



HAL
open science

CIReine - Conception d'Indicateurs de qualité des Reines d'abeilles

Benjamin Basso, Pierrick Aupinel, M. Béguin, J.F Bompas, A. Decourtye, Stéphane Grateau, Alain Vignal, Gaetan Nozet, C. Rüger, E. Ricard

► **To cite this version:**

Benjamin Basso, Pierrick Aupinel, M. Béguin, J.F Bompas, A. Decourtye, et al.. CIReine - Conception d'Indicateurs de qualité des Reines d'abeilles. *Innovations Agronomiques*, 2020, 79, pp.31-48. 10.15454/7wg7-km04 . hal-02972747

HAL Id: hal-02972747

<https://hal.inrae.fr/hal-02972747>

Submitted on 20 Oct 2020

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

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



Distributed under a Creative Commons Attribution - NoDerivatives 4.0 International License

CIReine : Conception d'Indicateurs de qualité des Reines d'abeilles

**Basso B.¹⁻⁴, Aupinel P.³, Béguin M.¹⁻⁴, Bompa J.F.², Decourtye A.¹⁻⁴, Grateau S.³, Vignal A.²,
Nozet G.², Rüger C.¹⁻⁴, Ricard E.²**

¹ ITSAP, Site Agroparc, Domaine St Paul, 228 Route de l'aérodrome, CS40509, F-84914 Avignon Cedex 9

² INRAE, UMR1388 Génétique, Physiologie et Systèmes d'Élevage, F-31326 Castanet-Tolosan

³ INRAE, UE1255 APIS Abeilles, Paysages, Interactions et Systèmes de culture, INRAE Le Magneraud, BP 52, F-17700 Surgères

⁴ UMT PRADE, Unité Mixte Technologique de la Protection de l'Abeille Dans l'Environnement, Site Agroparc, Domaine St Paul, 228, Route de l'aérodrome CS40509, F-84914 Avignon Cedex 9

Correspondance: benjamin.basso@inrae.fr

Résumé

Les objectifs de ce projet étaient de développer des indicateurs précoces et non invasifs de qualité des reines d'abeilles. En parallèle, il a donc procédé (1) au développement d'un outil d'enregistrement de l'activité des reines dans la ruche ainsi qu'au (2) test de la pertinence de différents indicateurs simples (poids, dynamique de colonies) en lien avec les performances des colonies. Il a par ailleurs contribué (3) à la mise au point de jeux de marqueurs génomiques permettant de s'assurer de la qualité des accouplements des reines avec les faux bourdons.

Ce travail a démarré par l'évaluation des colles utilisées pour le marquage des reines d'abeilles par les apiculteurs. Les résultats de cette étude permettent d'orienter les apiculteurs vers des produits moins nocifs pour les abeilles. Puis différentes expérimentations, étape par étape, ont permis de développer un système d'enregistrement automatique de la position d'une reine dans sa colonie grâce à une technologie RFID. Ce système totalement innovant a donné lieu à la création de six dispositifs qui sont ainsi à disposition des chercheurs apidologues pour leurs recherches futures sur le comportement des abeilles. Les expérimentations qui ont permis de finaliser le dispositif apportent d'ores et déjà quelques connaissances utiles, l'absence de différences entre activité diurne et nocturne par exemple. Il s'avère en revanche que l'activité d'une reine au sein de sa colonie est assez peu liée à la dynamique de celle-ci.

Le suivi de près de 300 reines sur l'ensemble du projet a permis d'étudier puis diffuser les connaissances sur l'impact de la dynamique d'une colonie, liée à la ponte de la reine, sur toutes les performances d'intérêt apicole. Le lien entre la dynamique des colonies et la dynamique des infestations de varroas a ainsi pu être étudié finement et soulever l'importance de suivre les infestations sur des colonies très peuplées en saison qui, si elles apparaissent idéales pour produire du miel, sont aussi sujetes à des infestations de varroas très fortes. Malheureusement, des critères simples et facilement accessibles pour les apiculteurs, comme le poids des reines, demeurent trop peu fiables pour prédire la qualité des reines.

La recherche de marqueurs génétiques, permettant de connaître l'origine des mâles ayant fécondés les reines, devrait bientôt aboutir à un produit disponible pour les apiculteurs. Il permettra ainsi aux éleveurs et aux conservatoires de s'assurer de la qualité de leurs zones de fécondation.

Mots-clés : Reine d'abeille, indicateurs de qualité, activité, durée de vie, RFID

Abstract: Looking for early life quality indicators of honey bee queens (CIReine - Finding Queens Quality Indicators)

The objectives of this project were to develop early and non-invasive indicators for queen's quality. In the same time, it proceeded (1) to the development of an electronic device to record the activity of queens inside the hive and to (2) test the relevance of different simple indicators (weight, colony dynamics) in connection with the performance of the colonies. It also contributed (3) to the development of sets of genomic markers to ensure the quality of queen mating with drones.

This work began with the evaluation of the glues used for marking bee queens by beekeepers. The results of this study guide beekeepers towards less harmful glues for their bees. Then various experiments, gradually, allowed developing a system to automatic record the position of a queen inside her colony thanks to a RFID technology. This very innovative system has resulted in the creation of six devices that are thus available to apidologist researchers for their future research on the behavior of bees. Experiments that have made it possible to finalize the device already bring some useful knowledge, the absence of differences between daytime and nocturnal activity for example. It turns out, however, that the activity of a queen within her colony is relatively little related to the dynamics of it.

The follow-up of nearly 300 queens throughout the project made it possible to study and disseminate knowledge on the impact of the dynamics of a colony, linked to the queen spawning, on all beekeeping performances. The link between colony dynamics and dynamics of Varroa infestations has been studied in detail and raised the importance of monitoring infestations on highly populated colonies in season, which, if they appear ideal for producing honey, are also subject to very strong varroas infestations. Unfortunately, simple and easily accessible criteria for beekeepers, such as the weight of queens, remained too unreliable to predict the quality of queens.

The search for genetic markers to know the origin of the males which fertilized the queens should soon lead to a product available to beekeepers. It will allow breeders and conservatories to ensure the quality of their fertilization areas.

Keywords: Honeybee queens, quality indicators, activities, lifetime, RFID

Introduction

Contexte

Depuis plusieurs années, les apiculteurs font face à des pertes importantes de colonies d'abeilles domestiques (en hiver comme en saison). Ces difficultés représentent une menace sur la filière et sur le maintien d'un service de pollinisation. Le taux de pertes hivernales a été estimé entre 17% et 30% selon les années, de 2008 à 2012 (Basso, 2013 ; Holzmann et al., 2012). Au niveau de la production de miel, les dernières estimations de la production française montrent une nette diminution en dix ans (Audit GEM – Viniflor, 2005 ; Audit Protéis+ – FranceAgriMer, 2012). La production globale française était estimée ainsi à 25 500 tonnes en 2004 contre seulement 18 300 en 2010 et elle oscille entre 10 000 et 16 000 tonnes depuis 2014.

La qualité des reines et leur durée de vie sont deux des paramètres mis en avant par les enquêtes dans les causes des pertes de cheptel observées. Toutefois, il existe peu de références pour objectiver cette qualité des reines. Le meilleur indicateur pour une reine demeure la performance globale de la colonie : survie, sanitaire, production, comportement (douceur, tenue au cadre, essaimage). Mais obtenir de telles informations est coûteux, particulièrement en temps de travail, et nécessite un suivi précis de l'environnement pour séparer, sur les performances observées, l'influence de la reine et l'influence de l'environnement au sens large (pratiques apicoles, ressources mellifères, météo...). L'obtention de

l'information exhaustive sur la qualité d'une reine est donc nécessairement très tardive. La mise au point d'indicateurs précoces est indispensable pour :

- La gestion de cheptel : réforme anticipée d'une reine de qualité insuffisante,
- Le testage en vue de sélection : identifier les meilleures reines dans un schéma de sélection.

