



Santé des reines

Marc E. COLIN et Laurent GAUTHIER
Laboratoire de Pathovigilance
ENSAM Montpellier. Tél.: 04 67 14 45 09
colinme@ensam.inra.fr
gauthier@univ-montp2.fr

La qualité des reines produites dans les élevages est une notion fondamentale pour la bonne gestion d'une exploitation apicole. C'est une condition nécessaire à l'obtention de récoltes abondantes. La baisse de performance d'une reine se manifeste de différentes manières. Elle peut se traduire par exemple par un remérage précoce, par une ponte irrégulière en cours de saison, par une incapacité à reprendre la ponte au printemps ou encore par un faible « dynamisme » de la colonie, accompagné ou non de symptômes de maladie. Cette appréciation globale au niveau de la colonie, si importante pour la future récolte ou la pérennité des efforts de sélection, est fondée sur la seule expérience de l'apiculteur, sans aucune consultation de paramètres objectivement mesurables. De plus, elle ne donne aucun éclairage sur les causes associées à la baisse de performance des reines, car celles-ci peuvent être de nature technique, génétique, pathologique ou environnementale, sachant aussi qu'elles peuvent interagir. Dans cet article, nous livrerons quelques éléments de réflexion aux apiculteurs soucieux de produire des reines performantes. Nos propos sont basés sur les publications scientifiques et techniques que nous avons consultées, ainsi que sur les premiers résultats obtenus à Montpellier par notre équipe de recherches.



Marc E. Colin



Laurent Gauthier

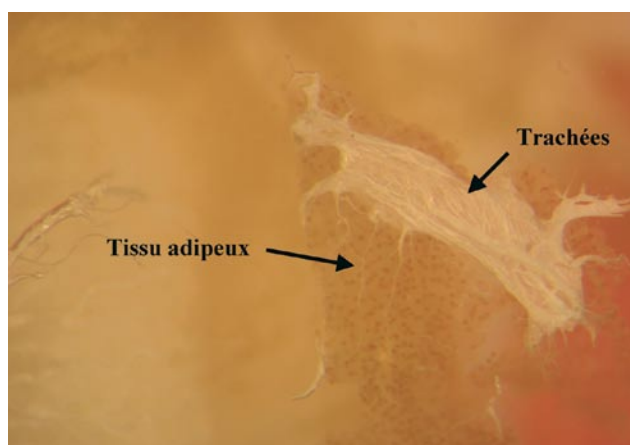
1. RAPPELS DE BIOLOGIE DE LA REPRODUCTION CHEZ L'ABEILLE DOMESTIQUE *APIS MELLIFERA* L.

A l'instar des sociétés humaines, la division du travail et la spécialisation qu'elle impose sont de règle chez les insectes sociaux comme *Apis mellifera* (*7). Les tâches nécessaires à la reproduction des individus constituant la colonie sont confiées à certains types spécialisés (castes) : la reine et les mâles (ou faux-bourçons). Les tâches relatives au soin du couvain et à la recherche de nourriture (butinage) sont confiées aux ouvrières. Rappelons que reines et ouvrières ont la même origine, leur différenciation étant liée à la qualité de leur alimentation durant les premiers jours de la vie larvaire. Les mâles quant à eux résultent de la production d'œufs non fécondés et sont par conséquent haploïdes.

Biologie de la reine

Seule femelle de la ruche à assurer la ponte, son alimentation doit compenser des besoins spécifiques en énergie et en nutriments. Ces besoins sont considérables lorsque la ponte atteint 2000 œufs par jour à certaines périodes de l'année. C'est alors son propre poids qu'elle pond en l'espace de 24 heures (chaque œuf pesant en moyenne 0,13 mg). Les œufs contiennent les réserves nécessaires au développement de l'embryon (protéines, graisses, sucres, minéraux, vitamines...). Les constituants élémentaires de ces réserves proviennent de l'intestin moyen et sont assemblés en molécules spécifiques dans le tissu adipeux, organe principal de synthèse et de stockage des

Fig.1 Fragment de tissu adipeux de la reine observé après dissection. On note la présence du système de trachées associé (en blanc) qui permet les échanges gazeux (sorte de système de ventilation).





protéines, des glucides et des lipides chez l'insecte. A partir de ce tissu, ils sont transportés par l'hémolymphe (le sang de l'abeille) jusqu'aux cellules spécialisées de l'ovaire. Ce tissu adipeux, constitué de deux couches de cellules, baigne directement dans l'hémolymphe et enveloppe étroitement l'ovaire, ce qui diminue le temps de transport hémolymphe des réserves destinées aux oeufs. (Fig.1)

