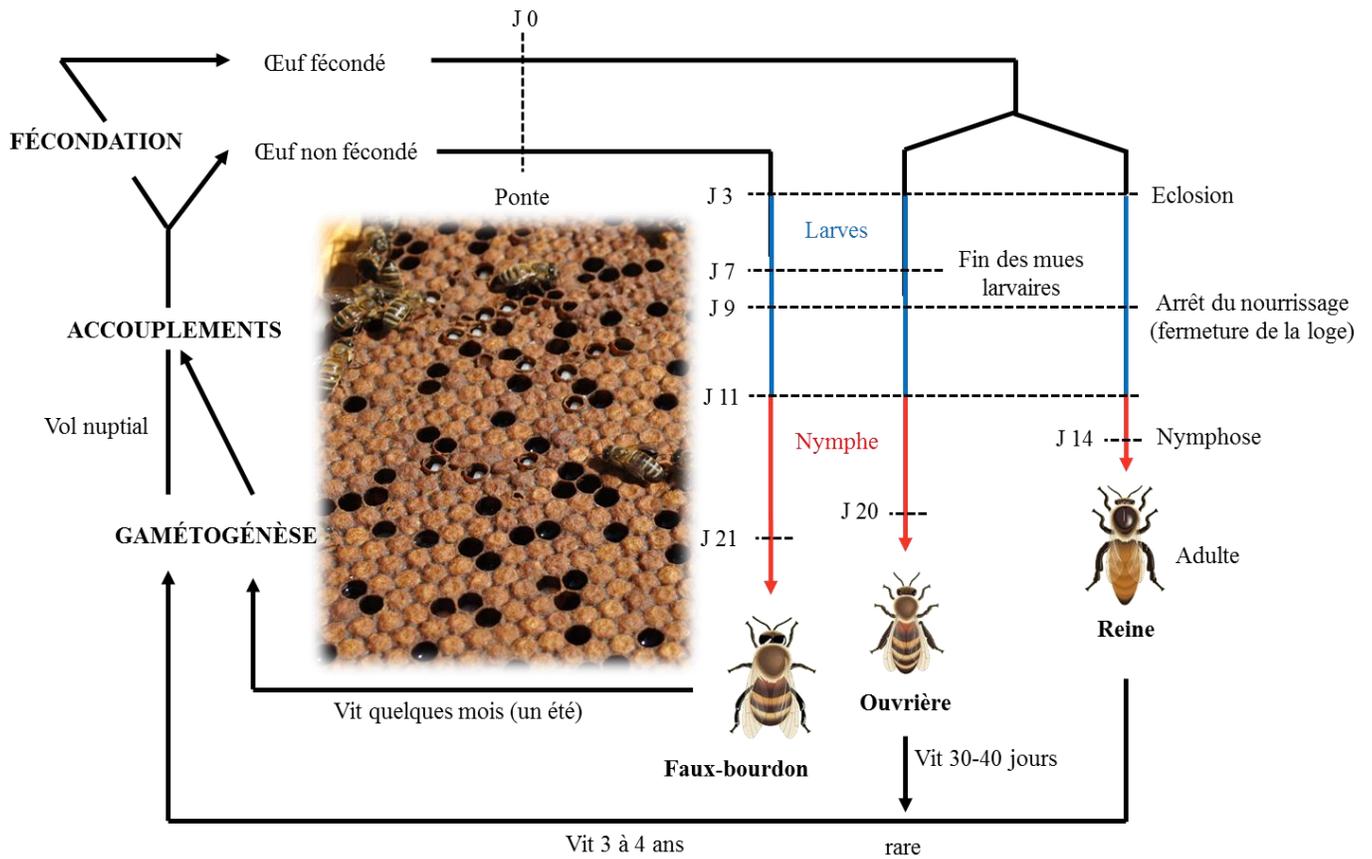
4- Consanguinité (n. fem) : c'est reproduction entre individus apparentés génétiquement (ex : autofécondation). La dépression de consanguinité sont l'ensemble des effets délétères de la consanguinité sur la survie et la reproduction.

5- Introgression (n. fem) : introduction de caractéristiques moléculaires et héréditaires d'une espèce (ou sous-espèce) dans le génome d'une autre espèce (ou sous-espèce) par hybridation récurrente.

6- Eusocialité (n. fem) : mode de vie social le plus élaboré; s'applique particulièrement bien aux insectes sociaux les plus évolués qui sont caractérisés par : (I) l'existence d'une coopération dans les soins aux jeunes, (II) le chevauchement d'au moins deux générations d'individus, les descendants assistants leurs parents pendant une partie de leur vie, (III) l'existence d'individus spécialisés dans la reproduction et qui aboutit à une division du travail entre femelles les unes restants stériles et les autres assurant la descendance (Wilson 1971).

7- Monogyne (n.fem) : type de colonie dirigée par une seule reine, ou femelle reproductrice

8- Transhumance (n.fem) : déplacement d'un cheptel agricole (apiculture, élevage, ...) d'une zone A à une zone B afin de trouver les ressources nécessaires pour maintenir le nombre et la qualité du cheptel.



ANNEXE 1 : Schéma du cycle de vie d'*Apis mellifera*. (Sources: inspiré de Stouff, P. 2002. *L'abeille*. In *Sciences de la vie et de la Terre*. <http://pst.chez-alice.fr/svtiufm/abeille.html> et TECHER M.)