Les connaissances sur les indicateurs permettant d'estimer la qualité des reines sont très partielles et souvent anciennes. De nombreuses publications mettent en avant des critères morphologiques de la reine comme le nombre d'ovarioles ou le remplissage de la spermathèque (Bienkowska et al., 2011 ; Jackson et al., 2011) comme indicateurs potentiels de qualité d'une reine. Cependant, ceux-ci sont destructifs car ils nécessitent une dissection et donc un sacrifice de la reine. Le poids des reines apparaît aussi régulièrement comme un critère de qualité pour les reines d'abeilles (De Souza et al., 2013 ; Kahya et al., 2008). Les recherches menées sur ce critère sont toutefois contradictoires. Certaines études concluant sur une absence de lien entre poids et performances observées (Anderson, 2004 ; Boyer, 2012). La diversité génétique intra-colonie, et plus généralement la qualité de la fécondation, est également un indicateur avancé pour expliquer la qualité de cette reine.

La mesure de la dynamique de population d'une colonie a clairement été identifiée comme un des facteurs explicatifs de la performance de production de celle-ci sur une miellée (Kretzschmar, 2013). Mais l'outil utilisé à chaque estimation de population dans cette expérience (ColEval) n'a pas été utilisé pour un suivi populationnel de plus long terme. La pertinence d'une mesure de dynamique sur une longue période comme critère de qualité d'une reine reste donc à démontrer. De plus, de telles mesures sont extrêmement chronophages et demandent des formations pour les expérimentateurs. Des mesures simplifiées de dynamique, comme la taille de population à un seul instant de la saison, demeurent informatives mais sont nettement moins corrélées avec les performances des colonies suivies (Collins et al., 1984). Au-delà d'une utilisation pour la gestion de cheptel via une meilleure connaissance de performances, les indicateurs liés à la dynamique de population sont sélectionnables efficacement. Bienefeld et Prichner (1990) ont ainsi trouvé une héritabilité de 0,46 pour la dynamique de printemps évaluée par 2 mesures de population.

Les dispositifs de compteurs automatiques d'abeilles, qu'ils fonctionnent avec des rayons infrarouges ou par la détection de métaux ou de couleurs, n'offrent que peu de possibilités d'individualiser les abeilles et leur lecture est affectée par la propolisation ou l'encrassage. Pour combler cette lacune, le choix de l'équipe ACTA-INRAE, qui a développé l'application sur abeilles ouvrières, s'est porté sur la technologie de RFID (Radio-Frequency Identification Device). L'usage d'étiquettes RFID, permettant l'identification automatisée des abeilles en un lieu et en un temps donné, est une solution palliative des difficultés observées. Cette technologie, qui est en perpétuelle évolution, avec des étiquettes de plus en plus miniaturisées et de moins en moins coûteuses, propose un marquage au nombre de codes quasiment infini et une lecture qui se fait à travers des barrières physiques (propolis, bois, plastique, poussière). En dehors du suivi automatique des abeilles, la technologie RFID est largement utilisée dans les espèces animales de rente pour automatiser de nombreux contrôles de performances (alimentation, vêlage, déplacements, tri de lots etc..).

Objectifs généraux du projet

Les objectifs de ce projet étaient de développer des indicateurs précoces et non invasifs de qualité des reines. En parallèle, il a donc procédé (1) au développement d'un outil d'enregistrement de l'activité des reines dans la ruche ainsi qu'au (2) test de la pertinence de différents indicateurs simples (poids, dynamique de colonies) en lien avec les performances des colonies. Il a par ailleurs contribué (3) à la mise au point de jeux de marqueurs génomiques permettant de s'assurer de la qualité des accouplements des reines avec les faux bourdons.

Les partenaires de ce projet étaient l'ITSAP-Institut de l'abeille, l'unité GenPhyse de l'INRAE de Toulouse et l'unité APIS de l'INRAE du Magneraud.

1. Mettre au point un système de suivi automatique de l'activité d'une reine au sein de sa colonie

1.1 Etude des colles de marquage

Cette étude a permis de choisir au mieux la colle utilisée dans le cadre de CIReine pour poser des puces électroniques sur les reines mais il s'avère qu'elle est également d'un grand intérêt pour conseiller les apiculteurs dans leurs choix pour le marquage de leurs reines avec des pastilles.

1.1.1 Test de toxicité des colles sur ouvrières

Un test de toxicité des colles a été réalisé sur les ouvrières afin de sélectionner les plus pertinentes à tester ensuite sur les reines, dont le nombre d'individus disponibles est plus limité. Six colles ont été testées et comparées à un témoin « eau ». Elles ont été choisies car elles ont toutes été utilisées pour les marquages d'abeilles soit par les apiculteurs soit dans d'autres expérimentations scientifiques.

Les modalités testées dans la première expérience ont été les suivantes :

- Témoin sans colle (manipulation avec goutte d'eau)
- Colle apicole classique Icko® ou Bijenhof® (Belgique) : composition non connue
- Ostobond® : colle cutanée à base de latex liquide, de n-hexane et d'oxyde de zinc
- Temposil® : ciment dentaire à base d'oxyde de zinc et d'A-silicone
- Super glue gel® : colle à base de cyanoacrylate
- Colle polonaise apicole (ou colle à paillettes) : composition non connue
- Colle Sader® : à base d'époxyde (couramment appelée colle époxy)

Trois séries de marquage d'ouvrières ont eu lieu au total. Pour chaque modalité testée, 30 ouvrières émergentes sont marquées (colle + pastille) et réparties dans des cagettes. Trois répétitions ont été réalisées. Les abeilles du témoin ont reçu une goutte d'eau qui simule l'application de la colle. Les abeilles marquées ont été maintenues dans des cagettes en plexiglass spécialisées pour les tests sur abeilles et suivies selon les protocoles classiques. La mortalité des abeilles a ensuite été relevée quotidiennement dans chaque cagette sur une durée de 20 jours. L'analyse des différentes répétitions a permis d'estimer une probabilité de survie en fonction du temps pour chacune des modalités (Figure 1).

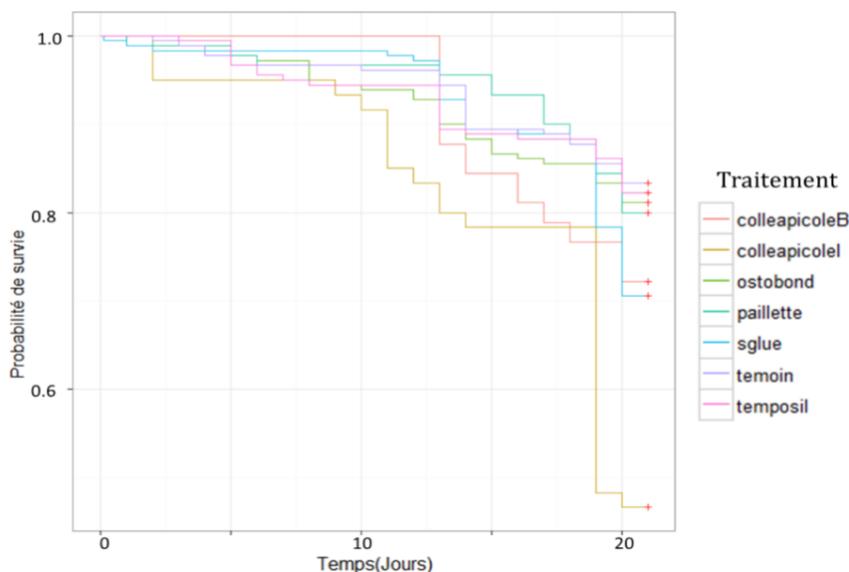


Figure 1 : Courbes de survie des abeilles ouvrières calculées par l'estimateur de Kaplan-Meier en fonction de la colle de marquage utilisée

L'analyse des données avec le modèle de Cox donne les résultats suivants :

- Il existe un effet négatif très significatif des colles apicoles Icko® et de la colle Super Glue® sur la survie des abeilles.
- Un faible effet de la colle apicole Bijenhof® sur la survie est aussi constaté (p-value = 0,0339).

Ces résultats indiquent donc que les deux colles qui se sont révélées les plus toxiques pour les abeilles font aussi partie de celles les plus fréquemment utilisées par les apiculteurs en France. Ceci mérite bien entendu d'être confirmé mais soulève cependant l'intérêt de réaliser des études complémentaires sur ce sujet.

