



**HAL**  
open science

# Effet de l'hybridation sur les performances apicoles et le comportement d'*Apis mellifera mellifera* en apiculture sédentaire

Adrien Pelletier

► **To cite this version:**

Adrien Pelletier. Effet de l'hybridation sur les performances apicoles et le comportement d'*Apis mellifera mellifera* en apiculture sédentaire. Médecine vétérinaire et santé animale. 2022. dumas-03980968

**HAL Id: dumas-03980968**

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03980968v1>

Submitted on 9 Feb 2023

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

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

Année 2022

# **EFFET DE L'HYBRIDATION SUR LES PERFORMANCES APICOLES ET LE COMPORTEMENT D'APIS MELLIFERA MELLIFERA EN APICULTURE SÉDENTAIRE**

## **THÈSE**

pour obtenir le diplôme d'État de  
**DOCTEUR VÉTÉRINAIRE**  
présentée et soutenue publiquement devant  
la Faculté de Médecine de Créteil (UPEC)  
le 14 décembre 2022

par

**Adrien PELLETIER**

Sous la direction de  
**Andrew PONTER et Lionel GARNERY**

## **JURY**

Présidente du jury :	<b>Mme Bénédicte GRIMARD-BALLIF</b>	Professeur à l'EnvA
Directeur de thèse :	<b>M. Andrew PONTER</b>	Professeur à l'EnvA
Examineur :	<b>M. Radu BLAGA</b>	Professeur à l'EnvA
Invité co-encadrant :	<b>M. Lionel GARNERY</b>	Enseignant-chercheur au CNRS
Membre invité :	<b>M. Nicolas VIDAL-NAQUET</b>	Vétérinaire



Liste des enseignants intervenant dans l'encadrement des thèses  
de Doctorat vétérinaire



Version du 3 octobre 2022

Liste des Professeurs et Maîtres de conférences titulaires de l'HDR

M	Adjou	Karim	Professeur	DPASP
M	Audigié	Fabrice	Professeur	DEPEC
M	Bellier	Sylvain	Professeur	DSBP
M	Blaga	Radu	Professeur	DSBP
M	Blot	Stephane	Professeur	DEPEC
M	Boulouis	Henri-Jean	Professeur émérite	DSBP
Mme	Chahory	Sabine	Professeur	DEPEC
M	Chateau	Henry	Professeur	DSBP
Mme	Chetboul	Valerie	Professeur	DEPEC
Mme	Crevier-Denoix	Nathalie	Professeur	DSBP
M	Degueurce	Christophe	Professeur	DSBP
M	Denoix	Jean-Marie	Professeur	DEPEC
M	Desquilbet	Loïc	Professeur	DSBP
Mme	Dufour	Barbara	Professeur émérite	DPASP
M	Eloit	Marc	Professeur	DSBP
M	Fayolle	Pascal	Professeur émérite	DEPEC
M	Federighi	Michel	Professeur	DPASP
M	Fontbonne	Alain	Professeur	DEPEC
Mme	Gilbert	Caroline	Professeur	DSBP
M	Grandjean	Dominique	Professeur	DEPEC
Mme	Grimard-Ballif	Bénédicte	Professeur	DPASP
Mme	Haddad-Hoang Xuan	Nadia	Professeur	DPASP
M	Jouvion	Gregory	Professeur	DSBP
M	Kohlhauer	Matthias	Maître de conférences HDR	DSBP
Mme	Le Poder	Sophie	Professeur	DSBP
M	Manassero	Mathieu	Professeur	DEPEC
Mme	Maurey-Guéneq	Christelle	Professeur	DEPEC
M	Millemann	Yves	Professeur	DPASP
Mme	Pilot-Storck	Fanny	Professeur	DSBP
M	Ponter	Andrew	Professeur	DPASP
Mme	Rivière	Julie	Maître de conférences HDR	DPASP
Mme	Robert	Céline	Professeur	DSBP
M	Tiret	Laurent	Professeur	DSBP
M	Tissier	Renaud	Professeur	DSBP
M	Verwaerde	Patrick	Professeur	DEPEC
Mme	Viateau	Véronique	Professeur	DEPEC