Les œufs sont formés dans les ovaires, deux masses blanches occupant la majeure partie de la cavité abdominale de la reine fécondée. Chaque ovaire est constitué d'environ 150 à 180 ovarioles, sortes de tubes fermés à une extrémité ; de l'autre extrémité émergent les œufs. Près de l'extrémité fermée, on distingue les cellules germinatives en division et des cellules spécialisées qui assurent le remplissage en réserves des futurs œufs tout au long de leur progression dans l'ovariole. Arrivés à l'autre extrémité de l'ovariole, les œufs maintenant formés débouchent dans le calice de l'oviducte puis transitent à travers le vagin pour être déposés au fond de l'alvéole. Au passage, il reçoit une petite quantité du volume de la spermathèque, ce qui assure leur fécondation. (Fig.2-3-4)

Pendant les trois jours après la ponte, les réserves de l'oeuf sont utilisées lors des nombreuses divisions cellulaires nécessaires à la création de l'embryon. Dès les premières heures après éclosion, la jeune larve a besoin d'être alimentée. Ce sont les jeunes abeilles nourrices qui sécrètent la gelée royale des premiers repas larvaires.

Outre son rôle de pondreuse, la reine assure une grande partie de la cohésion sociale indispensable à une reproduction en harmonie avec l'environnement. En particulier, elle produit des substances nommées phéromones royales qui inhibent l'élevage de reines (essaimage ou supersédure).

Fig.4 Spermathèque in situ. Lors de la ponte, les oocytes sont fécondés par les spermatozoïdes stockés dans la spermathèque (organe de la taille d'une tête d'épingle). On note la présence de trachées en surface de celle-ci ainsi que la présence de glandes produisant les substances de conservation des spermatozoïdes.

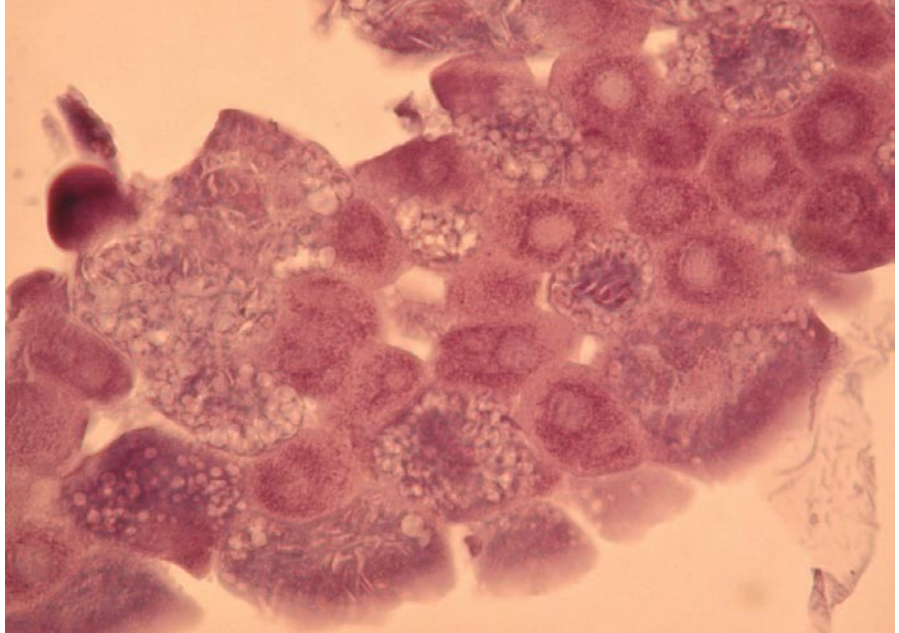


Fig.2 Le tissu adipeux est composé de cellules nourricières et de cellules de stockage.