1.1.2 Test de toxicité des colles sur reines

Pour ce volet, la colle polonaise apicole dite « paillette » a été éliminée car elle est trop difficile à diluer de façon précise et reproductible, elle sèche mal et est peu pratique d'utilisation. La colle Sader® époxy n'a pas été testée pour des raisons de modification tardive du protocole. Dans cette expérience, des puces RFID ont été collées sur le thorax des reines. Les modalités testées sont les suivantes :

- Témoin sans colle (manipulation avec goutte d'eau)
- Colle apicole classique Bijenhof® (Belgique)
- Osto-bond®
- Temposil®
- Super glue gel®

Deux lots de 30 reines ont été marqués à 10 jours d'intervalle. Les reines ont été marquées après l'insémination artificielle réalisée entre 7 et 9 jours après leur naissance et mises en cagette avec 100 ouvrières naissantes. Elles ont ensuite été suivies pendant une période de 60 jours après insémination.

Le nombre de reines mortes au cours de l'expérience n'est pas significativement différent en fonction de la colle utilisée (p-value > 0,05 - test du Khi²). Ainsi, ce n'est pas la toxicité de la colle sur la reine qui a permis d'orienter le choix de la méthode de marquage. L'analyse de la mortalité sur les ouvrières accompagnatrices ne met pas non plus en évidence d'effet significatif sur leurs chances de survie (p-value < 0,05). Cependant, la colle a un impact sur la tenue du tag : le nombre de tags qui se décrochent du thorax des reines est significativement plus élevé avec la colle apicole Bijenhof® qu'avec la colle Temposil®.

1.1.3 Aspects pratiques

Afin d'aborder la facilité d'utilisation, les temps de marquage de chaque série ont été enregistrés. La durée de marquage a donc pu être estimée pour chaque modalité. Une interprétation plus subjective de la facilité d'utilisation a également été faite avec les différentes personnes qui ont participé à ces tests. La Figure 2 résume ainsi les caractéristiques des colles testées.

	Toxicité potentielle	Séchage	Quantité de colle déposée	Consistance	Mode d'application	Autres remarques	Illustration
Super Glue Gel®	Oui **	Rapide	Précise	Gel liquide	Direct	Abeilles collées à la cage à piston - Agressivité des abeilles marquées	
Ostobond®	?	Rapide	Précise	Visqueuse	Direct	Tendance à faire des fils	
Temposil®	?	Très rapide	Précise	Très épaisse-pâteuse	Conservation au froid - Deux composants en mélange	Changer régulièrement l'embout	
Colle apicole Icko®	Oui ***	Très lent	Peu précise	Très liquide	Direct	Agressivité des abeilles marquées	
Colle apicole Bijenhof®	Oui *	Très lent	Peu précise	Très liquide	Direct	Agressivité des abeilles marquées	
Colle polonaise apicole -paillette	?	Très lent	Peu précise	Liquide	Paillettes à solubiliser dans de l'alcool	Texture toujours différente - Dilution des paillettes difficile	
Colle Sader® époxy	?	Très rapide	Précise	Épaisse	Deux composants en mélange	Mélange à refaire très régulièrement	

Figure 2 : Fiche synthétique des colles analysées

1.2 Suivi de la reine dans une ruche

La mise au point du prototype de suivi de la reine au sein de sa ruche s'est décomposé en plusieurs étapes, parfois simultanées :

- Choix de la technologie pour le suivi de la reine :

C'est la technologie 134,2 kHz que nous avons retenue pour le projet CIReine (Figure 3). Elle est aussi utilisée pour l'identification des animaux et répond aux normes ISO 11784 et 11785.



Figure 3 : Photo d'une reine équipée d'une puce de marquage.

- Design des antennes :

Après plusieurs tests et pour limiter les problèmes d'intégration dans la ruche, nous avons validé qu'une précision au quart de cadre est suffisante et donc que le nombre d'antennes par cadre est de quatre.

L'objectif est d'obtenir pour une antenne, une détection d'un tag RFID jusqu'à 3 cm de distance et orientée de façon aléatoire.

- Choix d'un lecteur RFID :

Le lecteur NEDAP avait l'avantage de fournir des informations et réglages supplémentaires qui nous intéressent : indication de la puissance du signal du tag, et réglage de la puissance émise par le lecteur.

- Multiplexage des antennes :

Le lecteur RFID, ne devant être connecté qu'avec une seule antenne à la fois, nous avons cherché une solution pour utiliser un seul lecteur pour 40 antennes (quatre par cadre, pour dix cadres).

- Tuning des antennes :

L'utilisation d'antenne implique que celle-ci soit accordée avec le lecteur et demande donc l'ajout de composants électroniques pour adapter l'antenne au lecteur.

- Collage de la cire sur la plaque électronique :

Les plaques électroniques doivent être intégrées dans les cadres de la ruche et il est nécessaire de les recouvrir d'une feuille de cire préformée d'alvéoles pour ne pas perturber les abeilles. Différentes techniques ont été essayées et celle de l'utilisation de la cire fondue en tant que colle a été retenue.

- Prototype de suivi de la reine :

Nous avons choisi de fabriquer une ruche transparente afin de mieux observer le comportement de la reine. Nous avons inséré 4 cadres équipés des 16 antennes au total. Nous avons validé l'enregistrement du déplacement d'un insecte sur les cadres en laboratoire puis nous avons installé la ruche à l'intérieur d'un bâtiment avec un passage dans le mur pour les abeilles, nous avons équipé la reine avec une puce et commencé les enregistrements pendant 6 mois. Les résultats obtenus permettent de dire qu'il est possible d'enregistrer le déplacement de la reine à l'intérieur d'une ruche en utilisant une puce RFID.

- Interprétation des données du prototype :

Le prototype d'une ruchette 4 cadres a été calibré et testé en conditions semi-contrôlées. Il a permis d'extraire des indicateurs de l'activité de la reine au sein de la colonie : temps passé par la reine sur chaque compartiment (quart d'inter-cadre), nombre de visites de chaque compartiment, nombre de compartiments visités par la reine, etc., à différentes échelles de temps (heure, journée...).

1.3 Enregistrement du vol nuptial de la reine

La période de fécondation des reines dure seulement quelques jours au démarrage de leur vie, qui peut atteindre plusieurs années. Malgré cette différence très forte de temps, cette période est cruciale pour la qualité de la reine car c'est lors de ces vols nuptiaux qu'elle remplit sa spermathèque avec la semence qui servira à féconder tous les œufs d'ouvrières qu'elle pondra durant sa vie (jusqu'à 2 000 œufs / jours pendant plusieurs années).

Nous avons comparé deux technologies différentes pour enregistrer la sortie de la reine de la ruche et son retour après avoir effectué le vol nuptial (Figure 4) :

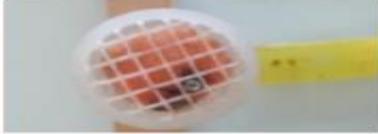
	Dispositif RFID	Dispositif à induction
Description générale du dispositif électronique	Reconnaissance entre la puce de Type : 13.56 Mhz et les lecteurs RFID grâce aux ondes radios. Chaque puce possède un code unique. Dispositif vendu prêt à l'emploi par TagTracing	Reconnaissance entre la pastille métallique et la bobine par induction. Dispositif créé par INRA Avignon, Didier Crauser et adapté par l'INRA de Toulouse, Laboratoire Genphyse
Variables mesurées	Instant de détection par lecteur Heure de détection (hh :mm :ss) Avec individualisation Enregistrement lors de la détection de la puce	Instant de détection par lecteur Heure de détection (hh :mm :ss) Sans individualisation Enregistrement lors de la détection de la pastille
Illustration du tag		
Poids et dimension du tag	Poids : 3 mg Dimension : 2mm x 1.6 mm Epaisseur : 0.4 mm	Poids : 3 mg Diamètre : 2 mm Epaisseur : 4µm
Descriptif mécanique	Longueur totale planche d'envol : 25 cm Espace entre les lecteurs : 7 cm Largeur couloir intérieur : 1 cm Hauteur couloir intérieur : 1 cm Couloir en bois Annexes 1: plans	Longueur totale planche d'envol : 25 cm Espace entre les lecteurs : 7 cm Largeur couloir intérieur : 1 cm Hauteur couloir intérieur : 1 cm Couloir en polystyrène Annexes 2 : plan
Source d'alimentation	Par batterie (12V)	Par batterie (12V)
Descriptif installation	Liaison entre batterie au boîtier de stockage Liaison du boîtier de stockage aux lecteurs et à l'ordinateur Liaison lecteurs aux ruches	Liaison entre batterie et boîtier de stockage Liaison du boîtier de stockage aux lecteurs Liaison lecteurs aux ruches
Éléments complémentaires à l'installation	Connecteurs des lecteurs Boîtier de stockage des données Malette isolante	Boîtier de stockage des données Polystyrène isolant les lecteurs Ruche isolant le boîtier de stockage
Récupération des données	Par le logiciel « RucheContrôle »	Par clé USB (positionné sur le boîtier de stockage)
Illustration de l'installation sur les ruches		