Liste des Maîtres de conférences et Ingénieurs de recherche DMV

M	Arne	Pascal	Maître de conférences	DPASP
Mme	Barassin	Isabelle	Maître de conférences	DPASP
Mme	Barbarino	Alix	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Benchekroun	Ghita	Maître de conférences	DEPEC
Mme	Bertoni	Lelia	Maître de conférences	DEPEC
M	Bolnot	Francois	Maître de conférences	DPASP
Mme	Canonne-Guibert	Morgane	Maître de conférences	DEPEC
Mme	Chevallier	Lucie	Maître de conférences	DSBP
Mme	Cochet-Faivre	Noëlle	Maître de conférences	DEPEC
Mme	Cordonnier-Lefort	Nathalie	Maître de conférences	DSBP
Mme	Crepeaux	Guillemette	Maître de conférences	DSBP
Mme	Coudry	Virginie	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	De Paula Reis	Alline	Maître de conférences	DPASP
M	Delsart	Maxime	Maître de conférences associé	DPASP
Mme	Denis	Marine	Ingénieur de recherche (DMV)	DPASP
M	Desbois	Christophe	Maître de conférences	DEPEC
M	Deshuillers	Pierre	Maître de conférences	DSBP
M	Gauthier	Michel	Maître de conférences associé	DPASP
Mme	Guetin-Poirier	Valentine	Maître de conférences	DPASP
Mme	Jacquet	Sandrine	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
M	Kurtz	Maxime	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Lagrée	Anne-Claire	Maître de conférences	DSBP
Mme	Le Dudal	Marine	Ingénieur de recherche (DMV)	DSBP
Mme	Le Roux	Delphine	Maître de conférences	DSBP
Mme	Legrand	Chantal	Maître de conférences associé	DSBP
Mme	Manguin	Estelle	Maître de conférences	DEPEC
Mme	Marignac	Genevieve	Maître de conférences	DSBP
Mme	Marotto	Stéphanie	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
M	Mauffré	Vincent	Maître de conférences	DPASP
Mme	Maurice	Emeline	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Mespouilhès-Rivière	Céline	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Mtimet	Narjès	Maître de conférences	DPASP
M	Mortier	Jérémy	Maître de conférences associé	DEPEC
M	Nudelmann	Nicolas	Maître de conférences	DEPEC
M	Pignon	Charly	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
M	Polack	Bruno	Maître de conférences	DSBP
Mme	Quéré	Émilie	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Ravary-Plumioën	Bérangère	Ingénieur de recherche (DMV)	DPASP
M	Reyes-Gomez	Edouard	Maître de conférences	DSBP
Mme	Risco-Castillo	Véronica	Maître de conférences	DSBP
Mme	Rose	Hélène	Maître de conférences associé	DSBP
M	Tanquerel	Ludovic	Maître de conférences	DEPEC





# Remerciements

**À Madame Bénédicte Grimard-Ballif, Présidente du jury de cette thèse, Professeur à l'EnvA,**  
pour m'avoir fait l'honneur de présider au jury.  
*Hommages respectueux.*

**À Monsieur Andrew Ponter, Professeur à l'EnvA, Directeur de cette thèse,** pour votre intérêt porté à mon travail et votre investissement. Merci pour ces heures de discussion passionnantes que nous ne comptons pas. Merci pour votre amitié.  
*Avec toute ma reconnaissance.*

**À Monsieur Lionel Garnery, Enseignant-chercheur au CNRS, Invité co-encadrant de cette thèse,** pour avoir cru en ce travail expérimental et l'avoir rendu possible. Merci pour la transmission de votre compréhension profonde de l'apiculture.  
*Sincère gratitude.*

**À Monsieur Radu Blaga, Professeur à l'EnvA, Examineur de cette thèse,** pour m'avoir fait l'honneur de faire partie du jury.  
*Sincères remerciements.*

**À Monsieur Nicolas Vidal-Naquet, Docteur Vétérinaire, Invité de cette thèse,** pour m'avoir initié à la passion de l'apiculture, qui ne me quittera jamais plus.  
*Profonde reconnaissance.*

~

**À la Fondation Lune de Miel®, à ICKO Apiculture et Annabelle, à Vétéo-pharma, à Guerlain,** pour leur soutien financier et technique sans lequel cette thèse n'aurait pas abouti.

