



Service Public de Wallonie

Direction Générale Opérationnelle de l'Agriculture, des Ressources
Naturelles et de l'Environnement
Département du Développement, de la Ruralité et des Cours d'eau et du
Bien-être animal
Direction de la Recherche

Projet D31-1350

SELAPIS

Evaluation de la diversité génétique des abeilles domestiques (*Apis mellifera* L.) en Wallonie et sélection de souches résistantes à l'acarien *Varroa destructor*

Fiche synthétique du projet

Université de Liège – Gembloux Agro-Bio Tech
Unité d'Entomologie Fonctionnelle et Evolutive¹

Université de Liège – Gembloux Agro-Bio Tech
Ingénierie des productions animales - Génétique, génomique et modélisation numériques²

Promoteurs

F. Francis¹
N. Gengler²

Collaborateurs

G. Leclercq
G. Noël
J. Bebermans
J. Petit
T. Rafalowicz
V. Janssens

1. Contexte et Objectifs

Arrivé en Belgique en 1984, l'acarien *Varroa destructor* est une espèce invasive considérée comme une des menaces principales pour l'apiculture. La coévolution entre ce parasite et l'abeille domestique a jusqu'à présent été trop courte que pour aboutir à un équilibre entre ces deux espèces. Cet acarien possède des avantages évolutifs face auxquels l'abeille domestique semble actuellement démunie que ce soit par une action physique (ponction de l'hémolymphe) ou alors une action biologique (transmission de virus). Par conséquent, la plupart des colonies ne survivent pas sans traitement acaricide. Dès lors, depuis plus de 30 ans, de nombreuses équipes de recherche s'intéressent à de nombreux caractères qui expliqueraient le potentiel de certaines colonies (ou populations) d'*Apis mellifera* à gérer l'infestation par *V. destructor*. La sélection d'abeilles résistantes à *V. destructor* est une demande régulièrement formulée par le monde apicole. Bien que ce type de recherche ait déjà été entrepris, elles se basaient uniquement sur un travail de terrain axé sur des caractères phénotypiques (morphologiques ou comportementaux), sans prendre en considération un aspect fondamental de ce type de recherche, la génétique de l'abeille.

Dans le cadre de ce projet, vu le contexte de l'apiculture en Wallonie, l'objectif principal du projet de recherche ci-présent est tout d'abord (i) d'évaluer la diversité phénotypiques des abeilles mellifères wallonnes à partir de mesures pertinentes de traits fonctionnels de résistance face à l'acarien *V. destructor* mais également d'évaluer la diversité génétique des abeilles mellifères wallonnes sur base des mêmes échantillons. Par la suite, l'objectif suivant (ii) est de sélectionner des souches résistantes dans cette diversité d'abeilles mellifères wallonnes. Cependant, en fonction du temps et des moyens impartis, les objectifs initiaux du projet ont été adaptés et redirigés pendant le déroulement des différentes conventions de recherche.

En effet, de multiples traits fonctionnels peuvent contrer le développement des populations du parasite dans la colonie et donc mener à une certaine tolérance/résistance face au *Varroa*. Parmi ces traits, le comportement hygiénique de la colonie s'avère être particulièrement intéressant afin de développer un programme de sélection. Toutefois, les investigations scientifiques par rapport à l'efficacité de ce comportement restent des thématiques très controversées et il subsiste actuellement des problèmes méthodologiques par rapport aux bio-essais réalisés pour la quantification de ce comportement. De plus, avant l'importation de reines et de colonies d'abeilles mellifères étrangères, les populations d'abeilles belges étaient limitées à une seule sous-espèce native, l'abeille noire (*A. mellifera mellifera*). Par conséquent, la plupart des populations d'abeilles belges sont actuellement le fruit d'une hybridation entre les colonies importées et les populations natives. Et étudier cette diversité génétique de populations hybrides est particulièrement complexe. En effet, les reines sont fécondées par environ une vingtaine de mâles pouvant provenir de colonies/populations différentes d'hybrides ou de sous-espèces (donc porteurs de patrimoine génétique différent). Par conséquent, il a fallu développer de nouvelles approches d'analyses génétiques basées sur des échantillons regroupant plusieurs ouvrières diploïdes permettant d'évaluer au mieux l'hybridation théorique d'une colonie.

Dès lors, nous avons mis en place deux axes de recherche : (i) Résoudre les problèmes controversés et méthodologiques concernant la quantification du comportement hygiénique dans les colonies d'abeilles mellifères sur base de ruchers expérimentaux standardisés au niveau de la gestion apicole et (ii) la conception d'une nouvelle approche génomique afin de mieux comprendre la diversité des populations hybrides à partir d'une couverture représentative de la diversité des populations des abeilles mellifères wallonnes.