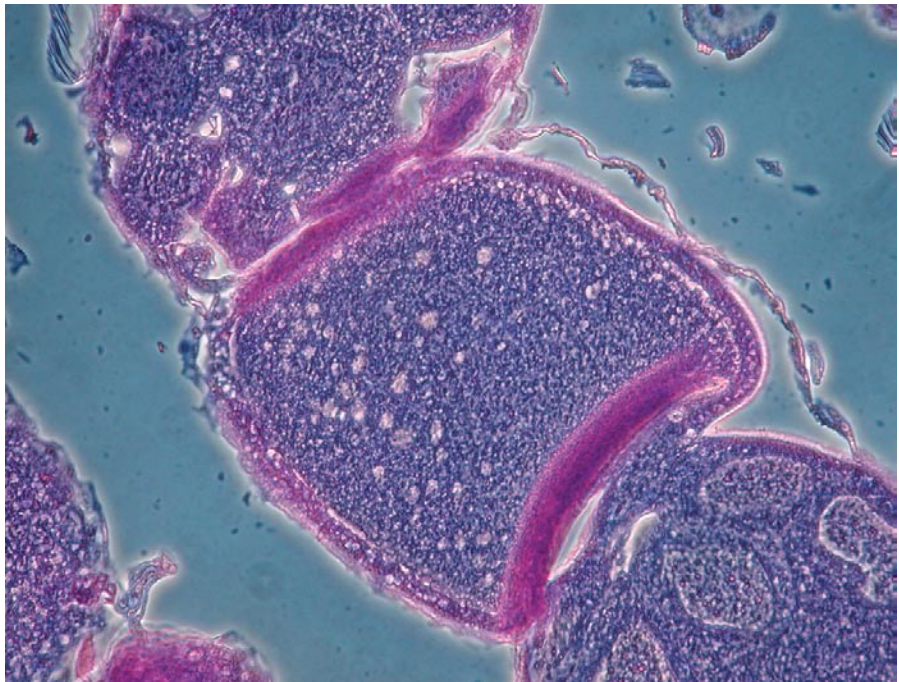
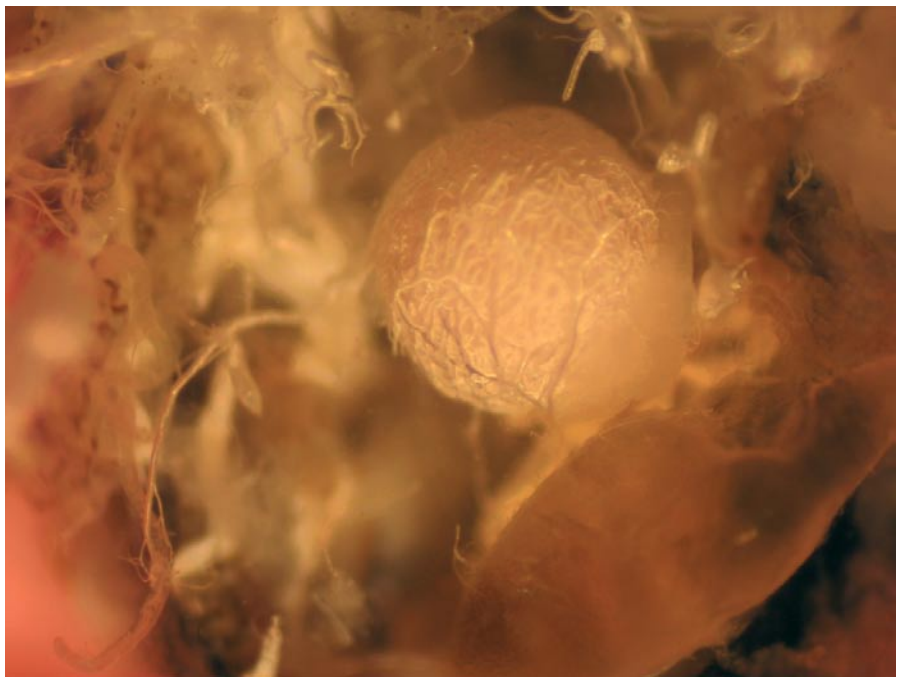


Fig.3 Œuf en formation (au milieu) accompagné des cellules nourricières.





Biologie du mâle.

L'appareil reproducteur du mâle a une structure très complexe. Schématiquement, on peut le résumer en un organe pair produisant les spermatozoïdes formé par les testicules et un organe impair servant à la transmission mécanique des spermatozoïdes vers la reine ou organe copulateur (endophallus). Entre les deux se trouvent les vésicules séminales, organes essentiellement de stockage et de maturation des spermatozoïdes. Par opposition avec la reine, notons que le tissu adipeux du mâle est très réduit.

A l'émergence, les testicules du mâle apparaissent comme deux énormes masses blanches emplissant la cavité abdominale. Ensuite, leur taille se réduit progressivement jusqu'au 13-14^e jour après émergence tandis que les spermatozoïdes formés dans les tubes séminifères migrent au fur et à mesure de leur production vers la vésicule séminale.

Lors de l'accouplement, la vésicule séminale se contracte et fait passer les spermatozoïdes dans le canal déférent de l'endophallus. La masse des spermatozoïdes est suivie par un flux de mucus provenant de deux glandes abdominales volumineuses. Seuls les spermatozoïdes atteignent la spermathèque de la reine alors que le mucus est rejeté hors des voies génitales de cette dernière. (Fig.4-5-6)