**À Monsieur Serge Dini, Apiculteur,** pour m'avoir sensibilisé à la sauvegarde de l'abeille noire. Pour la visite de vos ruches sous la pinède, qui fut le fondement de cette thèse.

**À Monsieur Benoît Gilles, Docteur Vétérinaire,** pour tes enseignements aux détours des routes du Cantal.

**À Hélène Legout (CNRS), à Éric Dubois (ANSES), à Anne Dalmon (INRAE), à Thibault Menjou (AB LABO), à Edouard Reyes-Gomez, à Philippe Ruchat, à Clémence Riva, à tous ceux ayant participé aux manipulations,** sincères remerciements pour votre aide.

**À Olivier Kies,** pour ta disponibilité et ta profonde gentillesse.

~

**À mes parents et à ma sœur,** puissiez-vous me pardonner un jour de vous avoir quittés. Je vous dédie cette thèse.

**À Lucile,** que notre amour demeure.

**À mes grands-pères et mon ami des champs**

**Aux Chevadières**

**À tous les miens**

*Merci.*







# Table des matières

---

Liste des figures.....	5
Liste des tableaux .....	10
Liste des abréviations.....	12
Introduction .....	4
<b>Première partie : Introduction générale.....</b>	<b>7</b>
I. Diversité d' <i>Apis mellifera</i> .....	7
A. Diversité morphométrique .....	7
B. Diversité génétique : apport des données moléculaires .....	8
1. Marqueurs enzymatiques.....	8
2. Marqueurs de l'ADN mitochondrial.....	9
3. Marqueurs de l'ADN nucléaire : les microsatellites .....	10
II. Hybridation d' <i>Apis mellifera mellifera</i> .....	10
A. Une faible diversité génétique au sein de la lignée M .....	10
B. Origines de l'hybridation d' <i>Apis m. mellifera</i> en France.....	11
C. Etat des lieux de l'hybridation de l'abeille noire en France.....	12
D. Conséquences de l'hybridation .....	14
<b>Deuxième partie : Étude expérimentale.....</b>	<b>15</b>
I. Problématique et objectifs de l'étude.....	15
A. Problématique de l'étude .....	15
B. Objectifs de l'étude.....	15
II. Protocole général et méthode d'échantillonnage .....	16
A. Déroulement général de l'étude .....	16
B. Méthode d'échantillonnage .....	16
1. Choix du rucher expérimental .....	16
2. Critères d'inclusion, de non-inclusion et d'exclusion des colonies .....	18
C. Conduite des colonies.....	18
1. Matériel apicole .....	18
2. Installation et soins aux colonies.....	19
III. Protocoles expérimentaux .....	19
A. Analyses génétiques .....	19
1. Prélèvement d'ouvrières .....	19
2. Extraction de l'ADN .....	19
3. Étude de la diversité mitochondriale .....	20
4. Étude de la diversité nucléaire .....	23
B. Analyses morphométriques .....	27
1. Prélèvement d'ouvrières et préparation des ailes .....	27
2. Utilisation du logiciel ApiClass .....	27
3. Interprétation des données .....	28
C. Analyses de pathogènes.....	28
1. Prélèvement d'abeilles .....	28
2. Extraction de l'ADN .....	28
3. Détection des pathogènes .....	29
D. Analyses chimiques et organoleptiques du miel .....	29
1. Prélèvement du miel .....	30
2. Méthodes d'analyse .....	30
3. Interprétation des résultats.....	31
E. Méthode ColEval© .....	31
1. Protocole de terrain.....	31
2. Traitement des données .....	32