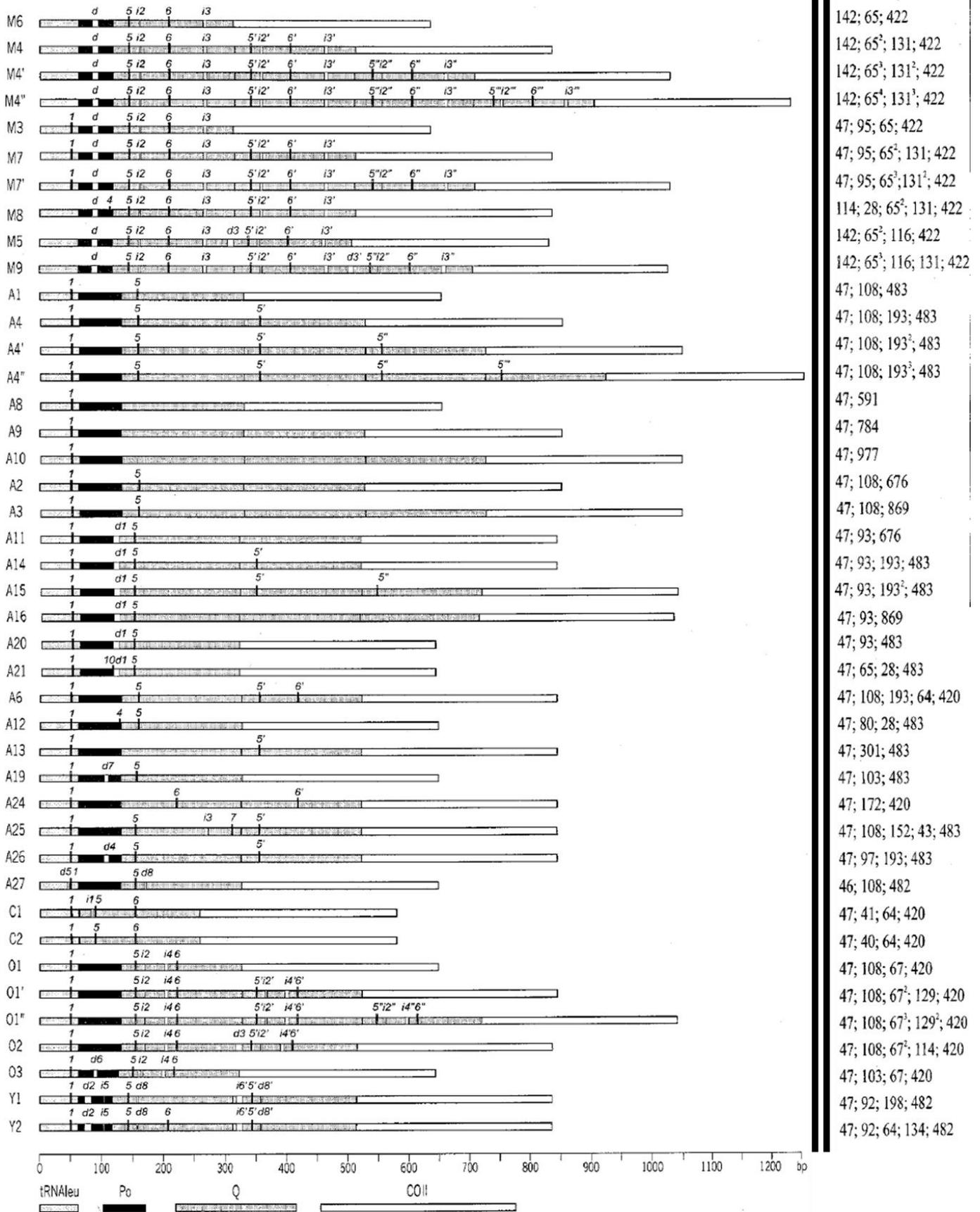
ANNEXE 2 : Tableau résumé de l'échantillonnage des colonies d'abeilles à La Réunion avec indication de l'origine (Apiculteur + rucher ou colonie sauvage), la date de récolte, le lieu de récolte, rucher transhumant ou non et le nombre de colonies échantillonnées.

Origine	Date	Site d'échantillonnage	Transhumant	Effectif
Sauvage 2	08/09/2010	EST - Bébour		1
Sauvage 3	08/09/2010	EST - Bébour		1
Sauvage 4	08/09/2010	EST - Bébour		1
Sauvage 5	17/09/2010	CENTRE - Mafate		1
Sauvage 6	17/09/2010	CENTRE - Mafate		1
Sauvage 7	17/09/2010	CENTRE - Mafate		1
Sauvage 8	27/09/2010	SUD - Les Makes		1
Sauvage 9	27/09/2010	SUD - Les Makes		1
Sauvage 10	27/09/2010	SUD - Les Makes		1
Sauvage 11	14/10/2010	OUEST - St Paul		1
Sauvage 12	18/11/2010	SUD - St Joseph		1
Sauvage 13	29/11/2011	OUEST - Petit Boucan		1
Sauvage 14	13/12/2011	NORD - St André		1
Sauvage 15	01/04/2012	NORD - Ste Marie		1
Sauvage 16	20/04/2012	CENTRE - Cilaos		1
Apiculteur 1	18 au 20/09/2010	CENTRE - Mafate	Non	3
Apiculteur 2	14/10/2010	OUEST - St Paul	Non	1
Apiculteur 3	14/10/2010	OUEST - St Paul	Non	2
Apiculteur 4	14/10/2010	OUEST - St Paul	Non	3
Apiculteur 5	18/11/2010	SUD - St Joseph	Non	1
Apiculteur 6	10/12/2011	NORD - Ste Clotilde	Non	1
Apiculteur 7	12/12/2011	EST - St Benoit	Non	4
Apiculteur 8	12/12/2011	EST - St Benoit	Oui	4
Apiculteur 9	12/12/2011	EST - St Benoit	Oui	5
Apiculteur 10	12/12/2011	EST - Ste Anne	Oui	20
Apiculteur 11	13/12/2011	NORD - St André	Oui	28
Apiculteur 12	a) 13/12/2011	NORD - Ste Suzanne	Non	42
	b) 08/02/2012	OUEST - St Gilles	Non	17
Apiculteur 13	13/12/2011	EST - Bras - Panon	Oui	5
Apiculteur 14	a) 03/11/2011	EST - St Benoit	Oui	1
	b) 03/11/2011	EST - St Benoit	Oui	19
	c) 03/11/2011	SUD - St Joseph	Oui	18
	d) 03/11/2011	SUD - St Joseph	Oui	16
	e) 03/11/2011	SUD - St Joseph	Oui	6
Apiculteur 15	13/12/2011	SUD - St Louis	Oui	20
Apiculteur 16	13/12/2011	SUD - St Louis	Oui	20
Apiculteur 17	a) 13/12/2011	SUD - St Louis	Oui	20
	b) 13/12/2011	SUD - St Louis	Oui	20
	c) 13/12/2011	SUD - St Louis	Non	20
	d) 13/12/2011	SUD - St Louis	Oui	20
	e) 13/12/2011	SUD - St Louis	Oui	20
Apiculteur 18	14/12/2011	SUD - St Pierre	Non	41
Apiculteur 19	a) 13/12/11 et 25/04/12	SUD - L'Etang-Salé	Oui	9
	b) 13/12/11 et 25/04/12	SUD - L'Etang-Salé	Oui	15
	c) 13/12/11 et 25/04/12	SUD - Les Avirons	Oui	6
	d) 13/12/2011	SUD - Les Avirons	Oui	1
	e) 13/12/11 et 25/04/12	SUD - St Joseph	Oui	9
	f) 25/04/2012	SUD - St Joseph	Oui	3
	g) 25/04/2012	SUD - St Joseph	Oui	6
	h) 25/04/2012	SUD - Le Tampon	Oui	7
	i) 13/12/2011	OUEST - St Leu	Oui	1
	j) 13/12/2011	OUEST - St Leu	Oui	2
	k) 13/12/2011	OUEST - St Leu	Oui	2
	l) 13/12/11 et 25/04/12	OUEST - St Paul	Oui	10
	m) 13/12/11 et 25/04/12	OUEST - St Paul	Oui	10
	n) 13/12/2011	OUEST - La Possession	Oui	2
	o) 25/04/2012	OUEST - La Possession	Oui	14
	p) 25/04/2012	OUEST - La Possession	Oui	12