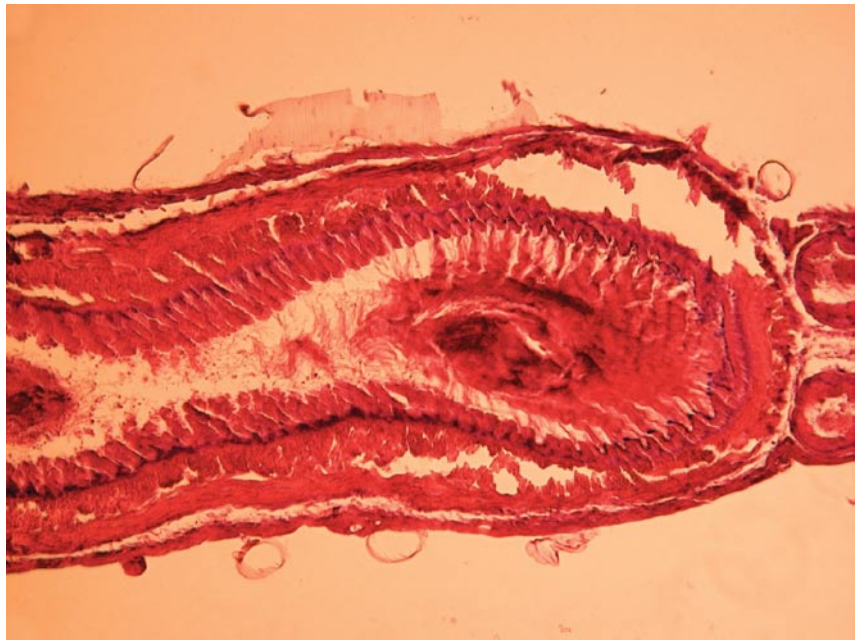


Fig.4 Vésicule séminale observée en coupe. On distingue à l'intérieur les spermatozoïdes alignés dont les têtes sont fichées dans la muqueuse nourricière. La vésicule séminale est entourée de deux couches musculaires qui se contractent lors de l'éjaculation.

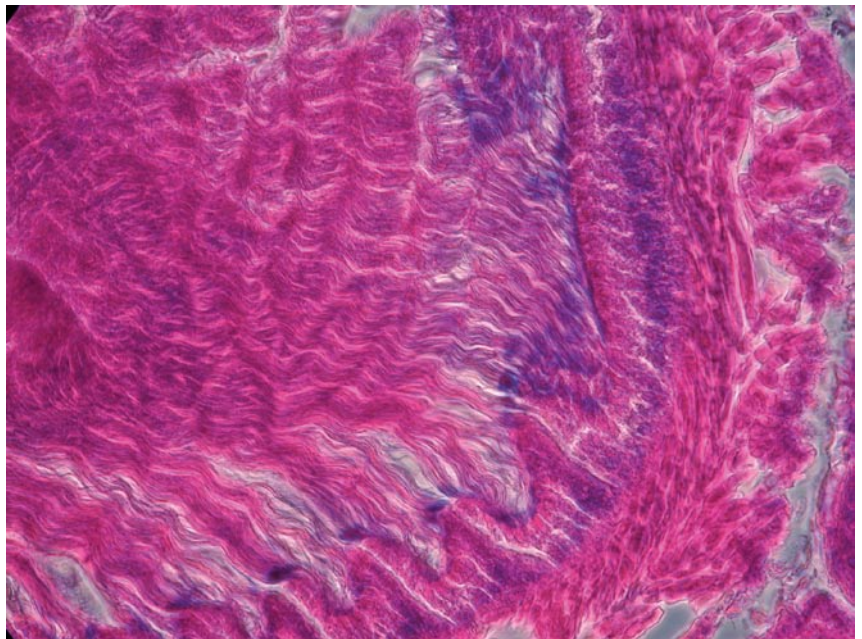


Fig.5 Détail de la muqueuse nourricière. Les têtes des spermatozoïdes sont colorées en bleu.



Fig.6 Détail de spermatozoïdes observés en fluorescence. Les longs flagelles permettent aux spermatozoïdes de se déplacer.

2. PROBLÈMES OBSERVÉS SUR LE TERRAIN

De la jeune larve fraîchement éclos à la femelle pondant 2000 œufs par jour, la reine passe par plusieurs étapes cruciales. Nous en distinguons trois :

L'élevage royal

Sans revenir en détail sur les techniques d'élevage bien documentées dans la littérature apicole, nous soulignerons l'importance de l'alimentation des nourrices qui vont produire les futures reines. Les nourrices sont de jeunes ouvrières dont la

fonction est d'élever les larves à partir de la gelée royale produite par leurs glandes hypopharyngiennes. Les deux glandes, situées dans la tête, sont composées d'un chapelet de plusieurs centaines d'unités nommées acini. Chacune de ces unités synthétise la gelée qui est ensuite collectée dans un canal central s'ouvrant dans la partie inférieure du pharynx, ce qui évoque la production de lait chez les mammifères. L'accroissement de taille de ces unités chez les jeunes abeilles est



stimulée par la consommation de pain d'abeille. Par la suite, lorsque l'ouvrière prend ses fonctions de butineuse, ces glandes régressent et se spécialisent alors pour la production d'enzymes qui vont servir à la maturation du miel. Une autre fonction des abeilles éleveuses est de maintenir en permanence les conditions de température et d'hygrométrie au niveau optimal autour de chaque cellule royale.