F. Suivi de l'infestation en varroa .....	36
1. Taux d'infestation .....	36
2. Comportement hygiénique .....	37
G. Suivi du poids des colonies .....	38
1. Poids brut .....	38
2. Conditions environnementales .....	39
H. Analyses statistiques .....	39
1. Analyses génétiques .....	39
2. Traitement statistique des mesures répétées .....	40
IV. Résultats .....	41
A. Caractérisation de l'échantillon d'étude .....	41
1. Résultats des analyses génétiques .....	41
2. Résultats des analyses morphométriques .....	50
B. Résultats des analyses de pathogènes .....	51
C. Résultats des analyses chimiques et organoleptiques du miel .....	52
D. Résultats de la méthode ColEval© .....	54
1. Dynamique générale des colonies et conditions environnementales .....	54
2. Population d'ouvrières adultes .....	56
3. Réserves .....	57
4. Couvain .....	63
5. Cellules vides .....	71
6. Structuration spatiale des ruches .....	73
7. Variabilité intra-groupe .....	77
E. Résultats du suivi de l'infestation en varroa .....	80
1. Taux d'infestation .....	80
2. Comportement hygiénique .....	83
F. Résultats du suivi du poids des colonies .....	84
1. Récoltes de miel .....	84
2. Poids cumulé .....	86
3. Variabilité intra-groupe .....	87
4. Variation du poids cumulé lors de conditions climatiques dégradées .....	87
V. Discussion .....	89
A. Matériels et méthodes : limites techniques .....	89
1. Recrutement des colonies .....	89
2. Evaluation de la population d'ouvrières adultes .....	89
3. Méthode ColEval© .....	90
4. Comptage des varroas .....	90
B. Analyse des résultats génétiques .....	91
1. Diversité mitochondriale (lignée maternelle des colonies de l'étude) .....	91
2. Diversité nucléaire (lignée paternelle des colonies de l'étude) .....	92
C. Analyse des résultats morphométriques et bilan sur l'échantillon d'étude .....	94
D. Commentaire des résultats des analyses de pathogènes .....	94
E. Commentaire des résultats des analyses chimiques et organoleptiques du miel .....	94
F. Analyse des résultats de la méthode ColEval© .....	96
1. Conditions environnementales et dynamisme des colonies .....	96
2. Populations d'ouvrières adultes .....	96
3. Réserves .....	96
4. Couvain .....	99
5. Cellules vides .....	101
6. Structuration spatiale des ruches .....	102
7. Variabilité intra-groupe .....	103
G. Analyse des résultats du suivi de l'infestation en varroa .....	104
H. Analyse des résultats du suivi de l'évolution du poids des colonies .....	106
1. Récoltes de miel .....	106
2. Poids cumulé .....	106
3. Variabilité intra-groupe .....	106

4. Variation du poids cumulé lors de conditions climatiques dégradées .....	106
I. Propositions d'amélioration pour des études ultérieures et perspectives.....	108
J. Applications pratiques.....	108
1. Conduite des colonies.....	108
2. Contrôle de la varroose.....	108
3. Intérêt des hybrides.....	109
<b>Conclusion.....</b>	<b>111</b>
<b>Liste des références bibliographiques .....</b>	<b>114</b>
<b>Annexe 1 : Déroulement général de l'étude .....</b>	<b>122</b>
<b>Annexe 2 : Identification des principaux virus par PCR.....</b>	<b>123</b>
<b>Annexe 3 : Identification de Noséma par PCR .....</b>	<b>129</b>
<b>Annexe 4 : Identification des loques américaine et européenne par PCR .....</b>	<b>147</b>
<b>Annexe 5 : Protocole de contrôle du gène de la <math>\beta</math>-actine par PCR.....</b>	<b>182</b>
<b>Annexe 6 : Exemple de gel de migration en agarose des produits de PCR.....</b>	<b>186</b>
<b>Annexe 7 : Exemple de gel de migration en poly-acrylamide, obtenu après digestion du produit de PCR par l'enzyme <i>DraI</i>.....</b>	<b>187</b>
<b>Annexe 8 : Détail de la composition des lignées de référence .....</b>	<b>188</b>
<b>Annexe 9 : Figures ACP des colonies incluses dans l'étude.....</b>	<b>190</b>
<b>Annexe 10 : Gels de migration sur agarose pour la détection des agents de loque américaine et européenne.....</b>	<b>201</b>
<b>Annexe 11 : Rapports d'analyses de miels .....</b>	<b>203</b>
<b>Annexe 12 : Données brutes issues de la méthode ColEval© .....</b>	<b>237</b>
<b>Annexe 13 : Principaux partenaires scientifiques et sponsors .....</b>	<b>242</b>





