



**INFO-REINES N°37/38**

**HIVER 95/PRINTEMPS 96**

**SÉLECTION, CRITERES ET MÉTHODES**

**par Y. LECONTE & A. PARIS**

**INRA MONTFAVET**

### **Points sur les recherches de l'INRA sur l'abeille**

En ce qui concerne la sélection de l'abeille, l'INRA a réalisé de nombreux travaux depuis une trentaine d'années. Nous devons à Fresnaye la mise au point et l'étude des résultats de production des triples hybrides (hybrides trois voies). Le problème soulevé par l'utilisation de ces hybrides fut celui de la pollution génétique qui en résultait et de la conservation des races locales.

J.M. Cornuet élabora un plan de sélection applicable à l'abeille noire pour augmenter sa productivité et d'autre part, il mit en place un programme de recherche sur la création de mâles aveugles ne pouvant pas participer aux fécondations et donc ne contribuant pas à la pollution génétique. Ce programme poursuivit durant 7 ans arrive à terme cette année. Il est opérationnel et peut être utilisé pour la création d'hybrides trois voies, il reste à savoir s'il intéresse les apiculteurs.

Le plan de sélection de J.M. Cornuet a été appliqué à l'INRA de Montfavet sur les écotypes locaux de l'abeille noire. M. A. Paris nous présente les résultats obtenus. Au bout de trois générations sélectionnées, il n'y a pas eu de différences sensibles avec les témoins locaux. Ceci ne signifie pas qu'une sélection sur la productivité n'est pas possible, mais que les résultats ne peuvent peut-être apparaître qu'au bout d'un nombre plus grand de générations, comme c'est parfois le cas lorsqu'on réalise une sélection divergente chez les insectes : les différences peuvent apparaître rapidement ou au contraire au bout d'une dizaine de générations.

Au démarrage du programme, 12 colonies non apparentées ont subi une électrophorèse, ce qui a permis de retenir 10 colonies à l'origine des 10 familles.

Sur un grand nombre de filles (environ 1000), 150 à 160 reines ont été retenues après une sélection rigoureuse.

En deuxième année, on a sélectionné les meilleures de ces 150 reines à partir de leur performances et d'autres caractères comme l'instinct de nettoyage, pour obtenir de nouveau 10 à 12 familles. Le même schéma a été reproduit en 3ème année.

Les fécondations étaient naturelles, en cherchant à saturer la zone en mâles sélectionnés (60 à 80 reines par fécondation et 12 à 13 ruches à mâles). A chaque étape, l'absence d'hybridation était contrôlée par électrophorèse.

En fait, certaines familles se comportaient très bien et conservaient leurs reines jusqu'au bout, tandis que d'autres ne donnaient que des résultats médiocres et même perdaient leurs reines avant la fin de l'expérimentation.

Quatre familles se sont révélées particulièrement bonnes et ont toujours eu des résultats supérieurs aux autres.

Aujourd'hui, le programme étant arrêté, les reines provenant de ces quatre familles ont été mises à la disposition des apiculteurs par l'intermédiaire de l'ADAPI et des apiculteurs de PACA, professionnels et amateurs.

A. Paris retient de cette expérience la lourdeur du programme pour des résultats peu évidents, mais peut-être faut-il plus de temps. Pour obtenir des reines de qualité, il faut en élever un très grand nombre et éliminer sérieusement toutes celles qui ne sont pas satisfaisantes.

### **Sélection d'abeilles résistantes à *Varroa***

Le premier programme mis en place à l'INRA concernant la résistance de l'abeille à *Varroa* l'a été pour tenter de mettre en évidence, et pour sélectionner, des caractères pouvant augmenter cette résistance.

- La durée d'operculation : une durée d'operculation courte diminue le taux de reproduction du parasite. L'héritabilité de ce caractère est estimé entre 0,30 et 0,80 selon les chercheurs. Cette étude est maintenant abandonnée à l'INRA.
- La chaleur : une température supérieure à 36°C met en péril la reproduction de *Varroa*. Dans certains pays (Algérie, Maroc) il y a moins de *Varroa*, la température du couvain restant à une température dépassant les 36°C.
- Le comportement de nettoyage : mis en évidence par le test du couvain congelé. A cette date (nov. 94), la relation entre ce comportement et la détention de *Varroa* sous l'opercule n'est pas établie de façon certaine.
- Le comportement d'épouillage : une sélection au printemps avait montré sur certaines colonies un fort taux de *Varroa* mutilés (jusqu'à 34%), mais un contrôle en automne n'a pas permis de retrouver ces résultats.

Il y a une corrélation entre le nombre de *Varroa* tombés naturellement (avant traitement) sur les planchers grillagés et le nombre total de *Varroa* présents dans la ruche.

Y. Leconte lance un appel aux apiculteurs pour essayer de repérer des lignées qui, à un moment ou à un autre, ont tendance à mutiler les *Varroa*. Le fait qu'il y ait plusieurs fratries dans la colonie peut, peut-être, provoquer la discontinuité du phénomène, mais on dit cependant que les spermatozoïdes des différents mâles sont mélangés dans la spermathèque de la reine.

J. Vaillant pense qu'un protocole précis et simple pour rechercher les colonies qui mutilent les *Varroa* intéresseraient sûrement les amateurs.

Y. Leconte dit qu'il faut être vigilant sur les ruches et ne pas multiplier les traitements. S'il y a peu de *Varroa*, un traitement doux est suffisant (cf méthode de lutte intégrée). Une méthode biotechnique pourrait être proposée dans quelques mois.

A. Paris signale que les comportements journaliers de chutes naturelles de *Varroa* sont très variables. Si les ruches ont beaucoup d'activité, peu de *Varroa* tombent. Si les abeilles sortent peu, le nombre de *Varroa* recueillis augmente.

Le projet Rhône-Poulenc/INRA/CNRS Bures, de piège à *Varroa* utilisant des phéromones de couvain (attractivité vis à vis de *Varroa* ) a été abandonné : on ne retrouve pas dans les conditions naturelles la même efficacité qu'en laboratoire.

Une autre possibilité serait dans l'utilisation de phéromones sexuelles d'agrégation de *Varroa* . Chez d'autres espèces, ces phéromones sont utilisées pour créer la confusion entre mâles et femelles et empêcher les accouplements.

Y. Leconte poursuit également des recherches sur la cryoconservation du sperme de mâles d'abeilles, à la suite des travaux de Mme Peng. Actuellement, au bout de 2 ans de cryoconservation, le sperme garde 20% de sa vitalité. Y. Leconte pense qu'en 5 ans, on peut obtenir un taux de conservation de 50%, ce qui devient intéressant. Il faut pour cela améliorer les solvants, les cryoconservateurs et les techniques. La cryoconservation peut être une solution complémentaire aux conservatoires génétiques naturels et une technique très utile aux croisements et à la sélection.

---

### **INFO-REINES N°37/38, HIVER 95/PRINTEMPS 96**

#### **PROGRAMME DE SÉLECTION : MÉTHODE DE CROISEMENT ET DE CONSERVATION DE CONSANGUINITÉ**

**PAR S. COBEY, UNIVERSITÉ COLOMBUS, OHIO, USA**

Les systèmes d'amélioration de l'abeille par production de lignées consanguines qui étaient ensuite croisées entre elles pour bénéficier de l'hétérosis ont eu beaucoup de succès aux USA. Mais les lignées consanguines (lignées imbreed) sont très difficiles à conserver et il y a beaucoup de pertes (manque de vigueur, supercédure). Il faut très souvent ajouter du couvain et le simple maintien de ces lignées est très lourd et demande un travail intensif. La réalisation des hybrides donne en F1 d'excellents résultats mais dès la F2, comme la fécondation est naturelle et la plupart du temps incontrôlée, les résultats sont inégaux et souvent mauvais avec perte d'une grande partie des caractères.

Un autre système moins lourd consiste dans l'utilisation d'un nombre réduit de colonies, à faire de la consanguinité entre les différentes lignées. Il faut au départ choisir les populations sur un large éventail pour disposer d'une variété de gènes suffisante. Un calcul par ordinateur a montré qu'en ayant 50 colonies non apparentées au départ, avec le système adopté, on pourrait pendant 20 ans maintenir la consanguinité au dessous du seuil acceptable. Lorsqu'on travaille avec une population restreinte de colonies, il faut connaître la passé génétique de ces colonies. S'il y a introduction d'une nouvelle colonie, il faut être très prudent et vigilant sur les conséquences. Par exemple, si on a développé une résistance à *Varroa* qu'elle est la valeur de la nouvelle colonie sur ce caractère. C'est un travail long et les résultats sont peu rapides. La méthode est assez flexible. Il est difficile de conserver des colonies consanguines. Il y a parfois des pertes mais ce n'est pas très grave. Il faut considérer la population globale des effectifs.

Cinq à dix mâles sont prélevés dans chacune des 50 colonies et le sperme issu des 50 colonies est mélangé et sert à l'insémination des filles. Cinq à dix reines vierges par colonie sont inséminées par le sperme mélangé. Le sperme étant très similaire, il n'y a pratiquement pas d'effet mâle et on n'observe que l'effet reine. Ceci est le schéma idéal mis au point par ordinateur mais il est possible de fonctionner avec un nombre réduit de dix colonies de bonnes reines. S. Cobey utilise l'abeille carnolienne. Elle dispose de 7 lignées commerciales provenant de 7 éleveurs de régions différentes, qui testent leurs colonies et lui proposent les meilleures.