Fig.7 Avortement de cellules royales en cours d'élevage (cause indéterminée).

Il est indispensable que l'éleveur sélectionne et prépare les colonies qui serviront à l'élevage :

- pour avoir un nombre suffisant de bonnes nourrices. En effet, les glandes hypopharyngiennes des nourrices peuvent être atrophiées, ou encore la durée de vie des nourrices peut être abrégée.
- pour éviter les carences alimentaires pouvant nuire à la qualité des nourrices. Ces colonies devront être correctement approvisionnées en pollen et en nectar depuis le début de la saison. Elles devront être indemnes de varroose et de résidus d'acaricides et d'insecticides. Par son action parasitaire, *Varroa* peut en effet « réveiller » des infections virales chez l'abeille, comme celle due au virus de la cellule royale noire (BQCV). (Fig.7)

La fécondation

Une bonne fécondation assure d'une part le remplissage de la spermathèque par les spermatozoïdes et d'autre part une diversité génétique maximale dans les conditions naturelles. Ce dernier point est assuré par la polyandrie, mécanisme qui permet à la reine de se faire féconder par plusieurs mâles. Chaque mâle produit en moyenne plus de 7 millions de spermatozoïdes (en fait, ce nombre varie entre 0,5 et 10 millions). Lors de l'accouplement, les spermatozoïdes déposés dans la cavité vaginale de la reine migrent vers la spermathèque pour y être stockés pendant plusieurs années. La reine va donc y puiser les spermatozoïdes nécessaires à la fécondation des œufs d'ouvrières. Une spermathèque pleine contient environ 7 millions de spermatozoïdes tandis que la reine est fécondée par une douzaine de mâles. En fait, les spermatozoïdes issus des différents mâles sont stockés temporairement dans les oviductes latéraux où ils sont brassés sous l'effet des contractions musculaires produites par la paroi de l'oviducte. Une

partie seulement de ce mélange de spermatozoïdes est aspirée vers la spermathèque.

Le maintien d'une activité de reproduction équilibrée et harmonieuse

Dans la colonie, les différentes castes ont des espérances de vie très variables. On considère qu'une reine d'abeille vit de 1 à 5 ans tandis qu'une butineuse d'été ne vit pas beaucoup plus de trois semaines après émergence. Au contraire, les ouvrières destinées à l'hivernage de la colonie (abeilles d'hiver) subissent des changements physiologiques profonds et vivent plusieurs mois (6 à 8 mois d'après Maurizio, 1950) (*4). A titre de comparaison, les reines de certaines espèces de fourmis et termites peuvent vivre plus de vingt ans. Du fait de sa longévité importante par rapport aux butineuses, la reine est beaucoup plus exposée à l'impact de facteurs négatifs présents dans l'environnement comme les « microbes » et les toxiques.

La survie de la colonie dépend en premier lieu du volume de la ponte de la reine, celui-ci devant rester en harmonie avec l'environnement (météorologie, végétation, pollutions...). La ponte se réduit quand l'approvisionnement de la colonie est insuffisant ou absent (hivernage ou sécheresse estivale par exemple) et elle s'accroît en fonction des pollinées et des miellées.

En deuxième lieu, la survie de la colonie dépend du potentiel contenu dans le génome de la reine et en particulier de sa diversité, permettant de faire face à des changements environnementaux profonds. Un récent travail vient de montrer que les larves destinées à l'élevage des cellules royales de sauveté ne sont pas choisies au hasard par les ouvrières mais correspondent au contraire à des sous-familles minoritaires dans la colonie (*5). Il s'agit de l'« éléction » d'un génotype rare permettant d'éviter trop de consanguinité.

3. LES CAUSES

Avant d'envisager les causes pouvant affecter les performances d'une reine, il convient de signaler que d'importantes modifications se déroulent normalement chez la reine adulte. Par exemple, l'appareil venimeux n'est fonctionnel que pendant les premiers mois de la vie de la reine. Sa régression se caractérise par la dégénérescence du sac à venin et des glandes productrices. D'autres modifications s'expliquent par un vieillissement rapide de certains tissus : la valvule vaginale perd sa mobilité par calcification des muscles, les ovarioles sont envahis d'une substance liquide jaune à leur extrémité ouverte, les tubes de Malpighi se chargent de pigments... Il est important de souligner que la reine possède un métabolisme très élevé lorsqu'elle pond, ce qui produit une grande quantité de déchets, et que seulement une partie des déchets issus de ce métabolisme est rejetée à l'extérieur. Les causes d'affaiblissement de la reine sont classées en infectieuses (dues à la multiplication d'un « microbe ») et non infectieuses. Parmi ces dernières, nous ne retiendrons que les malformations ou causes mécaniques et les intoxications d'origine agricole.