# Liste des figures

---

Figure 1 : Phénoqramme tridimensionnel d' <i>Apis mellifera</i> obtenu à partir des variables morphométriques (modifié d'après Ruttner, 1988).....	7
Figure 2 : Phylogénie des sous-espèces d' <i>Apis mellifera</i> basée sur les séquences de la région intergénique COI-COII de l'ADNmt.....	9
Figure 3 : Phylogénie des sous-espèces d' <i>Apis mellifera</i> basée sur les séquences des génomes	10
Figure 4 : Niveaux d'introgression mitochondriale des populations françaises (modifié d'après FEAGA, 2007-2008).....	13
Figure 5 : Emplacement du rucher expérimental, réseau hydrographique et composition de la flore de l'aire de butinage .....	17
Figure 6 : Différentes régions de l'ADNmt chez l'abeille et position de la région intergénique COI-COII (modifié d'après Garnery, 1992).....	20
Figure 7 : Polymorphisme observable entre les sous-unités COI-COII dans les lignées A, C, M et O qui permet leur distinction (modifié d'après Garnery, 1992).....	21
Figure 8 : Profils d'électrophorèse correspondant aux différentes longueurs des amplicons de la région non codante de COI-COII déterminées par le marqueur de poids moléculaire commercial M III.....	22
Figure 9 : Profils de migration de différents haplotypes des lignées A, C et M après digestion par l'enzyme <i>DraI</i> .....	23
Figure 10 : Principe de polyandrie illustré par la fécondation d'une reine hétérozygote (allèles bleu et rouge) à un locus donné.....	24
Figure 11 : Capture d'écran du logiciel GeneMapper.....	26
Figure 12 : Position des points-repère A, B et C à pointer manuellement sur le logiciel ApiClass (photographie personnelle).....	28
Figure 13 : Détermination des surfaces des 4 composantes à l'aide du logiciel Mesurim (photographie Garnery L.) .....	35
Figure 14 : Roulement des abeilles au sucre glace (photographie personnelle) .....	37
Figure 15 : Installation des balances Optibee® au rucher expérimental (photographie Garnery L.) .....	39
Figure 16 : Fréquence des différentes lignées maternelles parmi les colonies de l'étude .....	42
Figure 17 : Fréquence des différents haplotypes parmi les colonies de l'étude.....	43
Figure 18 : Fréquences des différents haplotypes au sein de la lignée M.....	43

Figure 19 : Arbre de proximité génétique calculé à partir des distances de Cavalli-Sforza et Edwards (1967) et de 14 <i>loci</i> microsatellites .....	44
Figure 20 : Taux d'introgression des deux groupes calculés sur la base de l'analyse génétique ...	46
Figure 21 : Projections des individus de la colonie 3 sur les deux premiers axes de l'ACP réalisées avec la matrice des distances interindividuelles .....	47
Figure 22 : Projections des individus de la colonie 21 sur les deux premiers axes de l'ACP réalisées avec la matrice des distances interindividuelles .....	48
Figure 23 : Projections des individus de la colonie 18 sur les deux premiers axes de l'ACP réalisée avec la matrice des distances interindividuelles .....	49
Figure 24 : Projections des colonies recrutées sur les deux premiers axes de l'ACP réalisée avec la matrice des distances interindividuelles.....	50
Figure 25 : Taux d'introgression des deux groupes calculés sur la base des critères morphométriques .....	51
Figure 26 : Evolution mensuelle de l'humidité relative au rucher expérimental .....	54
Figure 27 : Evolution mensuelle de la vitesse du vent au rucher expérimental .....	55
Figure 28 : Niveau de précipitations mesuré en 2022.....	55
Figure 29 : Evolution mensuelle de la population d'ouvrières adultes par groupe d'étude.....	56
Figure 30 : Population d'ouvrières adultes par groupe d'étude sur la période (Mai à Août 2022) ...	56
Figure 31 : Evolution mensuelle de la population moyenne d'ouvrières adultes toutes colonies confondues.....	57
Figure 32 : Evolution mensuelle de la surface de miel operculé par groupe d'étude : effet date $p < 0,0001$ .....	58
Figure 33 : Surface de miel operculé moyenne par groupe d'étude sur la période (Mai à Août 2022) .....	58
Figure 34 : Evolution mensuelle de la surface de miel operculé moyenne toutes colonies confondues : effet date $p < 0,0001$ .....	59
Figure 35 : Evolution mensuelle de la surface de nectar par groupe d'étude .....	59
Figure 36 : Surface de nectar moyenne par groupe d'étude sur la période (Mai à Août 2022) .....	60
Figure 37 : Evolution mensuelle de la surface de nectar moyenne toutes colonies confondues : effet date $p < 0,0001$ .....	60
Figure 38 : Proportion de nectar parmi les réserves glucidiques totales au mois d'Août par groupe d'étude .....	61
Figure 39 : Evolution mensuelle de la surface de pollen par groupe d'étude .....	61