Pour que la sélection soit efficace, elle ne doit pas être trop scientifique et trop attachée aux détails car cela limite beaucoup le nombre de caractères étudiés. Il s'agit d'avoir une vue globale de la performance de la colonie plutôt qu'une étude approfondie de chacun de ses caractères. Les tests utilisés doivent être pertinents. Il faut pour cela minimiser les effets de l'environnement et toutes les ruches doivent être traitées de la même façon en même temps...

Le succès du programme est lié à l'évaluation des caractères retenus. Dans une seule colonie, il y a beaucoup de sous-familles (plusieurs pères). Quand on évalue une colonie, c'est le résultat d'un système social très complexe.

Mais il est inutile de connaître le détail de ces interactions sociales qui font que la colonie est bonne. Une appréciation globale de la colonie est suffisante.

Il est nécessaire d'avoir des colonies qui élèvent beaucoup de mâles. Il y a une opposition entre la nécessité de conserver la variabilité pour pouvoir sélectionner et le fait de travailler en consanguinité avec un stock d'abeilles qui devient relativement homogène. Il faut donc au départ un stock de gènes suffisamment vaste pour maintenir la variabilité.

La sélection ne doit pas s'exercer dans une seule direction. Si on ne sélectionne que sur un caractère, il y a un gros risque de perdre de bons gènes pour d'autres caractères (par exp. sélection uniquement sur la production de miel, risque de perte d'un bon comportement hygiénique).

Il faut utiliser l'insémination pour contrôler les croisements. Une grille à reine est placée devant l'entrée de la ruche pour éviter la sortie des reines.

Cinq à six caractères sont sélectionnés. Les tests sont réalisés en conditions naturelles. Ils sont simples et ne doivent pas durer plus de 5 à 10 minutes par colonie. Les colonies sont testées deux fois par an. Pour une reine inséminée au printemps, les tests seront réalisés à l'automne et au printemps suivant. L'évaluation est très rapide. Elle est faite en plein champ et pour toutes les colonies en même temps. Les colonies doivent être bien constituées, apparaître en bonne santé, avoir un bon état général de vitalité.

Chaque ruche a une étiquette à l'entrée pour identifier la reine (exp. 4/B30/G37 ; 4=année de l'insémination, B30= mère de la reine (B=bleu), G37= mère de B30).

L'ensemble des colonies est soumis à un test de présélection : il s'agit de mesures visuelles rapides avec évaluation de la ponte de la reine. La carnelienne présente une couronne de pollen bien disposée autour du couvain.

On additionne les points de chaque colonie. On obtient un score pour chaque colonie. Si il y a une maladie, la colonie est éliminée du plan de sélection. C'est un test qui doit être nécessairement simple et rapide et ne doit pas prendre plus de 5 minutes par colonie sinon on ne s'y tiendrait jamais. Une visite rapide de la colonie avec balayage du couvain doit permettre l'appréciation des caractères testés. Autrefois l'acariose était très présente et constituait un grave problème. Le caractère de résistance à l'acariose était intégré au plan de sélection. Aujourd'hui, il est difficile de trouver des abeilles atteintes de cet acarien.

#### Test du comportement de nettoyage

Un carré de couvain congelé est placé dans la ruche. On mesure la vitesse à laquelle les abeilles désoperculent le couvain mort. Ce comportement serait corrélé avec la capacité des abeilles à détecter le *Varroa* sous l'opercule. Ainsi les abeilles qui auraient ce comportement seraient également capables de désoperculer les cellules contenant des larves parasitées par *Varroa*. Dix pour cent des colonies testées montre une capacité à nettoyer très rapidement les cellules operculées contenant du couvain mort. Le couvain congelé reste 48 heures dans la colonie. Si, au bout de ce temps, 85% du couvain est nettoyé, la colonie est considérée comme bonne nettoyeuse. Le test est répété 2 à 3 fois par an, pour tester l'effet de la saison, de la force de la colonie...

S; Cobey s'attache actuellement à sélectionner particulièrement ce caractère. Elle a essayé de créer une sous-population avec ce caractère mais en continuant à sélectionner les autres caractères car il serait dangereux de ne considérer que ce seul critère. La sélection d'abeilles résistantes à *Varroa* est sûrement très complexe et demandera beaucoup de temps. S. Cobey utilise encore ce test avec beaucoup de précaution. Elle essaie de considérer la population de façon globale et pas sur un seul critère.

#### Résultat des tests de présélection pour l'ensemble des caractères

Le test de présélection est réalisé pendant la période de développement, avant le test de production. Il ne doit pas prendre plus de 5 minutes. Si la colonie réalise un total au dessus de 45 à 50 points (total score automne + score printemps), elle est conservée. Sur les 2 à 300 colonies de départ, on en garde une centaine après le test de présélection (celles ayant un score inférieur à 45 sont mises hors programme). S'il y a une perte de grosses

productrices, ce n'est pas grave, ce qui compte étant la valeur globale de la colonie. Ces cent colonies sont ensuite testées pour la récolte de miel (Weight Gain Test).

C'est l'aspect le plus important puisque le but de l'élevage des abeilles, c'est bien la production de miel. Il faut s'intéresser à l'ensemble des caractères avec toujours pour finalité l'augmentation régulière des performances globales du cheptel.

Pour estimer la capacité de récolte de miel, on réalise des pesées en cours de miellée car il a été montré qu'il y a une corrélation entre l'évolution du poids de la ruche et le poids de la récolte finale. Cela permet de gagner du temps puisqu'on n'est pas obligé d'attendre la récolte pour évaluer une colonie. La colonie n'est pas complètement soulevée du sol mais elle est inclinée et pesée une fois à l'arrière et une fois à l'avant.

Les colonies ayant un pourcentage de gain de poids inférieur à 35% en cours de miellée sont éliminées. C'est un test simple et rapide, mais qui demande du muscle!

Les tests de présélection et un gain de poids demandent au total un temps de 15 à 20 minutes par colonie et par an.

Le but ultime est d'obtenir des colonies productrices et douces. Si on essaie de compliquer, on risque de perdre des gènes intéressants.

Le travail est partagé entre les apiculteurs (éleveurs qui ont fourni les colonies initiales et participent au programme) et S. Cobey et son équipe. Les apiculteurs réalisent un certain nombre de tests. Beaucoup des inséminations sont réalisées ensemble. S. Cobey assure la réalisation du test hygiénique. L'ensemble des tests permet de mesurer la capacité des colonies à se développer et à obtenir de grandes populations d'abeilles.

On évalue également la capacité à hiverner, les reines étant gardées plusieurs années. La majeure partie des colonies se trouvant en Californie, l'hivernage ne pose pas de problèmes. Mais dans l'Ohio, le climat est très sévère : les colonies trop faibles meurent.

L'observation du développement principal est pertinente pour juger la capacité à hiverner des colonies. Un mauvais développement est le signe qu'il y a eu des problèmes à l'hivernage et entraîne le rejet de la colonie.

L'expérimentation est répétée tous les ans avec de jeunes reines. Les reines sont en général conservées deux ans.

Les reines sélectionnées sont utilisées par les éleveurs non pas pour la production de miel mais comme souches pour produire des reines destinées à la vente.

D'après les calculs effectués par l'ordinateur pour ce programme de sélection, une consanguinité trop forte n'apparaît qu'au bout de 200 générations, en partant de 50 colonies initiales non apparentées et sans qu'il y ait apport de gènes extérieurs pendant 20 ans. C'est grâce à l'homogénéisation du sperme provenant de l'ensemble des 50 colonies sélectionnées qu'on évite l'augmentation trop rapide de la consanguinité.

En fait, S. Cobey introduit un peu de sang nouveau pratiquement tous les ans, mais elle fait très attention pour ne pas perdre les gènes intéressants ou amener des gènes néfastes aux objectifs du programme. En général, elle introduit de nouveaux gènes par les mâles, mais pas par les reines. Sur deux ou trois ans, en moyenne deux ou trois colonies nouvelles sont introduites.

L'application de ce programme a permis d'avoir un stock d'abeilles beaucoup plus uniforme.

Il n'y a pas de caractère qui soit totalement fixé dans les populations. Il n'y a pas de résultats formels sur la production de miel par comparaison avec d'autres colonies, le plan de sélection visant à fournir des reines aux éleveurs en vue de la production de reines. Les reines vendues par ces éleveurs satisfont pleinement les apiculteurs.

Le but de la sélection poursuivie par l'éleveur n'est pas le même que celui de la nature.

Pour assurer la variabilité génétique de son stock de départ, S. Cobey avait demandé des colonies à tous les apiculteurs élevant la carnelienne (Etats-Unis et Canada). Elle a reproduit entre elles les colonies fournies pour réaliser un grand brassage génétique puis a commencé à uniformiser ces populations en essayant de retrouver les caractères de la carnelienne, mais sans effectuer d'analyse biométrique.