Malformations et perturbations physiologiques

Certaines de ces affections proviennent d'une insuffisance d'alimentation larvaire ou d'un mauvais maintien de la température de l'alvéole royale. Les reines naines sont le résultat d'une carence alimentaire. Certaines reines naissent avec les ailes atrophiées mais le parasite *Varroa* n'en est pas la cause car ces cas ont été cités bien avant son apparition en Europe. Les malformations alaires sont attribuées à un refroidissement de l'alvéole royale vraisemblablement au moment de la dernière mue. D'autres malformations ont été signalées au niveau des griffes (*1).



Au cours de la nymphose, certains éléments de l'appareil génital de la reine ne se développent pas et coexistent avec des parties normales. Ainsi, on observe parfois un ovaire ou un oviducte atrophié et donc non fonctionnel.

Des complications lors de l'accouplement entraînent aussi une stérilité totale due à l'accumulation de mucus ou à la persistance du phallus dans les voies génitales de la jeune reine. (Fig.8)

La stérilité la plus fréquente n'est que partielle, c'est celle que l'apiculteur évoque sous le terme de « reine bourdonneuse ». Physiologiquement, elle se définit par une altération du nombre d'œufs fécondés par rapport aux œufs non fécondés. Dans certains de ces cas, les ouvrières se mettent à pondre des œufs (non fécondés). Les causes provoquant l'apparition de reines bourdonneuses sont très variées. Parmi celles-ci, nous avons relevé

au laboratoire plusieurs cas de reines fécondées dont la spermathèque contenait anormalement peu de spermatozoïdes. D'après Vesely en 1970, les échecs de ponte ou d'acceptation seraient parfois causés par la rétention de sperme dans les oviductes latéraux. Une étude australienne a noté ce phénomène dans 11,5 % des reines étudiées (*6).

La présence d'un fort pourcentage de spermatozoïdes morts dans la spermathèque, l'épuisement des réserves de spermatozoïdes des reines âgées conduisent aussi au syndrome de « reine bourdonneuse ». Cependant, d'après les travaux de Fyg (*1), beaucoup de causes auraient pour origine une infection de l'appareil génital. (Fig.9)

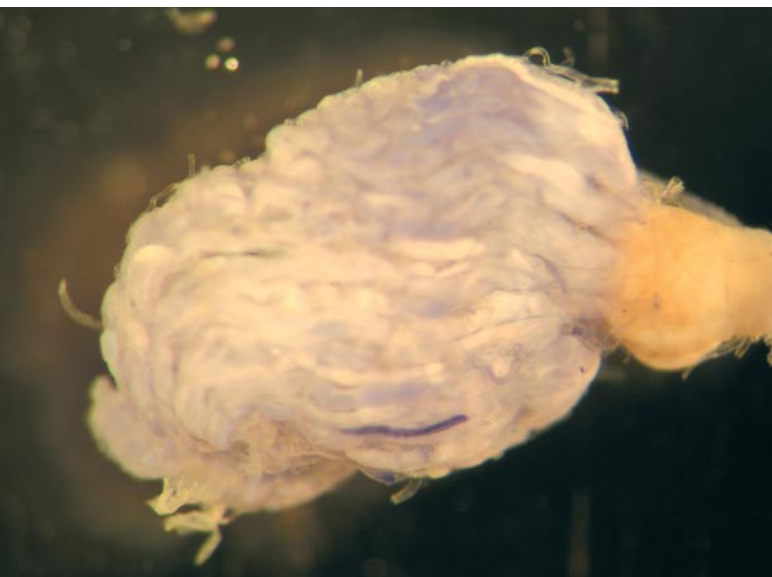


Fig.8 Détail d'un ovaire avec son oviducte obturé par une partie de l'appareil génital du mâle.