Figure 4 : Comparaison des deux systèmes d'enregistrement des entrées-sorties des reines.

2. Estimer les relations entre des indicateurs potentiels de qualité d'une reine et les performances de sa colonie

2.1 Performances des reines

Plus de 200 reines ont été suivies et leurs performances ont été mesurées pour un certain nombre de paramètres d'importance apicole avec une centaine de colonies chaque année (Figure 7 pour 2016).

2.1.1 Mortalité des reines en testage au cours du temps

Le suivi des colonies dans le cadre d'une station de contrôle de performances est suffisamment précis et régulier pour permettre de connaître, avec un intervalle d'une ou deux semaines, la date de la mort de celles-ci ainsi que la cause. La Figure 5 présente le suivi de la perte sur le 2^{ème} lot de reines en fonction du temps, depuis leur introduction en juillet 2016.

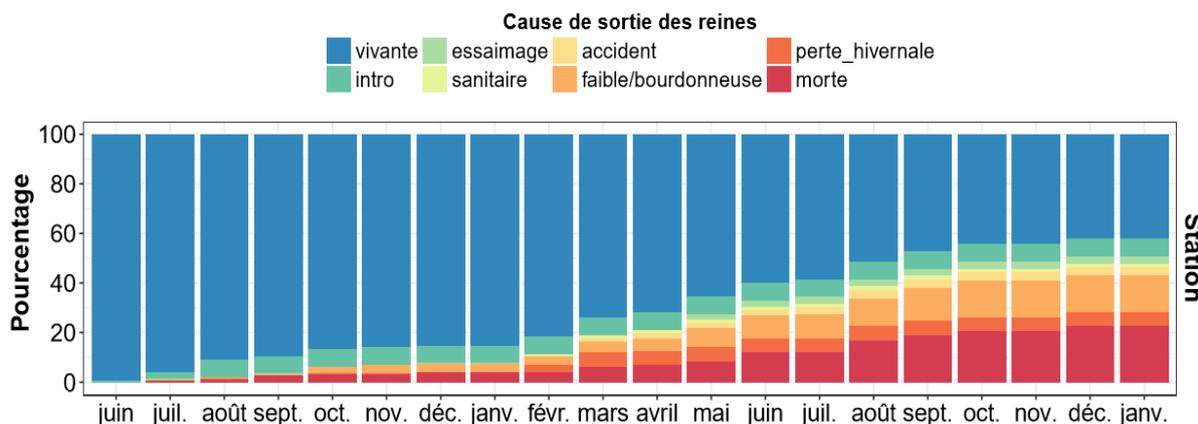


Figure 5 : Répartition des pertes de reines en 2016 selon la cause et la période

2.1.2 Résultats de production

L'ensemble des colonies suivies a été évalué sur la production de miel. En pratique, la principale miellée recherchée est celle de Lavandes en juillet. Toutes les colonies sont alors réparties sur 3 ruchers éloignés de moins de 5 km les uns des autres. Les données représentées sur la Figure 6 ne prennent en compte que les colonies avec la reine d'origine, soit 75 pour le lot de 2015.

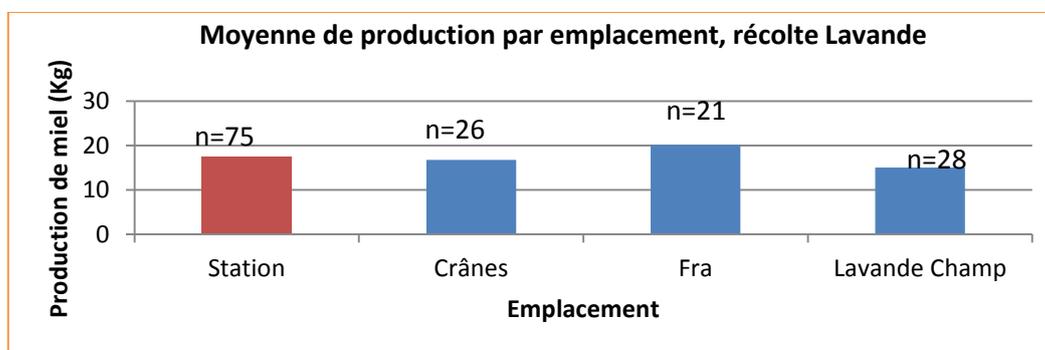


Figure 6 : Miel récolté par ruche en 2015

2.1.3 Résultats de comportement des reines suivies

Les protocoles décrits dans le BeeBook et adaptés dans le manuel de procédures de l'ITSAP-Institut de l'abeille ont été utilisés pour évaluer les caractères comportementaux sur l'ensemble des colonies suivies. Essaimage, douceur, tenue au cadre et comportement hygiénique ont ainsi été renseignés pour l'ensemble des reines suivies.

2.1.4 Suivi d'infestation varroa

Le niveau d'infestation des colonies par l'acarien varroa destructor a été estimé via le comptage de la mortalité naturelle au printemps (comptage des chutes de varroas sous la colonie avec un lange) puis via des estimations des varroas phorétiques à partir du mois de juin (comptage du nombre de varroas sur au moins 30g d'abeilles).

Différents taux peuvent être calculés en fonction des intervalles de temps pour l'observation de ce caractère. L'intérêt est alors d'identifier des colonies qui ont un taux de croissance faible puisque cela signifie qu'elles ont un mécanisme biologique leur permettant de résister à la croissance de ce parasite.

Par ailleurs, en 2015, un comptage des varroas morts après le traitement d'automne, puis après le traitement de contrôle, a été réalisé. Ces comptages correspondent à la variable « varroas totaux » car, en faisant l'hypothèse que les traitements sont totalement efficaces, l'intégralité des varroas présents dans la colonie a dû tomber sur le lange de comptage au cours des 10 semaines de mesure.

	Station
Reines introduites	142
Reines en fin de saison	64 (45.1 %)
Tenue au cadre	2.9 (\pm 0.5)
Douceur	2.8 (\pm 0.6)
Note d'essaimage	2.1 (\pm 1.1)
Moyenne journalière de chute naturelle de varroas	0.25 (\pm 1.28)
Varroas phorétiques pour 10g d'abeilles en été	1.7 (\pm 2.1)
Pourcentage de nettoyage	21.5 (\pm 17.7)
Pourcentage de nettoyage en cours	68.2 (\pm 26.2)
Récolte moyenne par colonie	21.6 (\pm 13.1)

Figure 7 : Synthèse des résultats du testage en 2016

2.2 Dynamique de colonie

La méthode ColEval a été utilisée à 9 reprises sur chaque colonie lors du projet CIReine pour estimer la dynamique de la colonie. Cette méthode est basée sur l'observation de chaque face des cadres de la ruche (Kretzschmar, 2013). Sur chaque face, cinq composantes de la colonie d'abeilles sont estimées en fonction de l'occupation du cadre : pourcentage d'occupation des abeilles, du couvain operculé, du couvain ouvert, des réserves de miel et de pollen.