2. Méthodologie et Résultats

2.1. Phénotypage du comportement hygiénique des populations d'abeilles mellifères

Un travail de recherche bibliographique approfondi a été réalisé afin de définir les avantages et inconvénients de différentes techniques de quantification de l'efficacité du comportement hygiénique des abeilles mellifères par rapport à divers types de pathogènes. Le test du couvain congelé (figure 1) a souvent été utilisé en tant qu'approximation en vue de caractériser l'efficacité du comportement hygiénique des colonies d'abeilles mellifères. La question est de savoir si cette approximation est assez fiable afin d'estimer les bénéfices induits par l'élimination des cellules du couvain étant infectées par le parasite à partir de colonies non sélectionnées. Ainsi, nous avons investigué, sur 30 colonies standardisées d'abeilles mellifères (sélectionnées de manière aléatoire) réparties sur 3 sites différents ($n=10/\text{site}$; nos propres ruchers expérimentaux), la relation entre l'efficacité de l'élimination de cellules infestées et trois autres variables : (i) le pourcentage de pupes et d'ouvrières infestées par *V. destructor* ; (ii) le partage d'acariens parasites dans le couvain comparé aux individus parasites en phase phorétiques et (iii) le succès reproductif des acariens. Afin d'être une méthode fiable, l'efficacité de ce comportement doit être corrélé avec ces trois variables. Car le comportement hygiénique est naturellement exprimé et hautement variable à travers des populations n'étant pas sélectionnées, c'est la raison pour laquelle nous avons choisi d'utiliser ces stocks afin d'avoir l'expression la plus large possible de ce comportement. Nous avons trouvé qu'il n'y a pas de corrélation entre le caractère hygiénique et ces trois variables ce qui suggère que le test du couvain congelé est inadéquat en vue de mesurer le comportement hygiénique face au parasite dans des colonies n'ayant pas été sélectionnées.

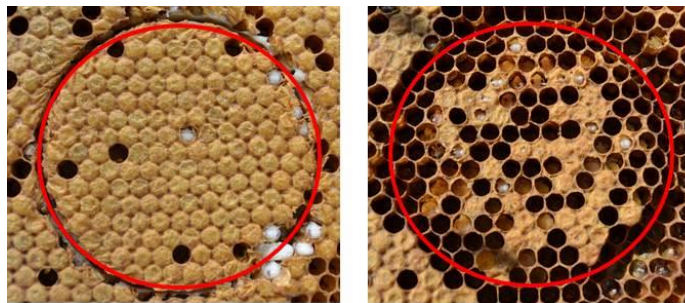


Figure 1 Photos prises juste après le test à l'azote liquide, ainsi que 24h après.

2.2. Diversité génétique des abeilles mellifères de Wallonie

Sur l'ensemble du projet de recherche, nous avons mis en place une banque d'échantillons de colonies par le biais d'un réseau apicole préétabli (avec plus de 300 échantillons provenant de toutes les provinces wallonnes) afin de caractériser la diversité génétique des abeilles mellifères de Wallonie. Afin de pouvoir évaluer au mieux l'hybridation des abeilles mellifères en Wallonie et de diminuer les coûts d'expérimentation, chaque échantillon comprend un regroupement de 30 ouvrières provenant de la même colonie. Les échantillons ($n_{\text{tot}} = 214$; $n_{\text{site}} = 94$), dont l'ADN a été extrait, ont été envoyés à l'Institut de Biotechnologie de l'Université de Cornell (USA) afin de génotyper nos échantillons via le séquençage *Genotyping-by-Sequencing* (GBS). Il a fallu développer de nouvelles méthodes d'analyse bio-informatique étant donné que les logiciels classiques sont adaptés à des échantillons comprenant des individus uniques. En collaboration avec le GIGA et son unité en bio-informatique, nous avons traité les données génomiques obtenues. Ainsi, au moyen d'analyses en statistiques génétiques fines basées sur les méthodes de structure de populations et d'ordinations en composante principale, nous avons réalisé la structure de nos colonies d'abeilles mellifères sur base de 3 729 SNPs après filtrage des données génomiques. Les échantillons des colonies d'abeilles mellifères wallonnes ont été structurés par rapport au résultat du séquençage (GBS) de colonies d'abeilles mellifères africaines (sauvages) de la sous-espèce *adansonii*. Cette analyse-ci ne se base donc pas sur une comparaison par rapport à une population de référence. En vue de caractériser au mieux nos interprétations des résultats, nous avons pris en