ANNEXE 2 : Tableau résumé de l'échantillonnage des colonies d'abeilles à La Réunion avec indication de l'origine (Apiculteur + rucher ou colonie sauvage), la date de récolte, le lieu de récolte, rucher transhumant ou non et le nombre de colonies échantillonnées.

Origine	Date	Site d'échantillonnage	Transhumant	Effectif
Apiculteur 19	q) 25/04/2012	OUEST - Entre - Deux	Oui	6
	r) 13/12/11 et 25/04/12	NORD - St Denis	Oui	5
	s) 13/12/11 et 25/04/12	NORD - St Denis	Oui	5
	t) 13/12/2011	NORD - Ste Suzanne	Oui	2
	u) 13/12/2011	EST - Salazie	Oui	3
	v) 13/12/2011	EST - Salazie	Oui	1
Apiculteur 20	14/12/2011	SUD - Le Tampon	Non	2
Apiculteur 21	a) 14/12/2011	SUD - St Philippe	Oui	23
	b) 14/12/2011	SUD - St Philippe	Oui	7
Apiculteur 22	a) 15/12/2011	SUD - St Philippe	Oui	74
	b) 15/12/2011	SUD - St Philippe	Oui	55
Apiculteur 23	09/02/2012	SUD - Les Aviron	Non	2
Apiculteur 24	18/12/2011	SUD - L'Etang-Salé	Oui	11
Apiculteur 25	a) 19/12/2011	SUD - St Louis	Oui	27
	b) 19/12/2011	SUD - St Louis	Non	24
	c) 19/12/2011	SUD - St Louis	Oui	31
	d) 19/12/2011	SUD - St Louis	Oui	27
Apiculteur 26	a) 22/12/2011	EST - Ste Rose	Non	34
	b) 22/12/2011	EST - Ste Rose	Oui	24
	c) 22/12/2011	EST - Ste Rose	Oui	21
	d) 22/12/2011	EST - St Benoit	Oui	27
Apiculteur 27	16/01/2012	OUEST - St Leu	Non	13
Apiculteur 28	a) 16/01/2012	OUEST - St Leu	Non	10
	b) 16/01/2012	OUEST - St Leu	Non	19
Apiculteur 29	18/01/2012	SUD - St Philippe	Non	37
Apiculteur 30	19/01/2012	EST - St Benoit	Non	63
Apiculteur 31	a) 20/01/2012	SUD - St Joseph	Non	18
	b) 20/01/2012	SUD - St Joseph	Non	5
	c) 20/01/2012	SUD - St Joseph	Non	25
Apiculteur 32	20/01/2012	SUD - St Joseph	Oui	9
Apiculteur 33	21/01/2012	NORD - Ste Marie	Non	1
Apiculteur 34	25/01/2012	EST - Ste Rose	Oui	99
Apiculteur 35	a) 06/12/2010	EST - Plaine des Palmiste	Oui	3
	b) 06/12/2010	SUD - St Philippe	Oui	2
	c) 10/12/2010	SUD - L'Etang-Salé	Oui	3
	d) 29/03/2012	SUD - St Philippe	Oui	4
	e) 29/03/2012	SUD - St Louis	Oui	22
	f) 29/03/2012	OUEST - St Leu	Oui	22
Apiculteur 36	26/01/2012	SUD - St Philippe	Non	50
Apiculteur 37	27/01/2012	NORD - St Denis	Oui	32
Apiculteur 38	a) 30/01/2012	EST - St Benoit	Oui	1
	b) 30/01/2012	EST - St Benoit	Oui	30
	c) 30/01/2012	EST - St Benoit	Oui	31
Apiculteur 39	a) 31/01/2012	SUD - St Joseph	Oui	40
	b) 31/01/2012	SUD - St Joseph	Oui	40
Apiculteur 40	a) 01/02/2012	EST - Bras - Panon	Non	9
	b) 01/02/2012	EST - Bras - Panon	Non	15
	c) 01/02/2012	EST - Bras - Panon	Non	14
Apiculteur 41	03/02/2012	SUD - St Louis	Non	15
Apiculteur 42	03/02/2012	SUD - St Pierre	Non	6
Apiculteur 43	21/02/2012	SUD - Le Tampon	Oui	28
Apiculteur 44	a) 07/02/2012	SUD - Les Aviron	Oui	69
	b) 23/02/2012	SUD - L'Etang-Salé	Oui	51
Apiculteur 45	21/02/2012	EST - Bras - Panon	Non	38
Apiculteur 46	a) 24/02/2012	SUD - St Pierre	Oui	9
	b) 27/02/2012	SUD - St Joseph	Oui	11
Apiculteur 47	14/03/2012	SUD - La Plaine des cafres	Non	24
Apiculteur 48	19/03/2012	SUD - St Louis	Non	1
Apiculteur 49	26/03/2012	SUD - Petite île	Non	1
Apiculteur 50	20/04/2012	CENTRE - Cilaos	Non	59
Apiculteur 51	20/04/2012	CENTRE - Cilaos	Non	40



ANNEXE 3 : Sites de restriction et tailles des fragments de restriction après digestion *DraI* sur produits d'amplification PCR de la région mitochondriale inter-génique COI-COII des 26 haplotypes chez *Apis mellifera*. Les lettres A, M et C de chaque haplotype correspond aux lignées Africaines, Ouest-Européenne et Nord-Méditerranéenne respectivement. Les sites de restriction numérotés de 1 à 12 ; d1, d2, d3, i1, i2 et i3 correspondent à de petites délétions ou insertions (Source : Franck *et al.* 1998).