Les graphiques ColEval sont présentés avec deux ordonnées (Figure 8) : nombre de cellules ou nombre d'abeilles en fonction du temps et de ce que l'on considère. La méthode ColEval donne un pourcentage de la surface occupée, par face de cadre, du couvain ouvert et fermé, des réserves, du pollen, du couvain de mâles et des abeilles. Ces pourcentages ont ensuite été convertis en nombre d'abeilles ou de cellules.

Il est intéressant de noter que sur les 2 années de suivi, les colonies ont une dynamique similaire avec les courbes de couvain ouvert, couvain fermé et abeilles qui ont la même évolution avec un pic entre mai et juin. De même, l'augmentation des réserves devient exponentielle en juin pour atteindre son pic début août. La diminution visible au début d'automne en 2016 était moins présente en 2015 car d'avantages de ressources étaient disponibles à cette période cette année-là.

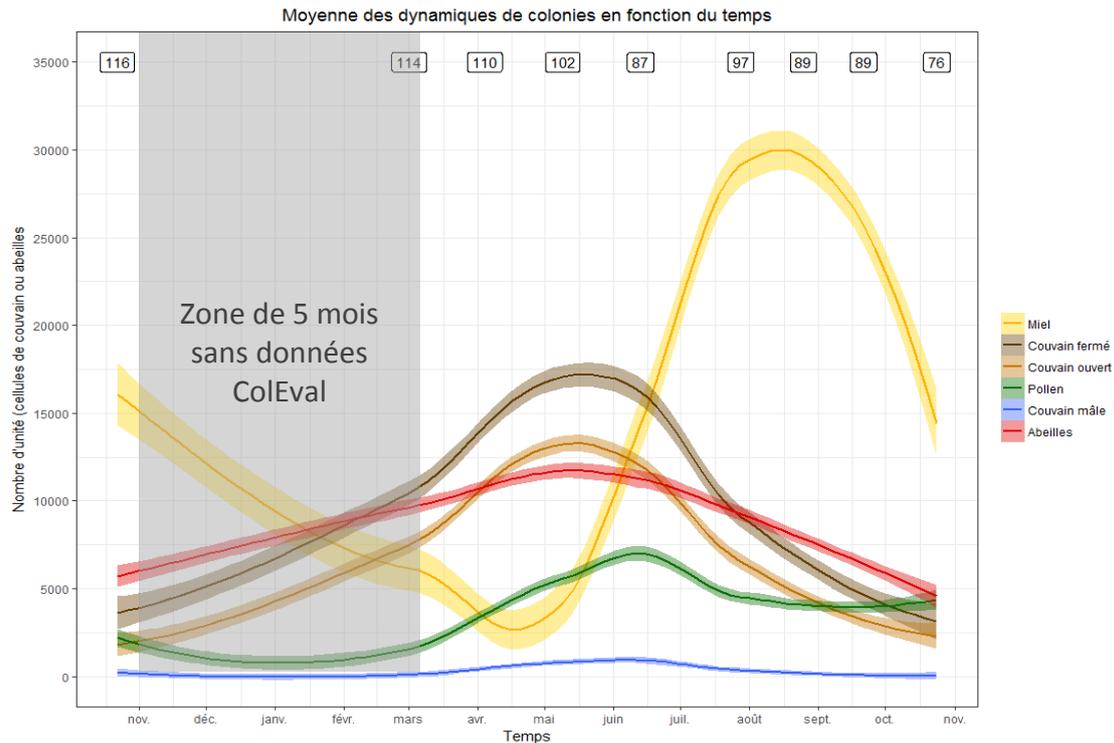


Figure 8 : Dynamique de colonies sur toute la station en fonction du temps en 2016

En 2016, on voit que les réserves diminuent lentement tout au long de la période hivernale, ce qui peut être interprété par la consommation hivernale des abeilles. Ces réserves sont ensuite multipliées par 12 durant la période de mi-avril à août (de 2500 cellules environ à 30 000, soit 4 cadres de miel).

2.3 Lien entre la dynamique des colonies, production et infestation varroa

Production de miel et infestation varroa sont les deux priorités des sélectionneurs d'abeilles. Une analyse spécifique a permis de préciser le lien entre la dynamique des colonies et ces paramètres. Des « niveaux » d'infestation ont été faits arbitrairement à partir du nombre de varroas totaux des ruches. Quatre niveaux ont ainsi été constitués : les ruches ayant eu un nombre de varroas totaux compris entre 0 et 2000, entre 2000 et 3500, entre 3500 et 10 000 et enfin entre 10 000 et 18 000 (Figure 9). La dynamique des colonies et la moyenne de production pour chacun de ces niveaux ont ensuite été calculées.

Les niveaux ayant été faits arbitrairement, il convient d'être vigilant dans l'interprétation de la Figure 9.

Il semble que les ruches avec un faible niveau d'infestation soient aussi des ruches avec une faible dynamique de départ. Les varroas se reproduisant dans le couvain, si la dynamique de ponte est faible, les varroas ne pourront pas voir leur population fortement augmenter.

A l'inverse, les ruches qui avaient la meilleure dynamique en début de saison (avant juillet) semblent être celles qui sont ensuite les plus touchées par varroas (ruches avec les plus forts niveaux en varroas totaux). La bonne dynamique de la colonie semble favoriser la bonne dynamique de croissance de varroa.

Concernant la production de miel, la tendance est assez claire puisqu'elle augmente en parallèle de l'augmentation du nombre de varroas totaux.

On constate donc que la dynamique des colonies influe fortement sur la dynamique de la population en varroa et sur la production de miel.

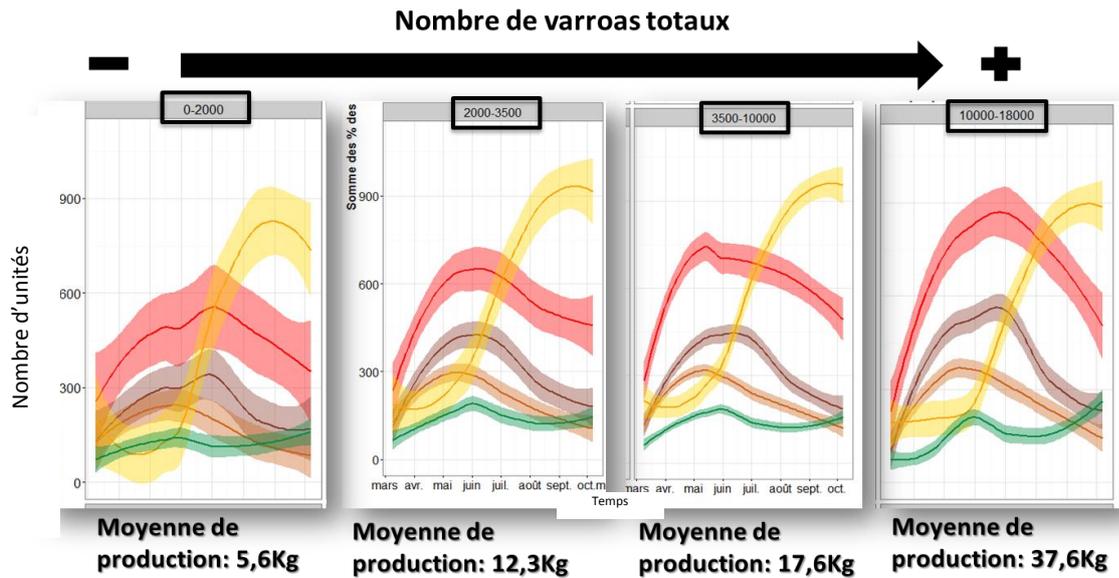


Figure 9 : Dynamique de colonie et production par niveaux de varroas totaux

2.4 Poids des reines

Lors de chaque estimation de la force d'une colonie, via la méthode ColEval, si la reine a été vue, celle-ci était attrapée puis pesée sur une balance de précision située dans l'utilitaire fermé. Cette précaution doit limiter l'impact des perturbations extérieures mais ne sont pas pour autant des conditions idéales de laboratoire confiné. Pour pallier cela, plusieurs mesures sont réalisées sur chaque reine, à chaque pesée et un système de transfert de la reine dans une cagette de contention propre a été adopté.