Figure 40 : Surface de pollen moyenne par groupe d'étude sur la période (Mai à Août 2022) .....	62
Figure 41 : Evolution mensuelle de la surface de pollen moyenne toutes colonies confondues : effet date $p < 0,001$ .....	62
Figure 42 : Evolution mensuelle de la surface de couvain ouvert d'ouvrières par groupe d'étude ..	63
Figure 43 : Surface de couvain ouvert d'ouvrières moyenne par groupe d'étude sur la période (Mai à Août 2022).....	64
Figure 44 : Evolution mensuelle de la surface de couvain ouvert d'ouvrières moyenne toutes colonies confondues : effet date $p < 0,0001$ .....	64
Figure 45 : Evolution mensuelle de la surface de couvain fermé d'ouvrières par groupe d'étude...	65
Figure 46 : Surface de couvain fermé d'ouvrières moyenne par groupe d'étude sur la période (Mai à Août 2022).....	65
Figure 47 : Evolution mensuelle de la surface de couvain fermé d'ouvrières moyenne toutes colonies confondues : effet date $p < 0,0001$ .....	66
Figure 48 : Evolution mensuelle de la surface de couvain ouvert de mâles par groupe d'étude.....	67
Figure 49 : Surface de couvain ouvert de mâles moyenne par groupe d'étude sur la période (Mai à Août 2022).....	67
Figure 50 : Evolution mensuelle de la surface de couvain ouvert de mâles moyenne toutes colonies confondues : effet date $p < 0,0001$ .....	68
Figure 51 : Evolution mensuelle de la surface de couvain fermé de mâles par groupe d'étude .....	68
Figure 52 : Surface de couvain fermé de mâles moyenne par groupe d'étude sur la période (Mai à Août 2022).....	69
Figure 53 : Evolution mensuelle de la surface de couvain fermé de mâles toutes colonies confondues : effet date $p < 0,0001$ .....	69
Figure 54 : Evolution mensuelle de la surface de couvain total par groupe d'étude .....	70
Figure 55 : Surface de couvain total moyenne par groupe d'étude sur la période (Mai à Août 2022) .....	70
Figure 56 : Evolution mensuelle de la surface de couvain total moyenne toutes colonies confondues : effet date $p < 0,0001$ .....	71
Figure 57 : Evolution mensuelle de l'espace vide par groupe d'étude.....	72
Figure 58 : Surface de cellules vides moyenne par groupe d'étude sur la période (Mai à Août 2022) .....	72
Figure 59 : Evolution mensuelle de la surface de cellules vides moyenne toutes colonies confondues : effet date $p < 0,0001$ .....	73
Figure 60 : Répartition moyenne du miel operculé sur la période (Mai à Août 2022) .....	73