Ce programme de sélection a débuté en 1981/82 et porte sur environ 10 générations. S. Cobey a obtenu une bonne uniformisation de ses colonies mais elle n'a pas de comparaison précise par rapport aux performances de départ ni par rapport à la production moyenne américaine.

Les meilleures souches sont envoyées aux éleveurs participant au programme. Les éleveurs inséminent les reines et les filles obtenues sont fécondées naturellement et vendues.

En ce qui concerne l'homogénéité du couvain, S. Cobey veut rester au dessus du seuil de 80% de compacité (moins de 20% de cellules vides).

Il y a en tout sept personnes qui réalisent les tests. Cela peut entraîner de la variabilité dans les mesures, mais c'est la même personne qui suit les mêmes colonies et on n'a besoin que d'une appréciation globale et non pas de mesures rigoureusement scientifiques.

Le test de nettoyage du couvain congelé est effectué depuis trop peu de temps pour qu'on ait des résultats par rapport à la résistance de *Varroa*, mais S. Cobey nous informe qu'un chercheur vient de publier récemment des résultats qui confirment la corrélation entre le comportement hygiénique et l'élimination des *Varroa*.

En utilisant des cellules en plastique (type Cupularve) et en introduisant des *Varroa* dans des cellules operculées, ce chercheur a montré que des colonies ayant un comportement de nettoyage vis à vis du couvain congelé pouvaient détecter et réouvrir 70% des cellules operculées contenant du *Varroa*, tandis que des colonies non nettoyeuses ne réouvraient que 10% seulement des cellules parasitées. Ces résultats sont encore préliminaires.

Le test du couvain congelé existe depuis les années 1950. Butler avait montré une corrélation entre le comportement de nettoyage et la résistance à la loque et au couvain plâtré.

---

### **INFO-REINES N°40 - HIVER 97**

#### **PHÉROMONES DES REINES PAR MARC WINSTON, DÉPARTEMENT DES SCIENCES BIOLOGIQUES, UNIVERSITÉ SIMON FRAZER - VANCOUVER (CANADA)**

A l'origine de la connaissance des phéromones, il faut citer l'expérience de Jean-Henri Fabre en 1911. Des femelles de lépidoptères étaient gardées encagées, tandis que des mâles de la même espèce étaient lâchés à des distances variables de la cage (jusqu'à 5km). Les mêmes mâles se retrouvaient quelques instants plus tard autour de la cage. J.H. Fabre pense à une substance odorante émise par les femelles qui attire les mâles.

Depuis on a trouvé plusieurs milliers de substances analogues intervenant dans la vie des insectes. On leur a donné le nom de phéromones. Le nom phéromone a été inventé par Karlston & Lüsber (1959) à partir des racines grecques *pheroin* (transporter) et *horman* (excitation). La définition qu'ils en donnent est la suivante : "les phéromones sont des substances sécrétées par des individus et qui reçues par d'autres individus de la même espèce, provoquent une réaction spécifique, un comportement ou une modification biologique". (in M. Barbier, Les phéromones, aspects biochimiques et biologiques). Ces phéromones peuvent être des :

- phéromones sexuelles
- phéromones de trace (fourmis)
- phéromones d'alarme (guêpes, abeilles)
- phéromones de Nasonov (abeilles ouvrières)
- phéromones royales de l'abeille...

On distingue deux types de phéromones : les phéromones **incitatrices** qui agissent sur le comportement et les phéromones **modificatrices** qui agissent sur la biologie.

### **Les phéromones royales de l'abeille**

1 - la phéromone émise par les glandes mandibulaires de la reine ou QMP (queen mandibular pheromon). Elle a été identifiée.

2 - les phéromones émises par les glandes tergaes (abdomen).

3 - les phéromones émises par les glandes tarsales (extrémité des pattes).

Ces deux dernières catégories de phéromones n'ont pas été identifiées.

### **la phéromone royale des glandes mandibulaires ou QMP**

(travaux de Winston & Slessor, université Simon Fraser, Vancouver)

La partie active de cette phéromone est constituée d'un mélange de cinq composés (trois composés acides et deux composés aromatiques). Chacun de ces composés pris isolément a une très faible activité. Du point de vue qualitatif, la fraction acide de cette QMP est la plus importante.

Les cinq composés peuvent être fabriqués synthétiquement. Des expériences ont été réalisées avec des leures en verre imprégnés d'extrait de glandes mandibulaire. l'activité du leurre dure de 10 à 15 minutes (les abeilles nettoient le support).

Il existe d'autre leures à activité plus longue (jusqu'à deux mois).

#### Production et variations quantitatives et qualitatives

Les glandes mandibulaires se trouvent de chaque côté de la tête. Chacune est attachée à sa mandibule par un conduit. Les sécrétions glandulaires sont déversées sur la mandibule. La phéromone royale est dispersée sur tout le corps de la reine de deux façon :

- passive

- les ouvrières de la cour aident à la dispersion de la phéromone par leurs contacts.

La quantité maximale de phéromone se trouve sur la tête et sur l'abdomen de la reine. La phéromone royale est captée par les abeilles au niveau de leurs récepteurs antennaires. Quand la reine se déplace, une petite quantité de substance est déposée sur la cire mais se sont surtout les ouvrières qui participent à la dispersion de la phéromone.

Les cinq principaux composants de la phéromone royale ont été comparés en quantité et en proportion entre deux races d'abeille : *A. m. ligustica* et *A. m. scutellata* . Il y avait les mêmes quantités relatives entre les deux races.

Il n'a pas été observé de différences dans la composition de la phéromone selon la période de naissance de la reine ni d'effet de saison et pas plus de différences non plus entre de bonnes et de mauvaises reines. La seule différence observée dans la composition se trouve entre avant et après l'accouplement de la reine.

Une reine bourdonneuse produit moins de phéromone qu'une reine normalement fécondée.

Souvent une reine installée produit moins de phéromone. Il est possible que le processus même de l'accouplement au nouveau comportemental (par exemple la reconnaissance du partenaire) intervienne dans le déclenchement de la production phéromonale. Pour compenser l'absence de cette séquence chez la reine inséminée, on peut ajouter de la phéromone de synthèse sur son corps ou la badigeonner de sécrétion

mandibulaire, pour qu'elle soit mieux acceptée. Par la suite, en vieillissant, elle augmentera sa production. Une fois qu'elle est acceptée dans la colonie (six à sept jours après l'insémination ou la fécondation naturelle), ce n'est plus un problème si son taux de phéromone reste bas.

Les ratios des cinq composants sont différents entre des reines inséminées et des reines fécondées naturellement, en particulier pour les composés aromatiques. Certains travaux d'origine québécoise semblent montrer dans certains cas une légère augmentation dans l'acceptation des reines si on ajoute de la QMP.

Le taux passe de 85% à 92% d'acceptation. Mais il ne semble pas rentable d'utiliser la QMP pour augmenter l'acceptation si on a déjà un bon taux de réussite sans QMP.

Il y a une variabilité énorme dans la quantité de phéromone produite en fonction de l'âge de la reine et du mode d'insémination (insémination artificielle ou fécondation naturelle). Une reine vierge produit moitié moins de phéromone qu'une reine fécondée.

Du point de vue qualitatif, il semble que les reines inséminées ne produisent pas le mélange complet de la phéromone ce qui expliquerait leur moins bonne acceptation.

Comment la phéromone est-elle dispersée dans la colonie?

Il reste encore beaucoup de questions sur le mode de dispersion de la QMP dans la colonie. Comment la phéromone parvient-elle aux abeilles qui ne sont pas en contact direct avec la reine? Bien que les sécrétions mandibulaires ne soient pas particulièrement volatiles, les ouvrières et les mâles de l'extérieur sont attirés par les reines et par les extraits de reines ou de phéromone royale ; les ouvrières sont attirées pendant l'essaimage et les mâles pour l'accouplement. Seules des odeurs en suspension dans l'air peuvent expliquer l'attraction. Il y a donc bien une transmission volatile de la phéromone.

On peut également envisager un mode de transmission par échanges de nourriture entre ouvrières et un mode de transmission entre la surface du corps et les ouvrières, particulièrement pendant les contacts d'antennes. Plusieurs faits font pencher en faveur du transport en surface plutôt que par la nourriture :

- de la phéromone marquée radioactivement fut trouvée se déplaçant sur des ouvrières immobilisées, d'une partie de leur corps vers une autre, aussi bien à l'extérieur qu'à l'intérieur, par translocation ;

- une partie du corps de l'abeille ou une autre surface qui a été en contact avec une reine devient attractif pour les ouvrières ;

- il y a des cellules olfactives spécifiques dans les antennes, spécialisées dans la perception de la phéromone ;

- le comportement des ouvrières de la cour de la reine renforce l'idée de transport en surface de la phéromone : quelques abeilles lèchent le corps de la reine et un très grand nombre d'abeilles touchent la reine avec leurs antennes. Fréquemment le bout de l'antenne est rapidement et légèrement brossé au dessus de la reine, parfois les antennes dans leur totalité sont remuées sur le corps de la reine dans une activité fébrile.