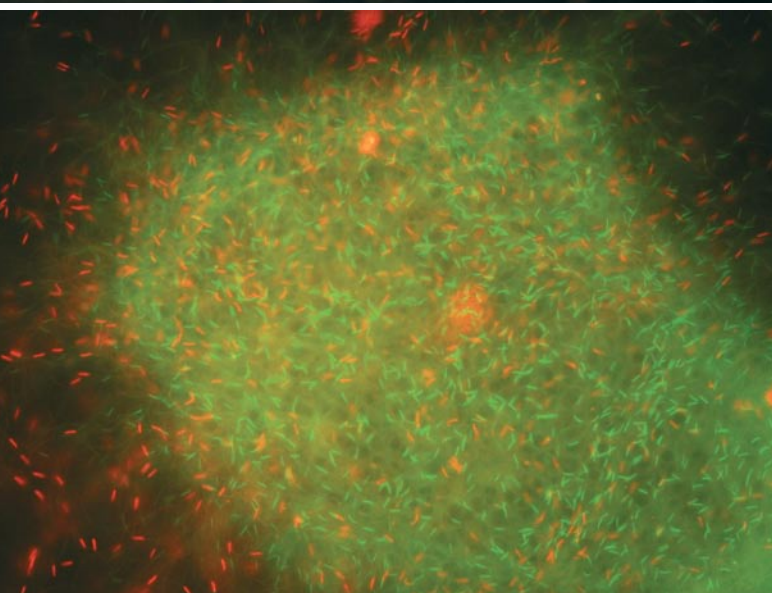


Fig.9 Evidance de spermatozoïdes morts (en rouge) dans la spermathèque (les spermatozoïdes vivants sont en vert fluorescent).



Fig.10-11 Nécrose dans la région apicale des ovaires (coloration jaune).

Maladies de l'appareil génital

La dégénérescence des ovarioles semble relativement fréquente, ainsi que l'avait précédemment signalé E. Darchen (*2). Elle se caractérise par l'apparition de taches jaunes à l'extrémité aveugle des alvéoles. Une partie des œufs ne semblent plus se charger de réserves et avortent. Le tube ovarique est alors vide. Si nombre d'entre eux le sont, cela se traduit globalement par une baisse de la ponte. (Fig.10-11)

Une part de ces maladies peut provenir d'infections bactériennes qui « remontent » les voies génitales du vagin, parfois jusqu'à l'ovaire. Il y a alors formation d'un ou plusieurs nodules mélanisés à l'endroit où les microbes ont été arrêtés par le système immunitaire de l'abeille. Ces nodules atteignent parfois une taille de l'ordre du millimètre. Ils empêchent alors le passage des œufs et rendent la reine plus ou moins stérile.

Maladies générales

Plusieurs maladies sont communes aux ouvrières et à la reine, voire même aux faux-bourçons. Cependant la fréquence et la gravité d'une infection donnée semblent très variables selon les castes. L'acarien parasite intra-trachéen *Acarapis woodi* a aussi été observé chez la reine et les faux-bourçons. Cependant il n'y a pas de certitude quant à la gravité des symp-



tômes qu'ils pourraient occasionner chez la reine. Pour l'acarien externe *Varroa destructor*, il semble ne passer qu'occasionnellement sur la reine adulte ou dans les alvéoles royales sans en compromettre la survie. En matière de nosébose, la reine peut être porteuse de spores de *Nosema apis*, mais ce n'est qu'exceptionnellement que l'infection conduit à la stérilité.

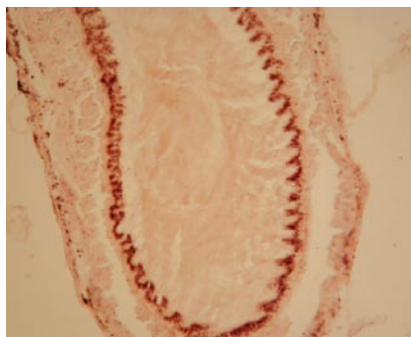
Quant aux virus de l'abeille, nos premières investigations montrent que certains d'entre eux sont bien présents chez la reine et les faux-bourçons. Toutefois la présence de virus, même en grand nombre, n'amène pas obligatoirement à conclure à un état de maladie, c'est-à-dire avec des symptômes compromettant la carrière de ponteuse de la reine. Il faut savoir dans quel tissu et dans quelles conditions se répliquent les virus pour estimer si la bonne santé de la reine est compromise. Le virus de l'aile déformée (Deformed Wing Virus) est le plus fréquemment détecté chez les reproducteurs comme chez les abeilles ouvrières. Grâce à des techniques d'identification génétique, nous avons pu le mettre en évidence dans le tissu adipeux de la reine et dans l'appareil génital du faux-bourçon (*3). Le sperme peut aussi être contaminé, mais à ce stade il n'est pas sûr que les mâles aient gardé une vitalité suffisante pour s'accoupler. (Fig.12)

Flux des toxiques

La reine adulte est particulièrement exposée aux pollutions car son espérance de vie est de plusieurs années, et elle consomme énormément de protéines pour couvrir ses besoins de ponte. Parmi les toxiques potentiellement les plus dangereux pour la reine, on trouve la catégorie des insecticides-acaricides. La littérature scientifique mentionne de nombreux cas de changement de reine après un épisode d'intoxication par insecticide, et parfois la tentative de remérage avorte, ce qui conduit à la perte de la colonie.