Figure 61 : Répartition moyenne du nectar sur la période (Mai à Août 2022) .....	74
Figure 62 : Répartition moyenne du pollen sur la période (Mai à Août 2022).....	74
Figure 63 : Répartition moyenne de couvain ouvert d'ouvrières sur la période (Mai à Août 2022) .	75
Figure 64 : Répartition moyenne de couvain fermé d'ouvrières sur la période (Mai à Août 2022) ..	76
Figure 65 : Répartition moyenne de couvain ouvert de mâles sur la période (Mai à Août 2022) ....	76
Figure 66 : Répartition moyenne de couvain fermé de mâles sur la période (Mai à Août 2022).....	77
Figure 67 : Ecart-type mensuels moyens de la quantité de miel operculé par groupe d'étude .....	78
Figure 68 : Ecart-type mensuels moyens de la quantité de nectar par groupe d'étude .....	78
Figure 69 : Ecart-type mensuels moyens de la quantité de pollen stocké par groupe d'étude.....	79
Figure 70 : Ecart-type mensuels moyens de la quantité de couvain fermé d'ouvrières par groupe d'étude .....	79
Figure 71 : Ecart-type mensuels moyens de la quantité de couvain fermé de mâles par groupe d'étude .....	80
Figure 72 : Evolution mensuelle du nombre de varroas moyen pour 300 ouvrières par groupe d'étude : effet race*date $p < 0,05$ et effet date $p < 0,0001$ .....	81
Figure 73 : Nombre de varroas moyen pour 300 ouvrières par groupe d'étude sur la période (Mai à Août 2022).....	81
Figure 74 : Nombre de varroas moyen pour 300 ouvrières par groupe d'étude à charge initiale identique sur la période (Mai à Août 2022) .....	82
Figure 75 : Evolution du nombre de varroas moyen pour 300 ouvrières par groupe d'étude à charge initiale identique : effet date $p < 0,0001$ .....	83
Figure 76 : Comportement hygiénique des groupes d'étude.....	83
Figure 77 : Pourcentage de cellules tuées prises en charge par groupe d'étude .....	84
Figure 78 : Récolte de miel par groupe d'étude .....	84
Figure 79 : Récolte de miel par groupe d'étude sur la période (Mai à Août 2022).....	85
Figure 80 : Récolte de miel moyenne toutes colonies confondues : effet date $p < 0,01$ .....	85
Figure 81 : Evolution hebdomadaire du poids cumulé par groupe d'étude.....	86
Figure 82 : Poids cumulé moyen par groupe d'étude sur la période (Mai à Août 2022) .....	86
Figure 83 : Ecart-type mensuels moyens du poids cumulé des colonies par groupe d'étude .....	87
Figure 84 : Poids cumulé moyen des deux groupes durant les périodes de mauvais temps des mois de Mai, Juillet et Août .....	88

Figure 85 : Poids cumulé moyen des deux groupes durant la période de mauvais temps du mois de Juillet.....88

Figure 86 : Poids cumulé moyen des deux groupes durant l'ensemble des périodes de mauvais de temps .....89

# Liste des tableaux

---

Tableau 1 : Répartition géographique et composition des quatre lignées évolutives .....	8
Tableau 2 : Fréquence des hétérozygotes au sein des lignées évolutives, calculée sur la base de 11 <i>loci</i> microsatellites (modifié d'après Garnery, 2017) .....	11
Tableau 3 : Principe et caractéristiques des méthodes d'analyse pratiquées sur les échantillons de miels. (a) = mesure accréditée .....	30
Tableau 4 : Illustration des composantes mesurées sur les cadres (photographies personnelles) .....	33
Tableau 5 : Résultats de l'analyse mitochondriale .....	41
Tableau 6 : Taux d'introgession calculés pour les colonies de l'étude .....	45
Tableau 7 : Taux d'introgession basés sur les critères morphométriques .....	50
Tableau 8 : Résultat des analyses physico-chimiques des miels .....	52
Tableau 9 : Composition du miel de printemps des colonies noires originaires du Morbihan .....	52
Tableau 10 : Résultat des analyses des contaminants des miels .....	53
Tableau 11 : Résultats de l'analyse pollinique .....	53
Tableau 12 : Nombre moyen d'origines florales différentes retrouvé dans les miels par colonie .....	53
Tableau 13 : Caractérisation des périodes de conditions climatiques dégradées .....	87
Tableau 14 : Principales différences observées entre colonies noires et hybrides .....	109





# Liste des abréviations

---

A : Adénine

*Apis m.* : *Apis mellifera*

ABPV : Virus de la paralysie aiguë (*Acute Bee Paralysis Virus*)

ACP : Analyse en Coordonnées Principales

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNase : Désoxyribonucléase

ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire

ADNmt : Acide désoxyribonucléique mitochondrial

ANSES : Agence Nationale de Sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'Environnement et du travail

ARN : Acide ribonucléique

ARNt : Acide ribonucléique de transfert

ARNt<sup>leu</sup> : Leucyl-Acide ribonucléique de transfert synthétase

BeeGIS : Bee Geographic Information System

BET : Bromure d'éthidium

BIO : Biologique

BQCV : Virus de la cellule de reine noire (*Black Queen Cell Virus*)