A la suite des contacts, les ouvrières nettoient leurs antennes avec leurs pattes antérieures, ce qui répand la phéromone. Les ouvrières qui ont eu des contacts avec la reine se déplacent dans la colonie et ont des contacts réciproques avec d'autres ouvrières à un rythme très élevé pendant quinze à trente minutes.

Les ouvrières qui lèchent la reine ou qui ont des contacts antennaires avec elles, exécutent ce genre d'activité entre le deuxième et le neuvième jour de leur existence, bien que les ouvrières de cet âge ne soient pas spécialisées en contact royaux, mais elles sont particulièrement attirées par les substance de la reine. On a proposé le nom d'abeilles messagères" pour ces ouvrières. Les phéromones sont distribuées sur le corps de la reine lors de son passage, prélevées par les contacts directs entre reine et ouvrières, puis transportées dans la colonie par ces abeilles messagères.

Environ 36% de la phéromone sécrétée par la reine sont réabsorbés dans le corps de la reine elle-même. on n'en connaît pas actuellement la raison. 56% de la phéromone sont prélevés par les abeilles qui redistribuent ensuite



la substance en se dispersant dans la colonie, soit par de frottements, soit par des attouchements antennaires ou par des contacts avec les autres abeilles. 7% de la phéromone sont dispersés et déposés en trace un peu partout dans la colonie (en particulier sur la cire) soit par la reine, soit par des abeilles qui l'ont léchée. Les abeilles de la colonie marchant sur le rayon prélèveront ensuite la phéromone royale par simples contacts et frottements. Ainsi, même si la reine bouge peu, la QMP est largement dispersée dans la colonie de façon permanente. En quinze minutes, les abeilles perçoivent l'absence de la reine.

La QMP qui se retrouve sur la cuticule de l'ouvrière après contact avec la reine disparaît progressivement : au bout de trente minutes, il n'y en a pratiquement plus. La phéromone est absorbée par la cuticule et dégradée comme s'il s'agissait d'un poison, sans doute par un mécanisme de désactivation enzymatique métabolisant les substances de la reine en formes inactives. Cette désactivation de la phéromone est très importante pour les fonctions de la colonie, puisqu'elle peut servir comme signal pour modifier le comportement des ouvrières en réaction aux changements de conditions de la colonie. Ce processus de dégradation de la phéromone se produit lorsque la reine et les ouvrières sont vivantes (dégradation enzymatique).

Lorsque la reine est morte, le processus de dégradation disparaît. La phéromone peut rester plusieurs mois sur le corps de la reine morte, ce qui explique qu'elle reste attractive pour les abeilles.

La phéromone dispersée en trace sur les rayons peut également garder son effet pendant des mois.

On a suivi la dispersion de la phéromone sur le corps d'une abeille venant de lécher la reine grâce à de la QMP marquée radioactivement. Après une minute : langue = 3200 unités radioactives, dans l'abdomen = 8700, sur l'abdomen = 6000 facilement dissociables de la cuticule et donc pouvant être redistribués aux autres abeilles par contact.

Après 30 minutes : dans l'intestin = 10000, sur l'abdomen = 8000 hautement associés à la cuticule qui ne peuvent plus être distribués.

### **la phéromone royale dans : l'élevage de reine, l'essaimage et autres applications**

La fonction la plus importante de la QMP dans le nid est d'empêcher l'élevage royal. L'essaimage est un cas particulier. Quand il y a perte de la reine, il y a un impact direct sur l'élevage royal : 8 à 10 heures après l'enlèvement de la reine, il y a transformation de cellules d'ouvrières en cellule royales avec un nourrissage accru en gelée royale pour produire de nouvelles reines. Quelle est la relation entre la présence de la reine et l'inhibition de l'élevage royal? Les expérimentations ont montré que c'était la phéromone des glandes mandibulaires de la reine (QMP) qui était impliquée.

M. Winston et ses collaborateurs ont réalisé une expérience avec trois groupes de colonies : un lot avec reine, un lot sans reine, un lot sans reine et avec de la QMP.

Il y avait environ 8000 ouvrières par colonies. Dans le 3ème lot, la phéromone était déposée 3 fois par jour sur une lamelle de verre placée dans la ruche. La quantité de QMP déposée dans une journée équivaut à la quantité de phéromone présente dans les glandes mandibulaires de la reine. Tous les deux jours et pendant dix jours, le nombre de cellules royales construites était contrôlé dans chaque lot.

Dans le lot sans reine, on observe six à huit cellules royales par colonie. L'élevage démarre dès les premiers jours. Dans le lot sans reine et avec QMP il n'y a pas d'élevage royal les premiers jours mais après le 4ème jour il y a quelques cellules royales. Il faut aussi noter qu'à partir du 4ème jour, il y a de moins en moins de jeunes larves dans la colonie.

Conclusions : la QMP est un composant majeur dans l'inhibition de la construction des cellules royales, d'autres facteurs doivent également intervenir, puisque après le 4ème jour on observe quand même la construction de quelques cellules royales.

Le couvain est un de ces facteurs qui interviennent dans la prévention de l'élevage royal. Une nouvelle expérience a consisté à ajouter du couvain jeune en plus de la QMP : colonies sans reine qui vont rester avec le couvain du début de l'expérimentation, idem et avec QMP, idem et avec QMP et couvain jeune tous les deux jours.

L'ajout de couvain jeune associé à la QMP diminue encore le nombre de cellules royales construites. En fait, c'est une symphonie d'odeurs qui règne dans la colonie et qui oriente l'activité des ouvrières.

Si on se contente de n'ajouter que du couvain, on obtient pratiquement le même résultats que sans QMP ; l'effet du couvain ne s'exprime que s'il y a présence de QMP. Il s'agit donc d'un effet synergique comme on en observe fréquemment chez les insectes.

### **élevage de reines**

Lorsqu'on réalise un élevage de reine, la phéromone de reine et les phéromones du couvain inhibent le démarrage des cellules royales, mais d'après les expériences, il serait favorable d'ajouter du couvain quand les cellules sont déjà en cours d'élevage. C'est au début de l'orphelinage que la phéromone s'exprime (premier et deuxième jours).

Dans un finisseur, il y a suffisamment de séparation physique pour éviter trop de diffusion de phéromone royale. Si on approche le cadre d'élevage de la grille à reine séparatrice, on obtient moins de cellules royales. Dans la méthode du greffage, le cadre d'élevage est introduit dans le finisseur à J+1. Les cellules royales sont déjà amorcées et l'effet de la phéromone est moins important.

Une apicultrice productrice de gelée royale a observé l'effet contraire : plus on rapproche le cadre de la grille à reine, plus il y a d'acceptations de cellules.

### **l'essaimage**

En présence de la reine il n'y a normalement pas de cellules royales. Pourquoi les colonies très fortes construisent-elles des cellules royales? Winston défend la théorie suivante : dans une colonie peu peuplée, le message chimique est facilement véhiculé entre toutes les abeilles qui se déplacent sans problèmes dans la colonie.

Dans une population très peuplée, il y a beaucoup moins de mobilité des abeilles, et la phéromone royale n'est pas distribuée de façon homogène.

Deux expériences ont été réalisées pour tester cette théorie. Dans la première expérience, on a donné de la place aux colonies et on a ajouté de la QMP dans la colonie. On a ainsi montré que la QMP peut éviter l'élevage royal. Dans la deuxième expérience, dans des colonies très congestionnées, même en ajoutant de la phéromone, on n'évite pas l'élevage de reine.

Première expérience : de ruches fortes avec reine, réparties en plusieurs lots, soit n'ont rien reçu, soit on reçu des quantités différentes de QMP. Les colonies étaient deux corps de ruches superposés pour qu'elles ne soient pas congestionnées. La QMP était ajoutée sur une lamelle de verre, trois fois par jour.

1er lot : (+10 équivalents reine par jour), il n'y a pas eu d'essaimage avant la fin juin. En moyenne, l'essaimage s'est produit 57 jours après le début de l'expérimentation, et surtout les colonies étaient incroyablement peuplées.

2ème lot : (+1 équivalent reine par jour de QMP), l'essaimage s'est produit en moyenne à 42 jours.

3ème lot : (ne recevant pas de phéromone), l'essaimage s'est produit assez tôt, en moyenne 32 jours après le début de l'expérimentation, ce qui correspond à ce qui se passe dans de conditions naturelles.

De cette expérience on peut conclure que la phéromone royale peut prévenir l'essaimage.

Dans une autre expérience, la phéromone était distribuée par pulvérisation, au lieu d'être déposée sur lame de verre. Les résultats ont été bien meilleurs pour la diffusion de la molécule. Seulement un équivalent reine par jour suffit pour obtenir un résultat positif (dans le lot témoin, on pulvérisait de l'eau).

Deuxième expérience : petites colonies peu peuplées et colonies commençant juste à devenir très peuplées.

De la phéromone marquée radioactivement est introduite dans les deux lots pour étudier la distribution de la phéromone royale dans les deux types de colonies et vérifier l'hypothèse selon laquelle dans les colonies populeuses elle serait mal diffusée alors que dans les colonies faiblement populeuses elle le serait mieux et plus rapidement. Quand le nombre d'abeilles augmente dans la colonie, les déplacements sont moindres et la phéromone est moins dispersée, ce qui provoque l'élevage royal et la processus d'essaimage.