compte les données phénotypiques récoltées correspondant à la race/sous-espèce d'abeilles observées. Nous observons un gradient structurelle de populations partant de la sous-espèce native de Belgique *Apis mellifera mellifera* (branche évolutive M) vers des sous-espèces appartenant à la lignée *carnica* (branche évolutive C : *Apis mellifera carnica* et *Apis mellifera ligustica*). Au vu des résultats, nous supposons que les échantillons identifiés phénotypiquement en tant que race « Buckfast » résultent d'une hybridation plus ou moins forte entre la lignée M et C. Si nous reprenons les proportions génotypiques sous forme provinciale, nous observons que nos résultats concordent avec les résultats provenant du monitoring apicole, réalisée en 2009-2010 (voir dans les rapports finaux de convention). Par des méthodes d'interpolation spatiales et sur base des données génotypiques générées, nous avons également cartographié l'hybridation des colonies d'abeilles mellifères sur l'ensemble du territoire wallon (figure 2). En effet, sur base des mesures de géotypes connus lié aux ruchers géo-référencés, nous avons pu estimer les valeurs de géotype inconnus ce qui nous permet de mieux appréhender cette inversion de lignées M vers C selon un gradient d'Ouest en Est.

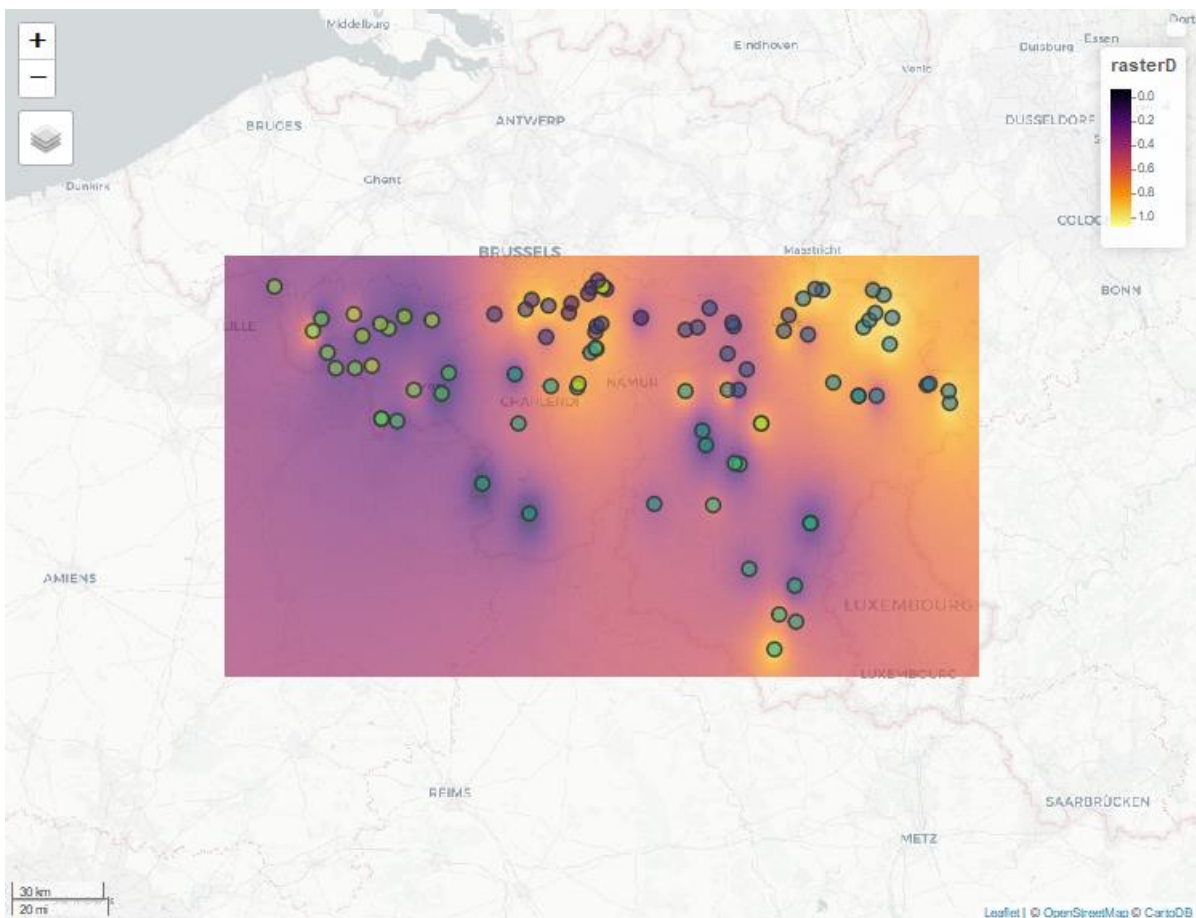


Figure 2 Carte de chaleur générée à partir des données génotypiques (n=94). Chaque point représente l'ensemble des ruchers échantillonnés en Région Wallonne. Les couleurs froides (nuances de mauve) représentent les populations d'abeilles mellifères issues de la branche évolutive M (*Apis mellifera mellifera*). Les couleurs chaudes (nuances de jaune) représentent les populations d'abeilles mellifères issues de la branche évolutive C (*Apis mellifera carnica* et *ligustica*).