Ce travail est donc assez chronophage puisqu'il faut compter 3 à 4 minutes pour peser une reine, temps qui s'ajoute aux 10 à 15 minutes nécessaires pour une visite avec évaluation ColEval d'une colonie. Pour autant, l'analyse des données brutes a fait ressortir de nombreuses incohérences et près de 30% des données ont dû être retirées de l'analyse, faute de certitudes sur leur fiabilité.

La Figure 10 représente l'évolution du poids des reines au fil de la saison, en comparaison avec la dynamique des colonies, évaluée à travers les abeilles et le couvain.

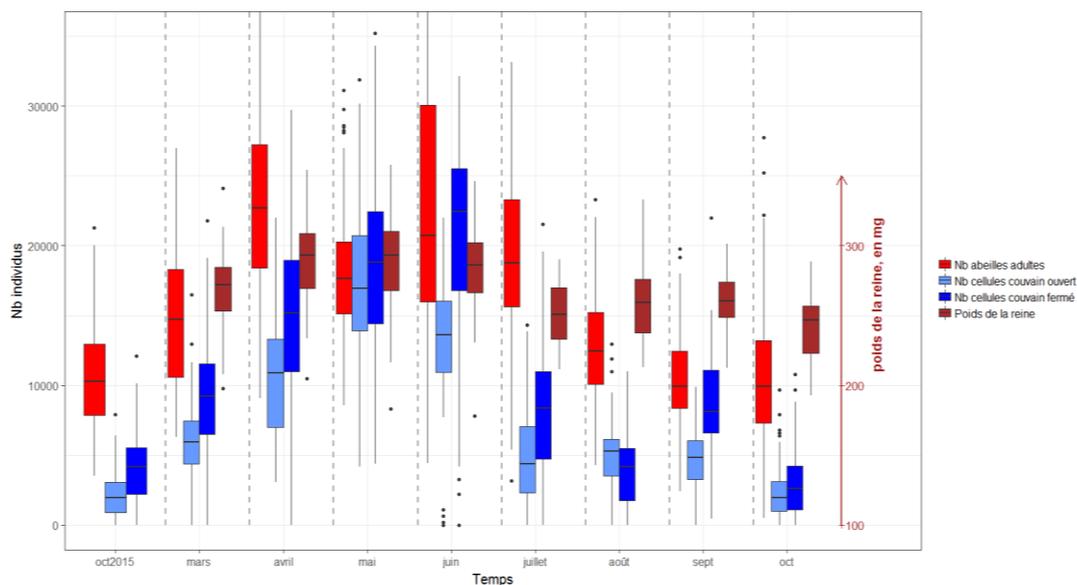


Figure 10 : Evolution de la population (adulte et couvain) et du poids de la reine au cours du temps (saison 2016)

On peut noter que les poids des reines varient de manière assez similaire que l'évolution de la surface de couvain ou du nombre d'abeilles. Toutefois, même si la tendance semble assez nette, les coefficients de corrélation sont assez faibles : entre 0,05 et 0,30 selon les paramètres pris pour estimer la force de la colonie.

Certains éleveurs de reines sélectionnent leurs reines lors de l'émergence en fonction du poids car l'opération est aisée à cet instant et ils sont persuadés que le poids est un bon reflet de la capacité de ponte. Notre travail ne contredit pas la pertinence de leur décision sans toutefois la conforter : le poids varie fortement au cours de la saison, en partie en lien avec l'activité de ponte.

2.5 Polyandrie

Concernant l'analyse génétique des ouvrières pour déterminer la qualité d'une reine, la problématique qui apparaît la plus cruciale pour un grand nombre d'apiculteurs éleveurs est le niveau de saturation obtenue sur leur zone de fécondation. En effet, les apiculteurs qui élèvent leurs reines souhaitent également maîtriser, le plus possible, les mâles qui vont les féconder. Le comportement naturel de reproduction des abeilles ne rend pas cette maîtrise aisée car une reine s'accouple avec plusieurs faux bourdons et parfois à plusieurs kilomètres de sa colonie. L'insémination artificielle est possible mais demande des compétences spécifiques et est assez coûteuse, son utilisation se limite donc souvent aux schémas de sélection. En revanche, les apiculteurs utilisent beaucoup des ruchers de fécondation (emplacement où ils rassemblent leurs reines vierges) qu'ils essaient de saturer en mâles venant des colonies qui les intéressent. Ces colonies s'appellent alors des « ruches à mâles » et par différentes techniques apicoles, elles sont incitées à produire beaucoup de mâles. Cette pratique demande un investissement important en matériel, en personnel et en mobilisation de colonies sans que les apiculteurs n'aient de certitude sur la fiabilité de la zone de fécondation qu'ils ont créée sauf cas topographiques très particuliers comme une île. Dans ce contexte, connaître la proportion de mâles accouplés avec leurs reines et issus des colonies qu'ils maîtrisent est donc une question primordiale pour la qualité des reines qu'ils souhaitent produire. Afin de répondre à cette question, une expérimentation a été menée en 2016 avec un rucher à mâles et des reines vierges placées à des emplacements situés à plusieurs distances (de 20m à 3000m) de celui-ci.

En maîtrisant la génétique des reines vierges et des ruches à mâles de cette expérimentation, l'analyse moléculaire des ouvrières issues de ces reines après fécondation aurait dû permettre de savoir la proportion de mâles venant bien des ruches à mâles souhaitées. Des difficultés pratiques ont engendré une faible réussite de la fécondation et cette expérimentation a donc été reconduite en 2017. Celle-ci s'est déroulée correctement et 45 reines fécondées à différentes distances des ruches à mâles ont pu être suivies.

Des prélèvements ont eu lieu sur les ouvrières afin de déterminer leur paternité et ces abeilles ont été envoyées à l'INRAE de Toulouse pour analyse. L'utilisation d'un petit nombre de SNP, permettant de distinguer les origines, sur un maximum d'ouvrières (700) était l'option retenue.

Les ruches à mâles de l'expérimentation proviennent du Groupement de Producteurs de Gelée Royale (GPGR), tandis que les colonies dont les reines sont à féconder sont de type local, dont la composition génétique est moins bien définie. Pour sélectionner un jeu de 96 marqueurs, permettant de différencier les génomes de type GPGR et local, nous avons analysé les fréquences alléliques déterminées pour ~3 million de marqueurs produits dans le programme France Agrimer SeqApiPop. Les marqueurs SeqApiPop, présentant des valeurs de Fst élevées entre la population du GPGR et des populations représentantes des abeilles françaises (*ligustica*, *carnica*, *caucasica* et *mellifera*), ont été sélectionnés.

Malgré les difficultés rencontrées lors de cette expérimentation, des contacts fructueux ont pu avoir lieu avec Labogena, une société de service en génotypage animal. Une étude de marché est en cours afin de déterminer les conditions commerciales de mise sur le marché de cet outil.

3. Outil de suivi automatique du comportement d'une reine dans sa colonie : quels résultats ?

3.1 Création de 6 ruches équipées de l'outil d'enregistrement automatique de l'activité de la reine

Afin de laisser la place pour les connecteurs, les ruches équipées du dispositif ne comportent que 9 cadres électroniques et une partition. Les 54 cadres avec 4 antennes et un connecteur chacun ont été réalisés par l'INRAE de Toulouse, puis l'UE APIS a été sollicitée pour intégrer les feuilles de cire. Par la suite, les cadres ont été mis à bâtir à l'UE APIS et sur la station de l'ITSAP-Institut de l'abeille (Figure 11).



Figure 11 : Photos d'un cadre avec de la cire gauffrée puis après construction de la cire par les abeilles

Chaque dispositif a la conception électronique suivante : un lecteur de puces électroniques, commandé par un ordinateur, va interroger selon un algorithme défini en fonction de sa dernière position connue les antennes les plus susceptibles de capter la reine - parmi les 36 antennes présentes.