L'utilisation de cette technique pour limiter l'essaimage oblige à faire une diffusion de la phéromone tous les jours, ce qui n'est pas pratique pour les apiculteurs. Mais des travaux sont en cours pour la mise au point d'un système pouvant relarguer la phéromone dans le temps (sur plusieurs mois) pour éviter les visites quotidiennes.

### **Utilisation de la phéromone royale dans l'apiculture**

Les apiculteurs d'Amérique du Nord peuvent trouver la QMP sous forme commerciale. C'est le produit Bee Boost, distribué par Phero Tech. inc..

### **Transport d'abeilles**

En Amérique du Nord, il y a une industrie très importante de paquets d'abeilles avec reine, qui sont expédiées partout dans le monde. La plupart des apiculteurs utilisent ces paquets d'abeilles pour démarrer de nouvelles colonies et ils ont donc besoin qu'il y ait une reine. Mais il y a des cas où on a juste besoin du paquet d'abeilles et pas de la reine. De tels paquets d'abeilles sans reine sont par exemple envoyés en Australie, en Nouvelle-Zélande, en Corée, en Arabie. En Arabie du sud et en Corée, les colonies sont renforcées pour la pollinisation, il n'y a pas besoin de reine. Chaque année, environ 250 000 paquets d'abeilles sont ainsi expédiés dans le monde. Le paquet d'abeilles sans reine de 1kg vaut 125 dollars canadiens.

Les producteurs de paquets d'abeilles ont demandé à Marc Winston un système permettant de relarguer la phéromone royale dans le paquet d'abeilles. Il a réalisé des simulations d'envois de paquets d'abeilles, certains avec reine, d'autres sans reine et avec de la QMP. Après 5 jours on n'observait pas de différence. On peut donc substituer la phéromone royale à la reine elle-même. Le prix d'un leurre est d'environ 2 dollars (ou moins encore par quantité), ce qui est nettement moins cher qu'une reine

### **Capture d'essaim**

Bee Boost placé sur des endroits accessibles augmente les chances d'attirer des essaims.

### **Fécondation de reine**

Bee Boost crée de concentrations de mâles pour la fécondation. Déposé sur un ballon ou sur une perche, il est attractif pour les mâles et pour les reines. Il permet de créer des lieux de fécondation sur des endroits voulus.

Dans les stations de fécondation, il augmente le succès des fécondations naturelles ; distribué dans les nuclei, il évite la désertion des ouvrières et augmente les chances de réussite.

Des expériences réalisées dans deux régions différentes (Manitoba et Colombie Britannique) ont montré que le nombre d'abeilles qui restait dans les nucléi après 2 ou 3 cycles de cellules royales était significativement plus élevé dans les nucléi recevant de la QMP que dans les nucléi non traités. Le pourcentage de reines fécondées était de 65% pour les nucléi non traités et de 80% pour le nucléi recevant de la QMP. La QMP en concentrant les abeilles dans le nucléus empêche les désertions et augmente le pourcentage de réussite des fécondations.

Si dans leur rucher de fécondation, les apiculteurs ont déjà des taux de réussite de 75% ou 80%, Bee Boost n'est pas nécessaire. Par contre, son emploi est recommandé dans les conditions plus difficiles (tôt ou tard dans la saison, vent...).

Les essais réalisés avec Bee Boost pour augmenter la prise de nourriture n'a pas donné de bons résultats ni avec le sirop ni avec la pâte complétée ni avec le pollen. La phéromone étant attractive, on pouvait penser qu'elle attirerait plus d'abeilles pour la prise de nourriture.

Marc Winston teste aussi les différents composants de la phéromone pour voir si les reines sont agressives vis à vis de ces mélanges. Il réalise également des expérimentations sur le comportement d'emballement des reines. Des quantités importantes de phéromone royale déposée sur une ouvrière provoquent son emballement quand elle est introduite parmi les abeilles, comme s'il s'agissait d'une véritable reine. Les acides de la phéromone sont plus importants dans ce comportement.

Marc Winston a comme projet d'étudier si la QMP a une influence sur le taux d'hormone juvénile dont on sait l'importance dans les comportements et la division des tâches au sein de la colonie.

---

## INFO-REINES N°48, AUTOMNE 99

### **PROGRAMME COMMUNAUTAIRE POUR L'APICULTURE : PROGRAMME 2000 CARACTÉRISATION DE LA TOLÉRANCE D'ABEILLES À *VARROA JACOBSONI* PROGRAMME DIRIGÉ PAR Y. LECONTE, AVEC M.E. COLIN, J.M. CRORNUET, M. SOLIGNAC.**

#### **Problématique**

L'apparition en France de colonies d'abeilles qui survivent aux *Varroas* en absence de traitements a été largement validée lors de nos dernières investigations. Ce phénomène apparaît de façon plus évidente chez les colonies d'abeilles abandonnées, où les colonies sauvages, mais il est aussi observé par des apiculteurs qui estiment les populations de *Varroa* de leurs colonies.

L'utilisation de colonies tolérantes aux *Varroas*, exemptes de traitements acaricides, constitue une voie privilégiée et particulièrement intéressante pour l'obtention d'un miel de qualité, dans un contexte de lutte intégrée contre la parasite. Plusieurs hypothèses, non exclusives, peuvent expliquer cette tolérance ; les abeilles peuvent développer des mécanismes de résistance au parasite, et/ou les *Varroas* deviennent moins pathogènes pour les abeilles. Ces deux hypothèses peuvent s'inscrire dans un contexte de co-évolution entre l'hôte et les parasites. Mais aussi l'environnement dans la colonie et à l'extérieur de celle-ci peut expliquer la limitation des populations de *Varroas*.

Des mécanismes de résistance des abeilles aux *Varroas* ont été mis en évidence à travers des études comparatives entre différentes races ou espèces d'abeilles. Les principaux facteurs de tolérance identifiés sont : la capacité des abeilles à détecter et à détruire le parasite situé sur des congénères ou dans le couvain operculé, la durée d'operculation des cellules, l'essaimage, l'inhibition de la reproduction des *Varroas* dans les cellules.

L'hypothèse que les *Varroas* puissent devenir moins virulents pour les abeilles est fondée d'une part sur la découverte récente de trois races de *Varroas* dans différentes parties du monde, donc sur la présence d'une variabilité génétique, et d'autre part sur l'identification de colonies d'abeilles tolérantes et contenant néanmoins de fortes populations de *Varroas*.

Des travaux ont également montré que la *Varroa* peut être associé à certains virus de l'abeille. La présence de *Varroa* dans les colonies d'abeilles pourrait soit déclencher l'expression de virus déjà présents à l'état endémiques chez les abeilles, soit participer à l'injection de ces virus lors de prises de nourriture.

Enfin, notion de co-évolution peut être avancée lorsqu'on compare des situations hôte-parasite différentes, notamment lorsque des populations de *Varroas* sont peu pathogènes à *Apis cerana*, mais très pathogènes à *Apis mellifera*, alors qu'à l'inverse d'autres populations de *Varroas* sont très pathogènes à *Apis cerana*, et peu à *Apis mellifera*.

L'environnement à l'extérieur de la colonie joue aussi un rôle dans la dynamique des populations de cet acarien.

Il a été clairement établi que le climat influence le développement des populations de *Varroas* ; les hivers rudes limitent la reproduction des parasites par manque de couvain. Les cultures traitées avec des pesticides sur lesquelles les abeilles peuvent aller butiner sont aussi une hypothèse pour expliquer la tolérance des abeilles : ces pesticides, en particulier l'amitraze ou les pyréthrinoides, pourraient limiter les populations de *Varroas*.

L'environnement à l'intérieur de la colonie intervient aussi sur les populations de *Varroas* .

La température et l'hygrométrie sont importantes pour le développement des formes immatures et la reproduction des adultes. En outre, il semble que la plupart des colonies recensées être tolérantes aux *Varroas* , soient abandonnées et que de nombreux essaims sauvages aient été identifiés.

La pratique apicole peut aussi être impliquée, en particulier le fait de changer régulièrement les vieilles cires. Nous voulons tester l'effet de l'âge des cires sur la dynamique des populations de *Varroas* . En effet, la taille des cellules, réduite dans les vieilles cires dans lesquelles se sont accumulées les cocons de nombreuses générations de larves, pourrait limiter l'espace nécessaire à l'organisation sociale et à la reproduction du parasite.

De plus, il semble que les *Varroas* se reproduisent moins dans les cellules dans lesquelles ces parasites se sont déjà reproduits. Il y aurait un marquage de la cellule en substance inhibitrice de la reproduction des parasites.

### **Objectifs de la recherche**

Identification des colonies, collecte et validation de la tolérance

Nous voulons poursuivre ce programme en cours. La mise en place d'un réseau de ruchers de colonies tolérantes nous permet actuellement d'observer ce phénomène sur plusieurs régions. Le suivi de ces colonies et de la dynamique des populations de *Varroas* sur plusieurs années nous permettra de valider cette tolérance. Ce travail se fait avec la collaboration d'organisations officielles.