ANNEXE 4 : Tableau présentant le détail du protocole d'extraction d'ADN d'abeille en plaque avec les descriptifs et intérêt des différentes étapes.

Étape du protocole	Intérêt de l'étape
1) Préparer 9 plaques de 96 puits pour extractions. Avec une pince fine arracher 6 pattes d'abeille et les mettre dans un puits de la plaque (et ainsi de suite pour toutes les abeilles à extraire). Mettre les plaques au frigo à -80°C en attendant l'étape d'extraction.	6 pattes suffisent pour avoir un concentré d'ADN et le garder à -80°C assure sa conservation
2) Lors de l'étape d'extraction, rajouter 400 μl de tampon 1 d'extraction (c.-à-d. tampon 1 + SDS + Protéinase K) dans chacun des puits.	Le SDS permet la lyse des cellules et des tissus tandis que la protéinase K va les digérer et permet à l'ADN de sortir des cellules
3) Mettre les plaques en petite étuve une nuit à 60°C pour laisser les pattes infuser dans le tampon 1.	Cela évite l'étape du vibrobroyage et les risques de contaminations inhérents aux fuites d'un puits à l'autre.
4) Le lendemain matin centrifuger les plaques dans la centrifugeuse pendant 20 secondes à 4700 rpm (maximum du rotor)	La centrifugation permet de faire tomber la condensation due à la chaleur de l'étuve.
5) Ajouter 50 μl de tampon 2 (acétate de potassium à 8M) et attendre 5 minutes.	L'acétate de potassium précipite le complexe protéine-SDS au fond des puits
6) Centrifuger 30 min, 4700 rpm, TA (= $T^{\circ}\text{C}$ ambiante)	Les débris cellulaires plus lourds que l'ADN vont former des culots au fond des puits
7) Prendre une plaque neuve. Récupérer le surnageant des premières plaques et les transférer sans toucher les culots	L'ADN plus léger et ne formant pas de complexe avec le SDS et la protéinase K est dans le surnageant
8) Rajouter 2,5 volumes d'éthanol absolu (exemple : 400 μl de surnageant récupéré, rajouter 1000 μl d'éthanol).	L'éthanol réagit avec l'ADN et forme un précipité blanc
9) Centrifuger 1 heure à 4700 rpm, TA (= $T^{\circ}\text{C}$ ambiante).	Permet à l'ADN de tomber au fond des puits
10) Vider l'éthanol avec une pipette sans toucher au culot opaque	L'éthanol peut inhiber les réactions PCR et doit être éliminé complètement
11) Mettre les plaques en étuve à 37°C pendant 1 à 2 heures	
12) Reprendre le culot dans 200 μl de TE (= tampon d'élution) sans vortexer.	L'ADN est ainsi remis en suspension

ANNEXE 4 (suite) : Tableau présentant le détail du protocole d'extraction d'ADN d'abeille en plaque avec les descriptifs et intérêt des différentes étapes.

1) Fermer la plaque avec un papier autocollant ou en la thermocollant avec du film aluminium. Laisser sur la paillasse une nuit puis stocker au congélateur.	
2) Le lendemain, diluer l'ADN avec de l'eau HPLC au 10 ^{ième} et doser au nano drop. 5µl ADN avec 45µl H ₂ O.	L'eau HPLC est pure et ne contient pas de particule minérale

Pour l'extraction se munir de:

- $n \times 2$ plaques de 96 puits (n avec abeilles et n neuves pour récupérer le surnageant), 400µl de tampon 1 par puits, 50µl de tampon 2 par puits, 1ml d'éthanol absolu par puits, 200µl de tampon d'élution (= TE) par puits.

- Tampon 1 d'extraction : 40 ml / plaque de 96 puits, contenant 0.8g de SDS + 0.004g protéinase K

ANNEXE 5 : Tableau présentant le détail du protocole de génotypage microsatellites d'abeille, en plaque avec les descriptifs et intérêt des différentes étapes.

Étape du protocole	Intérêt de l'étape
1) Une fois la PCR effectuée, faire un gel de vérification à 4% et estimer la dilution des plaques pour le génotypage.	La présence de fragments d'ADN (bandes sur le gel) permet de vérifier si celui-ci a bien été amplifié. Plus la bande est intense, plus il y a d'ADN
2) Effectuer la dilution sur une plaque neuve préalablement stérilisé aux UV. Par exemple au 1/10 ^{ème} (soit 1µl de produit PCR + 9µl H2O dans chaque puits).	La stérilisation évite une éventuelle contamination par un ADN étranger ou la présence de composés inhibiteurs.
3) Laisser décongeler un tube contenant du formamide sous la hotte aspirante. Stériliser ensuite aux UV une plaque PCR 96 puits, une nappe gris-clair, et une nappe gris-foncé et un tube 2ml pour effectuer le mix formamide sous la hotte.	Le formamide est un agent dénaturant de l'ADN et permet son passage de double brin à simple brin.
4) Une fois le formamide décongelé, sortir le tube de marqueur de taille (<i>Gene Scan-500Liz Size Standard AB</i>) du réfrigérateur et le mettre sous la hotte.	Le formamide doit toujours être manipulé sous hotte car il est dangereux pour la santé.
5) Pour la préparation du mix : prélever 1498 µl formamide + 42 µl marqueur de taille dans le tube de 2ml (dose pour une plaque de 140puits) ou prélever 10,7 µl formamide + 0,3 µl marqueur de taille pour le dosage d'un puits. Homogénéiser ensuite le mix avec le formamide au vortex.	Le marqueur de taille permet au génotypeur d'avoir une échelle de taille en paire de bases et de déterminer la taille des futurs fragments lus.
6) Déposer 11µl du mix formamide dans chaque puits de la plaque PCR + 1µl de produit PCR (ou la dilution au 1/10 ^{ème} du produit PCR).	L'ADN doit être simple brin pour migrer dans les capillaires et être lu par le génotypeur.
7) Ne pas laisser de puits vides dans un run. S'il y a des puits vides mettre quand même du mix formamide + marqueur de taille dans chaque puits.	
8) Recouvrir la plaque PCR avec la nappe gris-clair (les côtés bombés dans les puits).	Permet de protéger les puits d'éventuelles impuretés
9) Centrifuger brièvement la plaque PCR dans la centrifugeuse à plaque et la mettre dans un thermocycleur à 95°C pendant 5 minutes.	La centrifugation des plaques permet d'éliminer les bulles d'air qui peuvent abimer les capillaires du génotypeur et le passage au thermocycleur assure une bonne dénaturation

ANNEXE 5 (suite) : Tableau présentant le détail du protocole de génotypage microsatellites d'abeille, en plaque avec les descriptifs et intérêt des différentes étapes.