3. Conclusions et perspectives

Le comportement hygiénique des ouvrières contribuent à l'immunité sociale de la colonie des colonies d'abeilles mellifères en limitant la transmission de divers parasites tels que le *V. destructor* et diverses maladies. Le test du couvain congelé peut être recommandé pour évaluer l'efficacité de ce comportement pour une évaluation générale de réponse par rapport à la pathosphère mais notre étude a montré qu'il était inadéquat dans le cas du *V. destructor*. Dans le cadre de cet axe de recherche, plusieurs perspectives peuvent être envisagées :

- **Investiguer** la relation entre les **colonies hygiéniques** et le **succès reproductif** du parasite. Dans le monde apicole, la relation entre ces traits demeure très controversée et assez inexplicée. Une meilleure compréhension de cette relation entre les colonies hygiéniques et le succès reproductif du *V. destructor* pourrait aider à résoudre la confusion à propos de colonies hygiéniques et ainsi prodiguer des recommandations pour les programmes de sélection à partir desquelles les colonies candidates pourraient être sélectionnées en fonction du résultat désiré.
- **Concevoir** une nouvelle méthode de quantification de l'efficacité du **comportement hygiénique** par rapport au *V. destructor*. La plupart des méthodes actuelles afin de mesurer ce caractère sont laborieuses et chronophage surtout si un grand nombre de colonies est envisagé. De plus, les résultats de ces bio-essais peuvent être biaisés par l'action des virus transmis par le parasite. En effet, de nombreuses études ont suggéré qu'il existait une dépendance du comportement hygiénique via l'action de phéromones du couvain (BEP) par rapport à la spécificité et la charge virale contenue dans la puppe infectée. Si cette hypothèse est prouvée, l'injection de ce type de phéromone au lieu de parasite pourrait devenir une excellente alternative.

Dans le second axe de recherche, nous avons montré que les populations d'abeilles mellifères wallonnes sont fortement hybridées suivant un gradient Ouest-Est entre les différentes lignées évolutives et particulièrement entre les populations natives *A. mellifera mellifera* avec celles de la lignée C. Les sous-espèces appartenant à la branche C telles qu'*A. m. ligustica* et *A. m. carnica* ont souvent été préférées pour leurs traits apicoles plus désirables (tenue au cadre, douceur ...) mais également pour leur précocité de développement au printemps ce qui les rend désirables d'un point de vue agricole pour toutes les cultures entomophiles précoces (colza, vergers...). Plusieurs auteurs ont supposé que la domestication et la gestion humaines ont mené à décroître la diversité génétique pour les populations d'abeilles mellifères. Cependant, des preuves récentes montrent que l'opposé est également vrai : la diversité génétique est plus haute dans les colonies gérées par l'homme, à cause de l'hybridation génétique, comparé à leurs populations parentes (sous-espèces). Evidemment, cela ne signifie pas que toutes les populations d'abeilles doivent être hybridées afin d'accroître leur diversité génétique. Les sous-espèces natives doivent être considérées en tant que populations clés de la diversité génétique de l'abeille mellifère, et doivent être protégées (contre l'hybridation) en tant que réservoirs précieux d'adaptations phénotypiques locales.

De plus, nous espérons que l'approche « cost-effective » sélectionnée (GBS) et la production des résultats pourra bénéficier aux preneurs de décisions afin de (re)construire une politique de conservation basée sur des preuves scientifiques pour lesquels les sous-espèces locales bénéficient d'une protection. Etant donné que les abeilles mellifères se reproduisent en vol, ces résultats pourraient également informer la communauté apicole concernant les sites les plus appropriés de zones d'accouplement, dépendant des hybrides et des sous-espèces de cette zone. Par principe de précaution, concernant les inconnues subsistantes de la structure des populations du parasite *V. destructor* en Wallonie, nous recommandons aux apiculteurs d'éviter les importations étrangères de colonies d'abeilles mellifères, sources de nouveaux pathogènes (virus, parasites, bactéries ...). Nous recommandons également de choisir des populations d'abeilles adaptées localement ainsi que de continuer à investir dans la recherche et la sélection de colonies d'abeilles résilientes.

Pour finir, plusieurs nouvelles voies de recherche ont émergé à la suite de ce second axe de recherche :

- **Distinguer** la contribution de chacune des sous-espèces d'une même lignée évolutive en affinant nos **analyses bioinformatiques** ce qui nous permettrait de pouvoir générer plus de données génomiques susceptibles de pouvoir ségréger l'ensemble des sous-espèces ciblées.
- **Investiguer** les avantages évolutifs dans les **populations hybridées** : une nouvelle combinaison allélique favoriserait la résilience des colonies au niveau local par rapport aux populations natives (non hybridées).