La publication d'un questionnaire sur ce thème, au niveau de la France, pourra nous permettre d'apprécier l'étendue de ce phénomène et son évolution dans le temps.

### **Caractérisation de la tolérance**

D'ores et déjà nous disposons de colonies non traitées depuis plusieurs années sur lesquelles nous pouvons expérimenter. Nous voulons donc tester les différentes hypothèses qui puissent expliquer cette tolérance.

#### ***Etude des mécanismes de résistance de l'abeille aux parasites***

Nous développons des tests de comportements qui nous renseigneront sur les capacités des abeilles à reconnaître et à détruire les *Varroas* .

Ces tests seront couplés d'une étude d'électro-antennographie pour comparer les seuils de réponses des abeilles tolérantes aux odeurs des *Varroas* , comparativement aux abeilles non tolérantes. La mise en évidence d'une meilleure reconnaissance olfactive des abeilles tolérantes aux *Varroas* pourrait déboucher sur la mise au point d'une méthodologie de sélection des abeilles sur ce critère.

Le suivi de ces colonies nous permettra d'apprécier l'importance de l'essaimage dans la tolérance. Lors de l'essaimage, la colonie d'abeilles se scinde en deux parties dont chacune présentera une période d'absence de couvain préjudiciable à la dynamique des populations de *Varroas* .

L'effet d'essaimage sur la mortalité et la dynamique des populations de *Varroas* sera apprécié pour définir l'importance de ce phénomène dans la tolérance des abeilles.

La durée d'operculation des cellules de couvain est clairement impliquée dans la prolificité des *Varroas* . Une durée d'operculation courte limite la prolificité car les différents *Varroas* immatures ne disposent plus suffisamment de temps pour arriver à maturité. Ce facteur sera déterminé comparativement dans les colonies tolérantes et sensibles.

La reconnaissance et l'attractivité du couvain est essentielle pour le *Varroa* qui se reproduit dans la cellule operculée. Pour cela, il pénètre dans la cellule contenant une larve un à deux jours avant operculation par les ouvrières. Or, il existe des différences d'attractivité importantes en fonction des races d'abeilles.

Nos travaux, ainsi que ceux d'autres auteurs ont abouti à la caractérisation de kairomones produites par les larves et attractives pour les *Varroas*. Nous voulons donc quantifier ces molécules comparativement sur des larves de colonies tolérantes ou sensibles.

L'infertilité des *Varroas* a aussi été observé dans les colonies d'abeilles. Nous développons des expérimentations qui viseront à quantifier l'effet des facteurs environnementaux et des facteurs génétiques sur la fertilité des *Varroas*.

### ***Caractérisation des populations de Varroas en fonction de leur pouvoir pathogène pour les abeilles***

Les *Varroas* de l'abeille domestique semblent avoir été introduits à plusieurs reprises à partir de l'hôte initial. Plusieurs lignées de *Varroas* ont développé une résistance ou des changements de virulence au cours du temps.

En outre, compte tenu de leur mode de reproduction particulier, les populations parasites actuelles de notre pays d'Europe possèdent peut-être des structures clonales ou partiellement clonales.

La génétique, utilisant des marqueurs modernes d'étude comme les micro-satellites, peut considérablement aider à établir avec des précisions le mode de reproduction habituel, la structure des populations, la diversité des parasites, l'association entre des caractéristiques biologiques (résistance aux acaricides, cycle, agressivité et virulence) d'une part, et un profil génétique particulier d'autre part. Il devient ensuite très aisé, sans expérimentation, de réaliser les profils génétiques de nombreux individus pour assister les décisions de lutte.

Notre équipe a une bonne expérience de l'isolement des loci micro-satellites, puisqu'une trentaine d'espèces, dont certaines très difficiles, ont été analysées à ce jour et que près de 500 loci micro-satellites ont été préparés pour réaliser une carte génétique de l'abeille domestique.

Un test préliminaire a montré que le génome de *Varroa* contient d'assez nombreux micro-satellites et une dizaine sera suffisante pour les analyses envisagées. Ce test préliminaire était indispensable car, contrairement à ce que l'on a longtemps cru, ces séquences répétées ne sont pas universellement répandues. L'abondance de ces marqueurs est variable dans certains groupes (annélides, hyménoptères), dans d'autres (lépidoptères) la rareté est générale. Le faible nombre de micro-satellites isolés par M. Najaves sur son espèce modèle d'acarien nous a donc incité à la prudence mais nous pensons que l'expérience est jouable avec *Varroa* au prix d'un travail technique raisonnable.

Le travail consistera à préparer des micro-satellites de *Varroa*, à établir le mode de reproduction, la structure des populations et le profil génétique des parasites à l'échelle de notre pays, et si l'échantillonnage le permet, d'étendre l'étude à d'autres pays européens et aux populations d'origine et, en concertation avec les équipes s'occupant plus précisément de résistance et de virulence, aux souches contrastées du parasite.

Cet outil pourra aussi être développé pour caractériser l'apparition d'une co-évolution entre l'hôte et le parasite, dans la mesure où on aura déterminé des marqueurs de *Varroas* et qu'actuellement de nombreux marqueurs sont identifiés chez l'abeille.

### ***Importance des virus dans la tolérance***

Un des facteurs expliquant partiellement l'apparition de colonies tolérantes pourrait être en relation avec un affaiblissement du pouvoir pathogène du parasite.

Ce pouvoir pathogène repose sur l'action spoliatrice des protéines de l'hémolymph, sur la vexion et l'activation d'autres agents pathogènes pour l'abeille. L'action négative du parasite sur les défenses immunitaires de l'abeille ou bien l'injection de toxines dans le corps de l'abeille, n'ont pas été confirmées à ce jour.

Anderson (1998) a montré qu'il y a au moins deux écotypes de *Varroa jacobsoni*, voire même des sous-espèces ; l'un peu pathogène pour *Apis mellifera* car il a gardé ses caractères originels d'adaptation à *Apis cerana* (écotype de Nouvelle-Guinée) et l'autre adapté à *Apis mellifera* et menaçant sa survie. Il est donc possible qu'à l'intérieur de ces sous espèces, il y ait des souches plus pathogènes que d'autres.

Ces différences de pouvoir pathogènes pourraient être présentes au niveau de l'absorption et de la digestion des protéines. Tewartson et Jany (1982) ont mis en évidence la présence et l'activité de divers enzymes protéolytiques chez l'acarien, mais il n'ont pas poursuivi leur étude sur un plan épidémiologique.

La vection ou l'activation de virus peu pathogènes pour l'abeille a particulièrement été démontrée pour l'Acute Bee Paralysis Virus. L'augmentation de la prévalence pour d'autres viroses a aussi été reconnue (Ballet Allen, 1988).

Notre démarche sera donc d'évaluer globalement le pouvoir pathogène du parasite : par les caractéristiques de son ontogénèse et de son influence directe sur les développements larvaires et nymphal de l'abeille ; par des injections expérimentales de broyats de parasites totaux ou d'extraits parasitaires dans des larves ou nymphes d'abeilles élevées en conditions contrôlées. Les extraits parasitaires seront filtrés à  $0,25\mu$  et injectés à diverses concentrations de façon à caractériser soit la présence d'un agent infectieux porté par le parasite, soit la présence de toxines ou d'enzymes lytiques.

L'étape suivante consiste à identifier et isoler les éléments parasitaires à l'origine des variations du pouvoir pathogène (enzymes protéolytiques, toxines, virus).

A partir de cette connaissance, il sera plus facile de prévoir la dynamique de la population parasitaire dans la colonie et de mieux comprendre les mécanismes de tolérance des abeilles. Rien n'empêche d'émettre l'hypothèse que la résistance de l'abeille au parasite ne soit pas seulement due à des mécanismes comportementaux mais aussi à la mise en jeu de mécanismes de défense humoraux ou cellulaires (Dandeu et al., 1991).

#### ***Effet de l'environnement sur la tolérance des abeilles aux Varroas***

L'effet du climat sur le développement des colonies d'abeilles, et donc sur la dynamique des populations des *Varroas* pourra être quantifié et modélisé à partir d'observations de terrain réalisées dans différentes régions, sur la base de connaissances théoriques acquises à ce jour.

La taille des cellules de cire des colonies tolérantes sera comparée à celle de colonies sensibles. Puis l'effet de l'importance de l'espace libre dans la cellule pour la reproduction des *Varroas* sera testée sur des colonies infestées à l'aide de cadres contenant des cellules de tailles différentes. L'effet éventuel des vieilles cires sera comparé à celui de cires neuves.

Enfin, les cires de colonies tolérantes seront analysées pour détecter la présence d'acaricides éventuels.

#### **Réalisation**

Ce programme concernant la tolérance des abeilles aux *Varroas* comporte des aspects divers et complémentaires les uns aux autres. C'est pourquoi nous souhaitons développer des collaborations avec d'autres laboratoires comme les apiculteurs.

Le programme est prévu sur une durée de trois ans à partir d'août 1999, et sera développé au Laboratoire de Biologie et Protection de l'abeille, INRA d'Avignon, sous la responsabilité d'Yves Leconte, avec la collaboration de Marc-Edouard Colin et en partenariat avec la FNOSAD, l'ANERCEA, le CNDA et certains ADA.