10) Sortir la plaque du thermocycleur et la poser sur la glace pendant 5 minutes.	Le froid maintien l'ADN à l'état simple brin
11) Retirer la nappe gris-clair et mettre la nappe gris-foncé contenant les guides pour les capillaires sur la plaque.	
12) Pour le passage au séquenceur, mettre la plaque PCR dans un support noir et clipper avec un couvercle blanc prévu à cet effet. Respecter les sens : A1 noté sur la plaque doit se superposer au coin A1 du support. Vérifier que les trous du couvercle blanc et les trous de la nappe gris-foncé se superposent bien.	Respecter le sens évite d'avoir de mauvaises surprises. Si les ouvertures (trous) ne sont pas bien alignées, alors lors de l'insertion des capillaires dans les puits ils peuvent se briser.
13) Faire venir le chariot du séquenceur en appuyant sur « tray ». Une fois arrivée, positionné la plaque l'A1 sur la place indiquée comme la 1 ^{ère} à runner.	
14) Vérifier que le bac à eau de rinçage, le bac à eau poubelle ainsi que le bac du tampon, sont toute bien mises. Refermer bien la porte du séquenceur.	Nécessaire au bon déroulement des génotypages
15) Ouvrir le logiciel « <i>AB applied biosystem 3130XL</i> » pour créer un plan de plaque et suivre les instructions d'utilisation du séquenceur pour le génotypage.	Le plan de plaque est important pour correctement affecter les lectures aux bons individus
16) Une fois les lectures éterminées, récupérer les données à l'aide du logiciel <i>GeneMapper</i> ou <i>Peak Scanner</i> .	

ANNEXE 6 : Tableau présentant les fréquences alléliques pour chaque allèle de chaque *locus* et ce pour d'une part l'ensemble des colonies de l'île de La Réunion et d'autre part les quatre groupes mitochondriaux retrouvés sur l'île avec les haplotypes A1 (*Apis mellifera unicolor*), C2 (*Apis mellifera carnica*), A4 (*Apis mellifera scutellata*) et M8 (*Apis mellifera iberiensis*). Les astérisques indiquent les allèles diagnostiques de De la Rúa *et al.* 2003 et Garnery *et al.* 1998. (*Source* : SPAGeDi 1.3)

Locus	Allèles	Tous (n=1588)	A1 (n=1447)	C2 (n=63)	A4 (n=3)	M8 (n=5)
A113	194	0,0003	0,0004			
	198	0,0013	0,0014			
	202	0,0006	0,0007			
	208	0,0173	0,0176	0,0161		
	210	0,4528	0,4553	0,4839	0,3333	0,2000
	212	0,1114	0,1092	0,1613		0,1000
	214	0,2052	0,2058	0,1210	0,5000	0,5000
	216	0,0128	0,0134			
	218	0,0231	0,0229	0,0242		
	220	0,1015	0,1004	0,1048	0,1667	
	222	0,0100	0,0109			
	224	0,0116	0,0113	0,0242		
	226	0,0209	0,0211	0,0161		
	228	0,0247	0,0236	0,0403		0,2000
	230	0,0039	0,0032	0,0081		
	232*	0,0016	0,0018			
	234*	0,0003	0,0004			
	236	0,0006	0,0007			
A24	93	0,0539	0,0547	0,0318	0,1667	
	97	0,1881	0,1869	0,1746	0,3333	0,2000
	99	0,0006	0,0007			
	101*	0,2275	0,2271	0,2778	0,1667	0,2000
	103*	0,5266	0,5272	0,5159	0,3333	0,6000
	105*	0,0032	0,0035			
A7	124	0,0003		0,0083		
	128*	0,0567	0,0576	0,0333	0,1667	
	132	0,1863	0,1848	0,1833	0,3333	0,2000
	134	0,0036	0,0040			
	136	0,2220	0,2214	0,2667	0,1667	0,2000
	138	0,5208	0,5210	0,5083	0,3333	0,6000
	140	0,0102	0,0112			
Ac306	164	0,4452	0,4448	0,4683	0,3333	0,8000
	168	0,0176	0,0165	0,0556		
	172	0,0590	0,0598	0,0556	0,1667	0,2000
	174	0,3253	0,3234	0,3571	0,5000	
	176	0,0622	0,0623	0,0318		
	178	0,0718	0,0739	0,0318		
	180	0,0013	0,0011			
	184	0,0176	0,0183			
AP55	173	0,0010	0,0011			
	175	0,1162	0,1163	0,1290		0,2000
	177	0,2325	0,2361	0,2097	0,1667	0,2000
	179	0,0886	0,0881	0,0968	0,1667	0,1000
	181	0,5173	0,5145	0,5161	0,6667	0,4000
	183	0,0225	0,0215	0,0403		0,1000
	185	0,0016	0,0018			
	187	0,0080	0,0088			
	189	0,0003	0,0004			
	191	0,0119	0,0116	0,0081		
AP81	123	0,0763	0,0773	0,0603	0,3333	
	125	0,1966	0,1965	0,1810		0,1667
	127	0,0832	0,0833	0,0345		
	131	0,0041	0,0042	0,0086		
	133	0,0007	0,0008			
	135	0,5828	0,5799	0,7069	0,6667	0,8333
	137	0,0519	0,0532	0,0086		
	139	0,0045	0,0049			