Les dispositifs finaux sont conçus pour que les colonies puissent être visitées selon une procédure la plus proche possible d'une ruche non équipée. Pour cela, les connexions filaires sont réalisées avec des connecteurs de grande taille, permettant une manipulation avec des gants. Pour intégrer les antennes équipées du dispositif dans les ruches sans développer un modèle différent de ceux utilisés classiquement par les apiculteurs, une simple adaptation d'un nourrisseur plateau a été effectuée.

A l'exception des antennes situées sur les cadres, l'ensemble des composants électroniques ont été regroupés (lecteur, Raspberry, etc.) dans un coffret qui peut s'installer aisément sur l'arrière d'une ruche. Un écran de visualisation a été intégré au coffret afin de pouvoir visualiser le fonctionnement sur place en cas de dysfonctionnement du réseau ou du superviseur.

3.2 Mise en place du dispositif sur 2 ruches et contrôle de performances



Figure 12 : Photo de ruches équipées sur le site expérimental de l'ITSAP-Institut de l'abeille en Avignon

En raison de retard de fabrication des coffrets électroniques, seuls deux dispositifs ont pu être mis en route au printemps 2017 à Avignon (Figure 12). En parallèle, 3 colonies témoins ont été constituées de manière homogène, en termes de couvain et de réserves et avec des reines du même âge. Toutes les reines, y compris celles des colonies témoins, ont été marquées avec une puce RFID. L'objectif premier étant d'évaluer la précision du dispositif pour suivre la dynamique de la colonie, des ColEval étaient réalisés sur toutes les colonies toutes les 3 semaines. Sur les colonies équipées du dispositif électronique, ce ColEval était effectué au quart de face de cadre pour colonies. De plus, les autres paramètres de comportement, état sanitaire, production etc. des colonies étaient enregistrés.

Au final, en raison de coupures ou d'incidents techniques, les données ne sont pas disponibles pour les deux dispositifs sur l'intégralité des journées, entre leur mise en place et aout. Les données manquantes représentent moins de 20% de la période.

On peut noter que ces dispositifs ont parfaitement fonctionné par la suite, après quelques ajustements techniques, et ce malgré un suivi très restreint.

3.3 Lien entre les indicateurs issus de l'outil automatique de suivi et la dynamique de population des colonies

Dans un premier temps, l'obtention de nombreuses données complémentaires à travers cette expérimentation sur plusieurs dispositifs, a permis d'optimiser les paramètres de fonctionnement de l'outil. Le délai entre la commutation des antennes est par exemple un paramètre très complexe à ajuster en fonction de l'historique de recherche, afin d'avoir le moins de données possibles sans affectation de la reine à une zone, tout en garantissant la fiabilité et en évitant de surchauffer le dispositif par des interrogations inutiles.

Les données de l'expérimentation étant totalement novatrices, elles peuvent être valorisées selon plusieurs angles de vue.

Dans un premier temps, une simple analyse descriptive de la fréquentation des différents cadres par la reine au cours du temps permet de constater qu'en période de ponte, la reine fréquente préférentiellement une zone large de 3 cadres chaque jour tout en visitant au moins 7 des 9 cadres (Figure 13).

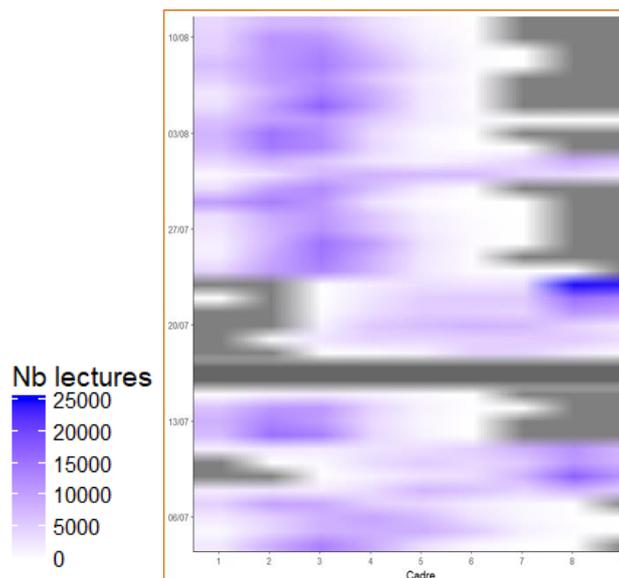


Figure 13 : Nombre de lectures/cadre en fonction du temps pour la reine de la première ruche du 04/07/2017 au 11/08/2017.

La poursuite de l'expérimentation durant l'automne-hiver 2017-2018 a permis, comme attendu, de constater une baisse d'activité des reines. Pour autant, contrairement à ce qui pouvait être supposé en période où les abeilles sont grappées sur un petit volume et semblent totalement inertes, la reine continue de se déplacer sur plusieurs cadres chaque jour (Figure 14).

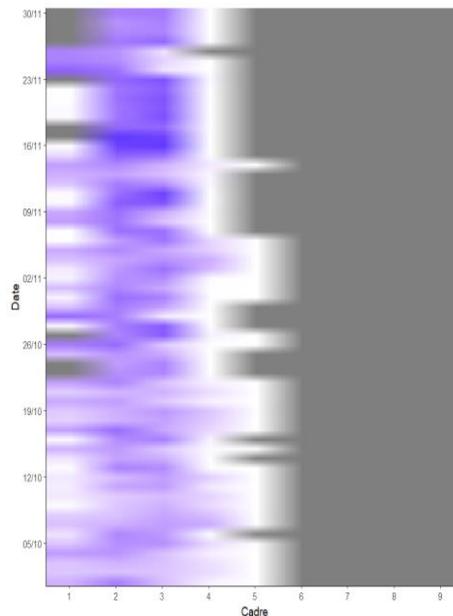


Figure 14 : Nombre de lectures/cadre en fonction du temps pour la reine de la première ruche du 01/10/2017 au 30/11/2017.

Concernant les heures d'activité, alors que les ouvrières ne sortent plus lorsque la luminosité est trop faible, ce dispositif a permis de s'assurer que la reine se déplace à chaque heure de la journée. Selon les reines, il existe des variations plus ou moins importantes au cours d'une même journée mais aucun facteur explicatif n'apparaît clairement (Figure 15) :

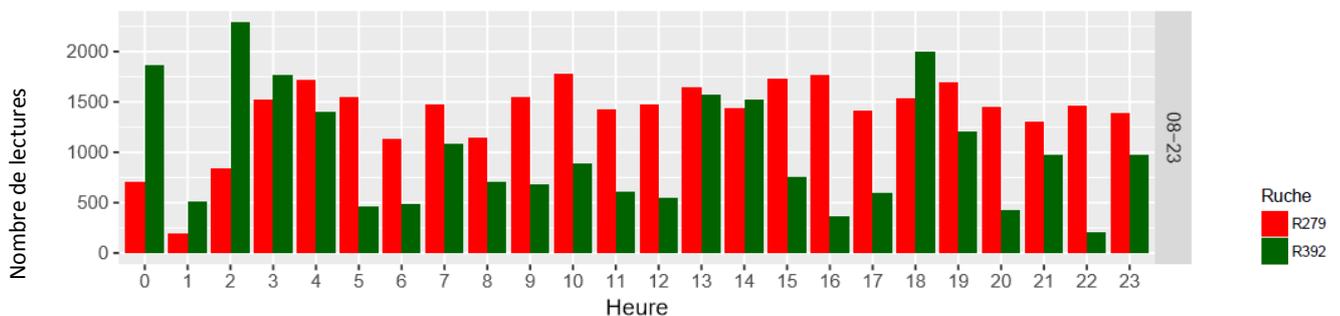


Figure 15 : Nombre de lectures en fonction de l'heure pour les reines des 2 ruches le 23/08/2017

Une hypothèse initiale forte était que la reine se déplace en fonction des endroits où elle pond ses œufs. Le dispositif aurait alors permis de connaître la dynamique d'une colonie sans avoir à la visiter. Pour tester cette hypothèse, les colonies ont donc été évaluées toutes les 3 semaines avec la méthode ColEval appliquée au quart de cadre. Le couvain ouvert observé lors d'une visite signifie que la reine a pondu à cet endroit entre 0 et 8 jours avant la visite. Le couvain fermé indique que la reine a pondu à cet endroit entre 9 et 20 jours avant la visite.