Compte tenu de l'importance de ce programme en terme d'intérêt scientifique et appliqué et en terme de masse de travail, **nous souhaiterions le soutien d'une thèse d'Université pendant trois ans**, ainsi que d'un post-doc sur ce programme .

Les aspects de génétique moléculaire seront développés sous la responsabilité de J.M. Cornuet (directeur de recherche INRA) et de M. Solignac (professeur à l'Université d'Orsay), avec Maria Navajas (chercheur INRA), en collaboration avec l'INRA d'Avignon.

**LE COMPORTEMENT HYGIÉNIQUE DE L'ABEILLE ET LA TOLÉRANCE À VARROA  
MARLA SPIVAC, UNIVERSITÉ DU MINNESOTA U.S.A., DÉPARTEMENT D'ENTOMOLOGIE.**

**Le comportement hygiénique**

**Définition**

Le comportement de nettoyage ou comportement hygiénique est défini comme la capacité des abeilles à détecter et à éliminer du nid le couvain malade avant que le pathogène ne devienne infectieux. C'est un comportement bien spécifique, différent du comportement d'épouillage.

Intérêt : peut intervenir comme mécanisme de défense contre *Varroa jacobsoni* ; c'est un mécanisme de résistance contre la loque américaine et les mycoses ; il n'y a pas de contrepartie négative apparente, c'est à dire que sélectionner pour des abeilles nettoyeuses ne semble pas avoir des effets indésirables sur d'autres caractères.

Problèmes étudiés : à quel âge les abeilles manifestent elles ce comportement? quel est le répertoire comportemental de ce caractère?

Pour réaliser cette étude, des cadres de couvain operculés sont placés en incubateur pour obtenir des abeilles naissantes (moins de un jour). Elles sont brossées dans une cuvette entourée de vaseline pour qu'elles ne puissent pas remonter. Les abeilles reçoivent chacune une marque de peinture avec des couleurs différentes pour chaque jour ou bien une pastille de couleur numérotée pour être connues individuellement. Elles sont introduites dans des ruchettes d'observation où toutes les abeilles sont marquées.

**Détermination de l'âge des abeilles nettoyeuses**

Au départ 500 abeilles étaient marquées et introduites par jour, puis seulement 300 (pour cause de lassitude des étudiants marqueurs!). Au total 10 couleurs étaient utilisées et 248 abeilles marquées pour chaque couleur. On avait dans la colonie des abeilles de tous les âges.

	Désoperculation	Enlèvement de la nymphe	Butineuse
colonie 1	15,7	15,1	22,2
colonie 2	15,2	17	19,6

*Figure 1 : âge moyen des abeilles, en jours.*

**Ethogramme du comportement hygiénique**

Par exemple, voici l'observation de l'abeille RED 15 pendant 82 minutes : pendant 44% du temps elle se promène sur le rayon, pendant 2% elle est immobile, pendant 10% on l'a perdue de vue!, pendant 4% elle désopercule, pendant 9% elle enlève la nymphe, pendant 1% elle consomme la nymphe, pendant 27% elle fait la toilette, pendant 3% elle a la tête dans la cellule.

L'observation répétée sur 16 abeilles pendant 30 minutes montre que pendant environ la moitié du temps l'abeille ne fait pas grand chose (marche, immobile, tête dans la cellule...).

Sur 30 minutes, en moyenne, la fréquence et la durée des comportements intéressants est celle-ci :

- désoperculation : 9 fois sur 34 secondes

- consommation : 3 fois sur 77 secondes



- enlèvement de la nymphe 2 fois sur 39 secondes.

L'abeille manifeste un déficit d'attention, elle ne reste pas très longtemps à faire le même travail. Et pourtant le travail au sein de la colonie est bien réalisé mais il ne semble pas du tout organisé au niveau individuel. Pour tenter une comparaison avec l'homme, il y a certaines personnes qui laissent la vaisselle deux jours dans l'évier et d'autres qui n'attendent pas pour la faire! Les abeilles non hygiéniques laissent s'accumuler les pathogènes ce qui déclenche la maladie, les hygiéniques nettoient très vite. L'hypothèse qu'on peut faire pour expliquer le comportement hygiénique est que les abeilles qui le manifestent auraient un seuil de réponse plus bas au stimulus olfactif.

### **Le test d'électro-antennographie**

Par cette technique, on peut apprendre à l'abeille à produire une réponse réflexe de type Pavlovien (réflexe conditionné). On récompense l'abeille par l'ingestion de la goutte sucrée. Lorsqu'on envoie une odeur sur l'antenne et qu'on touche ensuite l'antenne avec l'eau sucrée puis qu'on y associe la récompense, l'abeille présentera ensuite le même comportement d'extension du proboscis si on ne lui présente que l'odeur! Il suffit d'un seul essai pour que l'abeille apprenne à associer l'odeur à la récompense. On peut faire le conditionnement inverse. Une autre odeur suivie de la présence d'eau salée sur l'antenne (très désagréable pour l'abeille) correspond à une punition et l'abeille garde les antennes en arrière et n'étend jamais la langue. On peut ainsi tester les réactions des abeilles à telle ou telle odeur et déterminer les seuils de détection. A l'odeur des mycoses, les abeilles hygiéniques répondent plus vite et réagissent à des concentrations plus faibles. Les tests réalisés montrent que les abeilles hygiéniques réagissent aux odeurs à partir d'un seuil jusqu'à cinq fois plus bas que les abeilles non hygiéniques.

Conclusions : les abeilles hygiéniques ont une réponse plus rapide à de très faibles stimuli olfactifs.

### **Comment les abeilles hygiéniques détectent-elles la nymphe parasitée par *Varroa* ?**

Les hypothèses sont : un signal chimique ; un signal mécanique ; une production de chaleur différente.

En utilisant le même test électro-antennographique, on montre qu'il n'y a pas de différence dans les réactions de l'abeille entre une odeur de *Varroa* et une odeur de nymphe d'abeille. Par contre une abeille peut discriminer une odeur de nymphe saine de celle d'une nymphe parasitée sans que *Varroa* soit présent. Marla Spivak pense que les abeilles peuvent détecter le site de nutrition du *Varroa* sur la nymphe. Des expériences de neurobiologie ont montré que le comportement hygiénique semblait lié au taux d'octopamine dans le cerveau de l'abeille. Les abeilles hygiéniques ayant un taux plus élevé.

Le comportement hygiénique se décompose en deux phases : la désoperculation et l'enlèvement de la nymphe. Certaines colonies désoperculent très vite mais sont très longues à sortir les larves (constaté par le test du couvain congelé). Lorsque les abeilles deviennent butineuses et qu'il y a miellée, elles continuent à nettoyer les cellules parce qu'elles ont besoin de place pour stocker le miel, mais, en l'absence de miellée, elles peuvent abandonner le nettoyage de cellules. Il faut répéter le test plusieurs fois, en présence et en absence de miellée. Si la colonie est vraiment hygiénique, elle le sera toujours quel que soient les conditions de miellée.

Marla Spivak a réalisé ce travail en collaboration avec R. Mastermen, K.A. Mesce, B.H. Smith.

### **LA SÉLECTION SUR LE COMPORTEMENT HYGIÉNIQUE PERMET-ELLE UNE MEILLEURE TOLÉRANCE À *VARROA* ?**

On a deux manières de lutter contre l'invasion de *Varroas* : limiter la survie des *Varroas* sur les abeilles adultes ; limiter la reproduction du *Varroa* sur le couvain.

Quels caractères peuvent être retenus pour sélectionner des abeilles plus tolérantes à *Varroa*? L'épouillage et les morsures entraînant des mutilations de *Varroa*, la fécondité limitée des fondatrices *Varroa* ou le comportement hygiénique?

La survie de *Varroa* sur l'abeille adulte peut être limitée par le comportement d'épouillage et d'agression des *Varroas* mais il n'y a que l'abeille cerana qui agit ainsi. Pour limiter la reproduction de *Varroa* dans le couvain,

on peut, par exemple, sélectionner des abeilles sur une plus courte durée d'operculation, mais cela aboutira à une contre sélection du *Varroa* qui se reproduira plus vite. Pour éviter la contre sélection du *Varroa*, il faut un comportement d'élimination du *Varroa* dans le couvain. Marla Spivak a donc axé ses recherches sur la résistance des abeilles aux maladies car l'abeille est en contact avec elles depuis des millions d'années et elle a appris à lutter seule, indépendamment de l'homme et des traitements chimiques. Marla veut renforcer le mécanisme de défense naturelle de l'abeille contre les maladies et les parasites. Elle veut identifier les mécanismes génétiques de résistance, les maintenir et distribuer des lignées d'abeilles résistantes. La tolérance à *Varroa* est très certainement plurifactorielle. Le comportement hygiénique est un des mécanismes importants de résistance aux loques et aux mycoses, qui peut se décomposer en trois phases : la détection de la cellule malade par l'abeille ; la désoperculation de la cellule (uncapping) ; l'enlèvement de la larve malade (removing).