Locus	Allèles	Tous (n=1588)	A1 (n=1447)	C2 (n=63)	A4 (n=3)	M8 (n=5)
AX	98	0,1393	0,1441	0,1000		
	100	0,0094	0,0089	0,0333		
	102	0,0375	0,0388	0,0222		
	104	0,0013	0,0014			
	108	0,2240	0,2250	0,1778	0,3333	
	110	0,0153	0,0168			
	112	0,4238	0,4139	0,4556	0,5000	0,8000
	114	0,1022	0,1066	0,0778		0,2000
	116	0,0396	0,0379	0,0889	0,1667	
	118	0,0077	0,0066	0,0444		
A107	157	0,0051	0,0056			
	159	0,0024	0,0026			
	161	0,0240	0,0225	0,0417		
	163	0,0071	0,0078			
	165	0,0776	0,0805	0,0313		
	167	0,0075	0,0074	0,0208		
	169	0,5130	0,5108	0,5313	0,5000	0,6667
	173	0,0035	0,0026	0,0104		
	175	0,0524	0,0537	0,0417	0,1667	0,1667
	177	0,1269	0,1273	0,1354	0,1667	0,1667
	179	0,0788	0,0801	0,0729	0,1667	
	181	0,0934	0,0909	0,1042		
	183	0,0071	0,0069	0,0104		
	185	0,0012	0,0013			
A29	126	0,0246	0,0228	0,0306		
	128	0,5054	0,5038	0,5816	0,5000	0,3333
	130	0,0680	0,0696	0,0306	0,1667	
	132	0,0280	0,0291			
	134	0,0015	0,0017			
	136	0,0015	0,0013			
	138	0,0192	0,0194	0,0102		0,1667
	140	0,0357	0,0363	0,0306		
	142	0,0307	0,0308	0,0408	0,1667	
	144	0,0373	0,0367	0,0612		
	146	0,0419	0,0422	0,0408	0,1667	
	148	0,0307	0,0300	0,0306		0,1667
	150	0,0100	0,0093	0,0306		
	152	0,0096	0,0093			
	154	0,0388	0,0397	0,0306		
	156	0,0319	0,0338	0,0102		
	158	0,0138	0,0127	0,0306		
	160	0,0196	0,0190	0,0204		0,1667
162	0,0280	0,0283			0,1667	
164	0,0077	0,0080	0,0102			
166	0,0138	0,0144	0,0102			
168	0,0023	0,0021				
A88	133	0,0022	0,0025			
	137	0,2752	0,2726	0,3400		0,1667
	139	0,0026	0,0029			
	141	0,0490	0,0497	0,0300		
	143	0,0011	0,0008	0,0100		
	145	0,0019	0,0021			
	147	0,1627	0,1642	0,1300		
	149	0,4776	0,4795	0,4300	0,8333	0,8333
	151	0,0150	0,0148	0,0300		
	153	0,0127	0,0111	0,0300	0,1667	

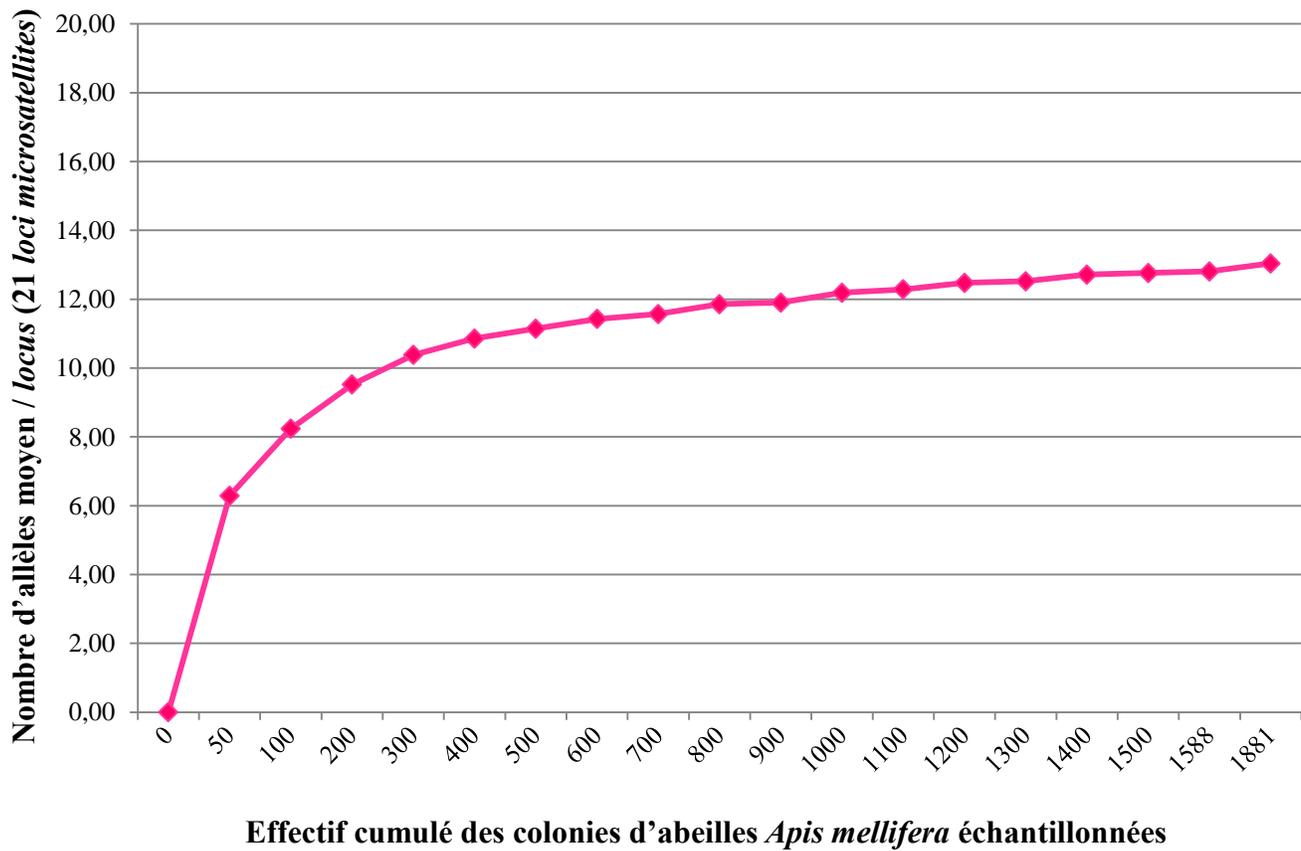
ANNEXE 6 (suite) : Tableau présentant les fréquences alléliques pour chaque allèle de chaque *locus* et ce pour d'une part l'ensemble des colonies de l'île de La Réunion et d'autre part les quatre groupes mitochondriaux retrouvés sur l'île avec les haplotypes A1 (*Apis mellifera unicolor*), C2 (*Apis mellifera carnica*), A4 (*Apis mellifera scutellata*) et M8 (*Apis mellifera iberiensis*). Les astérisx indiquent les allèles diagnostiques de De la Rúa *et al.* 2003 et Garnery *et al.* 1998. (*Source : SPAGeDi 1.3*)