Les effets sub-aigus des insecticides sur la reine sont fondamentalement différents des effets sur les ouvrières car la

Fig.12 La coloration foncée indique la présence de particules virales dans la muqueuse interne de la vésicule séminale.



reine en ponte peut être affectée par des molécules adulticides mais aussi par des molécules à action ovicide ou larvicide, qui touchent plus la fonction sociale de reproduction que l'individu.

Beaucoup de ces insecticides sont transportés à la ruche par le pollen. Quand le pesticide n'est pas systémique (présent dans la sève de la plante), seul le pollen des fleurs ouvertes pendant l'épandage est contaminé. Au contraire, dans le cas d'un insecticide systémique, le pollen de toutes les fleurs est contaminé tant que le pesticide circulera dans la plante. Dans ce dernier cas, on peut raisonner en terme de flux de pesticide arrivant dans la ruche pendant la floraison d'une culture dont les semences ont été traitées par un insecticide. A titre d'exemple, la littérature retient la valeur moyenne de 3 µg d'imidaclopride/kg pour le pollen provenant du tournesol, du maïs et du colza « TS » (traitement de semences). Pour le tournesol et le maïs, semences traitées au fipronil, les concentrations avoisinent 1 µg de fipronil/kg. Toute la question est maintenant de savoir si ces insecticides parviennent à contaminer la nourriture de la reine et si sa ponte en est affectée. Rappelons aussi que beaucoup d'acaricides ont la même cible moléculaire que les insecticides et qu'en cas d'utilisation fréquente d'acaricides dans une colonie, c'est la reine qui sera l'individu le plus exposé. Il a été prouvé que de fortes doses de coumaphos ou de fluvalinate pouvaient avoir un effet toxique sur le développement de la reine. La cire accumule ce genre d'acaricides et peut occasionner des contaminations insoupçonnées de la reine par contact. De ce point de vue, l'utilisation raisonnée, c'est-à-dire à la bonne dose et lorsque le nombre de parasites dépasse le seuil de tolérance des produits anti-varroa, est la seule parade.

CONCLUSION

La pathologie « classique » traite presque exclusivement des ouvrières et donc très peu des reines. Les premiers éléments que nous avons présentés indiquent que la pathologie de la reine ne peut être déduite de celle de l'ouvrière. En effet, la transmission des agents de maladie entre les ouvrières et la reine est très mal connue. On peut même se poser la question de savoir si un microbe non « pathogène » pour l'ouvrière l'est aussi pour la reine.

En matière de toxique, les mêmes questions méritent d'être posées car on ne sait pas avec quelle quantité, à quelle fréquence et par qui exactement les reines en ponte sont nourries.

Ces considérations renforcent la nécessité d'avoir des critères mesurables pour juger de l'état général de la reine avant le début de sa ponte mais aussi pendant sa ponte. Nous envisageons de rechercher des marqueurs biochimiques pouvant attester de la fonctionnalité de son tissu adipeux. Ce tissu produit notamment une protéine majeure, la vitellogénine, constituant les réserves principales de l'œuf. Cette protéine fixe avec elle d'autres constituants de réserve tels que des vitamines, des lipides et les minéraux qui seront utilisés pour le développement de la jeune larve. Elle a également une fonction métabolique et participe aux réactions de défense immunitaire de l'insecte contre les microorganismes. L'utilisation de ce marqueur pourrait permettre, par exemple, de mettre en évidence des facteurs environnementaux pouvant interférer avec la santé de la reine.

* QUELQUES ARTICLES ET OUVRAGES DE RÉFÉRENCE

1. **Borchert A.**, 1970. Les maladies et parasites des abeilles, Paris.
2. **Darchen B.**, 2004. Contribution à l'étude des reines d'abeilles précocement non ponteuses. Bulletin CNDA 1:24-27.
3. **Fievet J., Tentcheva D., Gauthier L., de Miranda J. R., Cousserans F., Colin M. E., and Bergoin M.**, in press. Localization of deformed wing virus infection in queen and drone *Apis mellifera* L. *Virology Journal*.
4. **Maurizio A.**, 1950. The influence of pollen feeding and brood rearing on the length of life and physiological conditions of the honeybee. *Bee World* 31:9-12.
5. **Moritz R. F. A., Lattorff H. M. G., Neumann P., Kraus F. B., Radloff S. E., and Hepburn H. R.**, 2005. Rare royal families in honeybees, *Apis mellifera*. *Naturwissenschaften* 92:488-491.
6. **Rhodes J., and Sommerville D.**, 2003. Introduction and early performance of queen bees - some factors affecting success. RIRDC.
7. **Winstoon M.L.**, 1987. The biology of the honey bee, Cambridge