La mise en parallèle de cette information de visite et de l'information sur la position de la reine durant les périodes concernées indique visuellement une corrélation assez faible entre ces deux paramètres (Figure 16). Au final, il apparaît donc que la reine se déplace beaucoup à l'intérieur de sa colonie, et pas nécessairement en lien avec son activité de ponte.

On peut aussi noter que la comparaison aux colonies témoins, créées en même temps, a permis de vérifier que le dispositif n'a pas d'influence négative majeure puisque les développements des colonies équipées et témoins sont similaires.

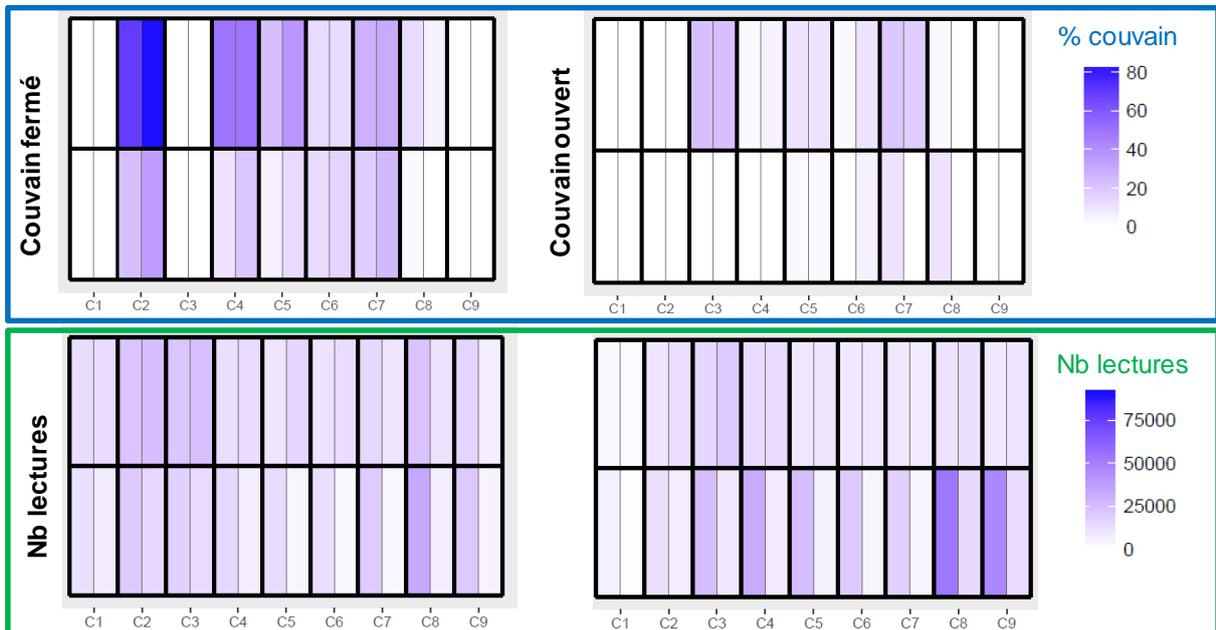


Figure 16 : Comparaison de la répartition par $\frac{1}{4}$ de cadre de la ponte d'une reine avec sa position enregistrée

Parmi les résultats plus anecdotiques mais qui seraient à approfondir sur davantage de colonies, on peut noter que la plupart des visites / ouvertures de ruches engendre une perte de localisation de la reine par le dispositif pendant parfois plusieurs heures. Cela semble indiquer que la reine, confrontée à un tel évènement, se réfugie en fond de ruche ou se déplace trop rapidement entre les cadres pour être localisée durablement. Ce type d'informations corrobore l'impression que les manipulations des colonies peuvent perturber le comportement normal de celles-ci.

Au vu de ces résultats, l'application directe d'un outil de suivi du comportement d'une reine semble prématurée au niveau des exploitations apicoles. En revanche, ces expérimentations font émerger de nombreuses questions sur l'activité de la reine, en dehors de la ponte, et ses conséquences sur sa qualité. On peut ainsi s'interroger par exemple sur l'impact en terme de durée de vie d'une différence d'activité entre 2 reines qui ont une activité de ponte semblable.

Conclusion

Le projet CIReine constitue un socle important pour le développement du testage en apiculture. Au-delà de la mise au point de références pour le contrôle de performances des reines, il a permis l'acquisition d'une expertise sur les mesures des critères d'intérêt indispensables à la mise en œuvre de plan de sélection pertinents. Le nombre élevé de projets de sélection démarrés dans la filière apicole en s'appuyant sur les acquis du projet CIReine illustre bien l'importance du travail effectué. Au-delà du projet, cet accompagnement se poursuit à travers de nombreuses formations et collaborations de long terme entre l'UMT PRADE et les partenaires professionnels.

La recherche technologique n'a pu aboutir à un outil immédiatement disponible pour les apiculteurs mais les étapes intermédiaires ont apporté des éléments importants pour leurs pratiques, notamment sur la toxicité des différentes colles utilisées pour le marquage des reines. Sur le plus long terme, la création de plusieurs dispositifs originaux pour suivre le comportement des reines permettra d'explorer des pistes de recherches innovantes.

Remerciements

L'équipe-projet remercie :

- Les membres du comité de pilotage pour leur présence aux réunions et leurs conseils avisés ;
- L'ensemble des équipes techniques qui sont intervenues pour assurer la réalisation du projet ;
- Le ministère de l'Agriculture, de l'Alimentation et de la Forêt pour le financement.

Références bibliographiques

Anderson D., 2004. Improving Queen Bee Production. A report for the Rural Industries Research and Development Corporation

Basso B., 2013. Article Hiver 2012-2013 : un taux de pertes national stable malgré de fortes disparités régionales – Lettre de l'ITSAP-Institut de l'abeille (août 2013)

Bienefeld K., Pirchner F., 1990. Heritabilities for several colony traits in the honeybee (*Apis mellifera carnica*). Apidologie 21, 175-183.

Bienkowska M., Loc K., Panasiuk B., Wegrzynowicz P., Gerula D., 2011. Effect of semen dose and application on the performance of instrumentally inseminated honeybee queens kept with 25 workers bees. Journal of Apicultural Science 52, 23-33.

Boyer J., 2012. Pesées des reines vierges. InfoReine

Collins A.M., Rinderer T.E., Harbo J.R., Brown M.A., 1984. Heritabilities and correlations for several characters in the honeybee. Journal of Heredity 75, 135-140.

De Souza D.A., Bezzera-Laure M.AF., Franco T.M., Gonçalves L.S., 2013. Experimental evaluation of the reproductive quality of Africanized queen bees (*Apis mellifera*) on the basis of body weight at emergence. Genetics and Molecular Research 12, 5382-5391.

Holzmann C., Vallon J., Jourdan P., 2012. ITSAP-Institut de l'abeille - Cahier technique Hivernage et pertes de colonies chez les apiculteurs professionnels français – 45 p

Jackson J.T., Tapy D.R., Fahrbach S.E., 2011. Histological estimates of ovariole number in honey bee queens, *Apis mellifera*, reveal lack of correlation with other queen quality measures. Journal of Insect Science 11, Article Number 82.

Kahya Y., Gençer V., Woyke J., 2008. Weight at emergence of honey bee (*Apis mellifera caucasica*) queens and its effect on live weights at the pre and post mating period. Journal of Apicultural Research 47, 118-125.

Kretzschmar A., 2013. Quantification des conditions environnementales, populationnelles et sanitaires, favorables aux ruchers pour pallier l'affaiblissement des ruchers sur lavande par le suivi de l'observatoire. 2èmes Journées de Recherche Apicole.

Cet article est publié sous la licence Creative Commons (CC BY-NC-ND 3.0).



<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>

Pour la citation et la reproduction de cet article, mentionner obligatoirement le titre de l'article, le nom de tous les auteurs, la mention de sa publication dans la revue « Innovations Agronomiques », la date de sa publication, et son URL ou DOI).