Locus	Allèles	Tous (n=1588)	A1 (n=1447)	C2 (n=63)	A4 (n=3)	M8 (n=5)	
AP273	105	0,0008	0,0008				
	107	0,5091	0,5087	0,5306	0,1667	0,5000	
	109	0,0072	0,0075				
	111	0,4785	0,4785	0,4592	0,8333	0,5000	
	113	0,0045	0,0046	0,0102			
AP28	124	0,0004	0,0004				
	126	0,0004	0,0004				
	128	0,0628	0,0649	0,0300			
	130	0,0030	0,0033				
	132	0,1739	0,1695	0,2500	0,6667	0,1667	
	133	0,3115	0,3112	0,2900		0,6667	
	135	0,4439	0,4466	0,4100	0,3333	0,1667	
	136	0,0030	0,0033				
	137	0,0007		0,0200			
	138	0,0004	0,0004				
AP289	174	0,0209	0,0212	0,0109			
	178	0,0008	0,0009				
	184	0,8995	0,9033	0,8804	0,6667	1,0000	
	186	0,0024	0,0022				
	190	0,0028	0,0026				
	198	0,0016	0,0017				
	200	0,0106	0,0086	0,0217	0,3333		
	202	0,0288	0,0289	0,0326			
	204	0,0012	0,0013				
	206	0,0169	0,0143	0,0435			
	208	0,0004	0,0004				
	210	0,0039	0,0035	0,0109			
	212	0,0102	0,0112				
	B124	210	0,0004	0,0004			
212		0,0039	0,0042				
214		0,0085	0,0085	0,0100			
216		0,1768	0,1790	0,1800	0,1667	0,1667	
218		0,1144	0,1132	0,0700	0,1667		
220		0,1079	0,1107	0,0600			
222		0,0867	0,0869	0,1200		0,1667	
224		0,0139	0,0140				
226		0,0158	0,0140	0,0300	0,1667	0,1667	
228		0,0143	0,0132	0,0300		0,1667	
230		0,3086	0,3062	0,3900	0,3333	0,1667	
232		0,1152	0,1154	0,0800	0,1667	0,1667	
234		0,0200	0,0208	0,0100			
236		0,0116	0,0115	0,0100			
240		0,0012	0,0013				
242	0,0012	0,0009	0,0100				
A14	214	0,0004	0,0004				
	216	0,2768	0,2752	0,3333	0,1667	0,2000	
	218	0,0117	0,0125	0,0083			
	220	0,0102	0,0108				
	222	0,0325	0,0322	0,0250			
	224	0,5830	0,5838	0,5417	0,6667	0,7000	
	226	0,0110	0,0116	0,0083			
	230	0,0031	0,0030	0,0083			
	232	0,0654	0,0649	0,0667	0,1667	0,1000	
	234	0,0047	0,0043	0,0083			
	236	0,0012	0,0013				
	A35	92	0,0386	0,0390	0,0403		0,1000
		94	0,2394	0,2385	0,2500	0,3333	0,1000
		100	0,0102	0,0101			
106		0,0049	0,0054				
108		0,1972	0,1948	0,2339	0,1667		
110		0,0290	0,0289	0,0403			
112		0,4330	0,4362	0,3790	0,3333	0,8000	
114		0,0139	0,0130	0,0403			
116		0,0284	0,0296	0,0081	0,1667		
118		0,0033	0,0029	0,0081			
120		0,0020	0,0018				
A43		106	0,0249	0,0250	0,0417		
		108	0,0055	0,0047	0,0104		
		110	0,0103	0,0103	0,0208		
		112	0,0115	0,0108	0,0104		
		114	0,0012	0,0004	0,0208		
		116	0,0016	0,0017			
		120	0,0008	0,0009			
	122	0,4700	0,4690	0,4479	0,6667	0,5000	
	124	0,0190	0,0185	0,0208	0,3333		
	126	0,1410	0,1413	0,1146		0,1250	
	128	0,0138	0,0142				
	138	0,0466	0,0452	0,0625			
	140	0,0723	0,0749	0,0417		0,1250	
	142	0,0071	0,0078				
144	0,0276	0,0280	0,0313		0,1250		
146	0,0213	0,0198	0,0521				
148	0,0012	0,0013					
150	0,0099	0,0099	0,0104		0,1250		
152	0,1094	0,1107	0,1146				
158	0,0024	0,0026					
160	0,0008	0,0009					
164	0,0020	0,0022					
A8	133	0,0108	0,0113	0,0093			
	137	0,0016	0,0017				
	139	0,0016	0,0017				
	143	0,0187	0,0187	0,0278			
	147	0,0088	0,0070	0,0093			
	149	0,0020	0,0017	0,0093			
	153	0,0730	0,0695	0,1296			
	155	0,0207	0,0209	0,0185			
	157	0,0574	0,0556	0,0926			
	159	0,0431	0,0452	0,0370			
	161	0,1878	0,1864	0,1944		0,1667	
	163	0,0805	0,0830	0,0556	0,2500		
	165	0,1049	0,1047	0,1111	0,2500	0,5000	
	167	0,0793	0,0804	0,0741		0,1667	
	169	0,1368	0,1390	0,0926	0,2500		
	171	0,0498	0,0504	0,0370	0,2500	0,1667	
173	0,0052	0,0057					
175	0,0231	0,0217	0,0463				
177	0,0502	0,0508	0,0278				
179	0,0211	0,0209	0,0185				
181	0,0223	0,0226	0,0093				
183	0,0008	0,0009					
185	0,0004	0,0004					

ANNEXE 6 (suite) : Tableau présentant les fréquences alléliques pour chaque allèle de chaque *locus* et ce pour d'une part l'ensemble des colonies de l'île de La Réunion et d'autre part les quatre groupes mitochondriaux retrouvés sur l'île avec les haplotypes A1 (*Apis mellifera unicolor*), C2 (*Apis mellifera carnica*), A4 (*Apis mellifera scutellata*) et M8 (*Apis mellifera iberiensis*). Les astéris indiquent les allèles diagnostiques de De la Rúa *et al.* 2003 et Garnery *et al.* 1998. (*Source* : SPAGeDi 1.3)