Les travaux de Butler avaient fait penser qu'il y avait un gène récessif pour la désoperculation et un autre pour l'enlèvement de la larve, mais vraisemblablement, un plus grand nombre de gènes serait impliqué. Il arrive que la fondatrice puisse s'échapper de la cellule désoperculée lorsque l'enlèvement de la larve ne se fait pas assez vite, mais ses capacités de reproduction sont réduites et de toutes façons les immatures sont détruits par les abeilles.

### Expérimentation des abeilles hygiéniques en condition de production

L'expérience a été suivie chez un apiculteur du Wisconsin. Un élevage a été réalisé à partir de lignées hygiéniques d'une part et de lignées commerciales "tout venant" d'autre part. La fécondation a été naturelle et s'est déroulée au même endroit pour les deux lots.

Quatre ruchers ont été utilisés. Les ruches étaient disposées sur palette. Sur chacune se trouvaient deux colonies hygiéniques et deux colonies commerciales. En tout 50 colonies de chaque lot étaient testées.

En 1996, les abeilles hygiéniques ont produit significativement plus de miel que les commerciales dans les quatre ruchers.

En 1997, selon le même protocole, les hygiéniques ont été comparées aux Starline, réputées être parmi les meilleures abeilles aux Etats-Unis. Les hygiéniques ont produit légèrement plus de miel mais pas de façon significative. Les colonies hygiéniques proviennent en fait de colonies sélectionnées qui ont été très bonnes sur l'ensemble des caractères et sur lesquelles on a ensuite effectué le test du couvain congelé pour ne retenir que celles ayant un bon comportement hygiénique. Ceci explique leur performance en production de miel et montre qu'il n'y a pas de corrélation négative entre le comportement de nettoyage et la production. La sélection de ce caractère ne se fait pas au prix d'une baisse sur d'autres caractères du moment qu'on travaille sur de bonnes colonies.

### Les maladies du couvain

	1996		1997	
	hygiéniques	commerciales	hygiéniques	Starline
AFB (loque américaine)	0%	13%	0%	6%
Chalk brood (mycose)	47%	89%	30%	63%

#### *Pourcentage de colonies avec des symptômes de maladies*

Les abeilles hygiéniques n'ont présenté aucun cas de loque américaine. Un nombre important présentait des mycoses mais la quantité de momies dans les colonies hygiéniques était beaucoup moins importante que chez les commerciales ou les Starline.

### Degré d'infestation par *Varroa*

En 1996, l'infestation était faible et les hygiéniques moins infestées que les commerciales.

En 1997, l'infestation a été beaucoup plus forte avec beaucoup de *Varroas* sur les adultes. Il y avait des différences d'infestation entre les ruchers (de faible à très forte) ; les quatre ruchers étant à environ 5 km d'intervalle les uns des autres.

## Résultats

les abeilles n'ont pas été traitées pendant un an et demi. Les différences d'infestation ont été significatives entre Starline et abeilles hygiéniques, celles-ci gardant des taux d'infestation plus bas.

	nombre de colonies	% de cellules infestées	% de cellules contenant plus d'une fondatrice
hygiéniques	11	15,7%	6,6%
Starline	11	32,2%	20,2%

### *Septembre 1997, infestation du couvain.*

En 1998, les infestations sont devenues trop fortes et à peu près toutes les colonies sont mortes. L'année prochaine, un nouvel essai sera mis en place en incluant un seul traitement à l'acide formique pour diminuer l'infestation et permettre au comportement hygiénique de jouer son rôle dans la limitation des populations de *Varroas*.

## Conclusions

Les colonies hygiéniques résistent plus efficacement aux maladies du couvain et à la varroase que les abeilles non hygiéniques.

Les transhumances égalisent les maladies et les infestations.

A haut niveau d'infestation, les colonies hygiéniques peuvent éventuellement succomber.

### **Test du comportement hygiénique par l'inoculation de la loque américaine dans la colonie**

Des morceaux de cadres de couvain très contaminés par la loque américaine sont découpés et introduit au centre d'un cadre de couvain dans les colonies testées.

Test 1998

26 juin : inoculation de la loque par introduction de couvain malade.

6 août : nombre de colonies infestées chez les hygiéniques = 5/10 soit 50% dont 4 très légèrement et nombre de colonies infestées chez les non hygiéniques = 9/9 soit 100%.

Test 1999

	hygiéniques reines inséminées	non hygiéniques
12 juin	0	0
-	1	5
-	4	9
-	2	9
-	1	9
13 août	0	8

### *Nombre de colonies infestées*

La loque a provoqué des supercédures, ce qui a aidé à la guérison par l'absence de couvain ouvert. Les résultats parlent d'eux-mêmes. Les abeilles hygiéniques ne laissent pas le temps à la maladie de se déclencher.

#### **Test de nettoyage du couvain congelé par l'azote liquide**

Dans les populations d'abeilles commerciales américaines, le comportement hygiénique est présent à un faible pourcentage : environ 10% des colonies développent ce comportement. La question est donc comment augmenter la fréquence de ce caractère dans l'ensemble de la population.

Pour tester une colonie sur son comportement hygiénique, une portion de couvain operculé sur une face d'un cadre est congelé par l'azote liquide.

Le contrôle est effectué au bout de 48 heures.

Si la colonie a un comportement hygiénique, il faut répéter le test une deuxième fois. Si, la deuxième fois, il n'y a que la moitié de cellules qui sont nettoyées, il ne faut pas utiliser cette colonie pour l'élevage.

En période de miellée toutes les colonies ont tendance à être hygiéniques, parce qu'elles libèrent des cellules pour le stockage du nectar. Sans miellée, seules les colonies vraiment hygiéniques manifesteront le comportement.

Les colonies très hygiéniques ne font pas de différence dans l'âge des nymphes mortes, elles les éliminent toutes très vite tandis que les colonies non hygiéniques mettent plus de temps pour éliminer les nymphes âgées que les jeunes.

L'état du couvain (ouvert ou fermé) sur l'autre face du cadre ne semble pas avoir de conséquences sur l'expression du comportement de nettoyage.

Ce comportement n'est pas une loi de tout ou rien, il y a des degrés dans son expression et il ne faut retenir que les colonies qui éliminent 95 à 100% du couvain mort dans les 48 heures.

Marla Spivak cite le travail de Suzan Cobey qui travaille avec l'abeille carolinienne. Au départ, ses colonies ne nettoyaient au mieux que 80 à 85% des cellules en 48 heures. Actuellement, elle arrive à des taux de 99 à 100% avec les abeilles sélectionnées pour ce caractère.

Ce caractère a une bonne hérédité, bien que l'estimation de cette hérédité soit très variable selon les auteurs. Il peut donc facilement être sélectionné.

Une autre méthode pour tester le comportement de nettoyage est de percer les cellules de couvain avec une aiguille.

	couvain congelé	couvain piqué avec une aiguille
couvain éliminé au bout de 24 heures	50%	100%

Le test est plus fiable avec le couvain congelé mais plus rapide avec l'aiguille. Il faut regarder le résultat au bout de 24h, à 48h ce test n'est plus significatif pour distinguer les colonies hygiéniques. Avec l'aiguille on tue la nymphe et elle saigne : le signal est plus fort que dans le cas de la nymphe congelée.

#### **Les possibilités de l'élevage pour obtenir des abeilles plus tolérantes à *Varroa***

Espérer sélectionner des abeilles qui vivront sans aucun traitement est irréaliste.

La sélection d'abeilles qui nécessitent moins de traitements est tout à fait possible.

La lutte intégrée contre *Varroa* est un objectif réalisable. On ne traite que lorsque l'infestation est trop élevée.

Marla Spivak a sélectionné ses souches à partir de très nombreuses reines de provenances diverses. Elle gère actuellement environ une dizaine de lignées différentes.

Le plus important dans le test est de vérifier sa répétabilité. Il faut recommencer le test à quelques jours d'intervalle et si possible hors miellée. Il faut vérifier le comportement hygiénique à plusieurs périodes, mais on sait maintenant que le sperme des différents mâles qui ont fécondé la reine est très rapidement mélangé dans la spermathèque (confirmé par les travaux génétiques de Cornuet).

#### *Recherche de Varroas mutilés*

Il n'y a pas de corrélation avec le comportement hygiénique. Il y a des colonies hygiéniques qui ne mutilent pas les *Varroas* et des non hygiéniques qui les mutilent. Il s'agit donc d'un autre comportement dont le déterminisme génétique est tout à fait différent.

N'élevez jamais de reines à partir d'une colonie qui a eu des mycoses.

En insémination, on ne peut pas affirmer que les mâles qui produisent le plus de sperme sont les meilleurs. H. Renson, interrogé, pense la même chose : c'est seulement le signe de leur bonne santé. Il précise qu'on peut réaliser des inséminations à partir de mâles d'ouvrières pondueuses. Ils sont plus petits, il en faut donc plus, mais on n'observe pas de conséquences sur la reine en ponte. Marla Spivak indique qu'un éleveur américain utilise cette méthode parce qu'elle lui permet d'obtenir plus de variabilité génétique.

Les souches hygiéniques développées par Marla Spivak sont exploitées commercialement par un éleveur californien de San Diego.