Locus	Allèles	Tous (n=1588)	A1 (n=1447)	C2 (n=63)	A4 (n=3)	M8 (n=5)
AP33	217	0,0077	0,0084			
	219	0,2865	0,2854	0,3571	0,1667	0,2000
	221	0,0054	0,0059			
	223	0,0107	0,0113			
	225	0,0704	0,0713	0,0357	0,5000	
	227	0,5547	0,5545	0,5268	0,1667	0,7000
	229	0,0034	0,0038			
	231	0,0099	0,0092	0,0357		
	235	0,0428	0,0423	0,0446	0,1667	0,1000
	237	0,0019	0,0017			
	239	0,0038	0,0034			
	241	0,0008	0,0008			
	243	0,0011	0,0013			
	245	0,0008	0,0008			
	AP36	119	0,4295	0,4364	0,3208	0,5000
121		0,2340	0,2257	0,2736	0,5000	
123		0,0316	0,0323	0,0472		
125*		0,0005	0,0005			
135		0,0262	0,0249	0,0566		
137		0,0759	0,0795	0,0472		
139		0,0050	0,0055			
141		0,0041	0,0035	0,0189		
143		0,1459	0,1441	0,1793		0,3000
145		0,0059	0,0055	0,0094		0,1000
147		0,0108	0,0099	0,0283		
149		0,0126	0,0134	0,0094		
153		0,0018	0,0020			
155		0,0032	0,0035			
157		0,0023	0,0025			
159		0,0014	0,0015			
161		0,0050	0,0055			
163		0,0041	0,0035	0,0094		
167	0,0005	0,0005				
AP66	82	0,0020	0,0022			
	84	0,0003	0,0004			
	86	0,0003	0,0004			
	92	0,0199	0,0189	0,0484		
	94	0,4215	0,4190	0,4839	0,1667	0,5000
	96	0,0007	0,0007			
	98	0,0063	0,0069			
	100	0,0472	0,0487	0,0161	0,1667	
	102	0,4309	0,4339	0,3548	0,5000	0,4000
	104	0,0685	0,0668	0,0887	0,1667	0,1000
	110	0,0003	0,0004			
	112	0,0020	0,0018	0,0081		

ANNEXE 8: Courbe nombre d'allèles moyen / locus en fonction de l'effectif de colonies échantillonnées avec les effectifs cumulés de colonies échantillonnées avec les 50 premières, puis les 100 (dont les 50 premières), puis les 200 (dont les 100 premières) et ainsi de suite jusqu'à n = 1881.



Résumé – L'abeille *Apis mellifera* L. est depuis longtemps établie à La Réunion et a été décrite sur critères morphologiques comme étant la sous-espèce *Apis mellifera unicolor*. Néanmoins, des introductions passées de trois sous-espèces européennes *A. mellifera ligustica*, *carnica* et *mellifera* ont été rapportées. Les potentielles adaptations aux conditions insulaires des sous-espèces importées et la diversité mitochondriale existante n'ont jamais été étudiés. De même la diversité génétique et sa structuration sur l'île n'ont pour le moment pas été explorées. Pour la première fois, la présence des lignées évolutives et des sous-espèces a été décrite par une analyse du polymorphisme de restriction d'une région inter-génique mitochondriale non codante. L'étude de la diversité génétique nucléaire chez les colonies d'abeilles à La Réunion a été effectuée à partir de 21 marqueurs microsatellites. Un total de 1881 colonies a été échantillonné sur 110 sites, provenant de 104 ruchers chez 51 apiculteurs ainsi que 15 colonies sauvages ont été récoltées. Les profils de restriction de la région inter-génique ont permis d'identifier deux haplotypes Africains et deux Européens (Ouest et Est) avec des fréquences et distributions inégales. L'haplotype A1 a été retrouvé comme dominant à 95,17%, puis C2 avec 4,38% et les haplotypes A4 et M8 avaient des fréquences inférieures à 1%. Le profil de restriction observé pour A1 est identique à celui d'*Apis mellifera unicolor*. Tous les profils RFLP différents ont été séquencés et identifiés comme appartenant à *Apis mellifera carnica* (C2), *Apis mellifera scutellata* (A4) et *Apis mellifera iberiensis* (M8). La diversité génétique globale était forte avec 12,81(± 5,37) allèles en moyenne/ locus, mais plus faible par apiculteur. Les résultats des AMOVA ont suggérés que la diversité n'est pas structurée en fonction des groupes mitochondriaux ni de la répartition géographique, toutefois les valeurs de F_{ST} ont indiquées une différenciation génétique entre certains apiculteurs. L'analyse de la structure génétique avec le logiciel Structure a montré une séparation des colonies réunionnaises en trois populations. La détection d'allèles diagnostiques dans cette étude et l'asymétrie entre l'identité mitochondriale et nucléaire chez plusieurs individus constituent une indication d'un possible métissage suite à des hybridations entre différentes sous-espèces.

Mots-clés: *Apis mellifera*, microsatellites, ADNmt, structure génétique, lignées évolutives

Abstract - The honeybee, *Apis mellifera* L. is from a long-time established in Reunion Island and was first described as the sub-species *Apis mellifera unicolor* by a morphological study. Nonetheless, introductions of three others European sub-species: *A. mellifera ligustica*, *carnica* and *mellifera* had been recorded by the past. Mitochondrial diversity and potential adaptations in insular conditions of imported sub-species had never been investigated. Genetic diversity and structure as well had never been explored in this island before. For the first time, evolutionary lineage and sub-species presence had been assessed by restriction analysis of a mitochondrial intergenic non-coding region. The study of nuclear genetic diversity in honeybee colonies in Reunion Island was performed by using 21 microsatellites. A total of 1881 colonies were collected from 110 locations on Reunion Island, from 104 apiaries of 51 beekeepers and 15 wild colonies were also sampled. Restriction pattern of the intergenic region allowed identifying two African, one west European and one south European haplotypes with different frequencies and distribution on the island. The haplotype A1 was found dominant with 95,17%, then C2 with 4,38% and the frequency of A4 et M8 were less than 1%. A1 showed the same *DraI* restriction pattern than observed for *Apis mellifera unicolor*. Those RFLP profiles were firmly identified by sequencing as *Apis mellifera carnica* (C2), *Apis mellifera scutellata* (A4) and *Apis mellifera iberiensis* (M8). Global genetic diversity was high with 12,81 (± 5,37) mean alleles/ locus but lower in each beekeepers groups of colonies. AMOVA's results suggested that this genetic diversity was not structured by mitochondrial groups or geographic distribution however F_{ST} values indicated genetic differentiation between some beekeepers. Genetic structure analysis by Structure software supports the clustering of the Reunionese honeybee in three different populations. In this study, diagnosis alleles were scored and molecular asymmetry between mitochondrial and microsatellites data in several individuals indicated possible crossbreeding by hybridization and introgression between different sub-species.

Key words: *Apis mellifera*, microsatellites, ADNmt, genetic structure, evolutionary lineage