C : Cytosine

°C : Degré Celsius

CBPV : Virus de la paralysie chronique de l'abeille (*Chronic Bee Paralysis Virus*)

cDNA : Acide désoxyribonucléique complémentaire

cm : Centimètre

cm<sup>2</sup> : Centimètre carré

CNRS : Centre National de la Recherche Scientifique

CO<sub>2</sub> : Dioxyde de carbone

COFRAC : Comité Français d'Accréditation

COI : Cytochrome oxydase I

COII : Cytochrome oxydase II

ColEval© : Evaluation des colonies (*Colony Evaluation*)

DA de Nei : *Above Diagonal* de Nei

DAS : Distance des allèles partagés (*Shared Allele Distance*)

DWV-A : Virus des ailes déformées génotype A (*Deformed Wing Virus A*)

DWV-B : Virus des ailes déformées génotype B (*Deformed Wing Virus B*)

DZ : Dzair Index

EFSA : European Food Safety Authority

ELISA : Dosage immunologique (*Enzyme-Linked Immuno Assay*)

FEAGA : Fonds Européen Agricole de Garantie

G : Guanine

g : Gramme

*g* : Intensité de la pesanteur

Génération F2 : Deuxième génération d'après les lois de Mendel

GPS : Système de positionnement par satellites (*Global Positioning System*)

h : Heure

H : Atome d'hydrogène

HPLC : Chromatographie liquide haute performance (*High-performance liquid chromatography*)

HMF : Hydroxyméthylfurfural

INRAE : Institut National de Recherche pour l'agriculture, l'Alimentation et l'Environnement

ITSAP : Institut Technique et Scientifique de l'Abeille et de la Pollinisation

kb : Kilo base

kg : Kilogramme

km : Kilomètre

Lignée A : Lignée Africaine

Lignée C : Lignée Nord-Méditerranéenne

Lignée M : Lignée Ouest-Méditerranéenne

Lignée O : Lignée orientale

Lignée Z : Lignée Proche-Orient

SAS® : Système d'analyses statistiques (*Statistical Analysis System*)

LSA : Loi Santé Animale

Marq V : Marqueur V

mg : Milligramme

mL : Millilitre

mm : Millimètre

mmc : Moyennes des moindres carrés

MNHN : Muséum National d'Histoire Naturelle

*N. apis* : *Nosema apis*

*N. ceranae* : *Nosema ceranae*

ND : Nom Déposé

NS : Non significatif

pb : Paire de bases

PCR : Amplification en chaîne par polymérase (*Polymerase Chain Reaction*)

pH : Potentiel hydrogène

ppb : Partie par milliard

PrADE : Protection des Abeilles Dans l'Environnement

PSM : Poste de Sécurité Microbiologique

REML : Méthode du maximum de vraisemblance restreint (*Restricted maximum likelihood*)

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

rpm : Rotations par minute

SAS : Système d'analyse statistique (*Statistical Analysis System*)

SBV : Virus du couvain sacciforme (*Sacbrood Virus*)

Stade L2 : Stade larvaire 2

s.u. : Sans unité

T : Thymine

Taq polymérase : ADN polymérase thermostable isolée à partir de *Thermus aquaticus*

UE : Union Européenne

UMT : Unité Mixte Technologique

UV : Ultra-Violet

Valeur de p : Valeur de probabilité

B-actine : Actine bêta

µL : Microlitre

µs : Microsiemens





# Introduction

---

*Apis mellifera mellifera*, l'abeille noire, est l'espèce endémique française. Elle est réputée pour sa rusticité qui se traduit notamment par une production compacte de couvain, un démarrage tardif au printemps et une économie dans la gestion des ressources polliniques et nectarifères.

Or, depuis 1995, l'augmentation des pertes de colonies a entraîné une hausse des importations d'abeilles allochtones, qui menacent sa sauvegarde. En effet, la hausse des taux d'hybridation qui en résulte entraîne une baisse d'adaptation des colonies à leur environnement dont elles sont particulièrement dépendantes.

Les apiculteurs professionnels et amateurs semblent sensibilisés à cette problématique. Cependant, les conséquences de l'hybridation de l'abeille noire sur ses performances apicoles, comme la production de miel et de couvain, ont été peu étudiées. Par ailleurs, l'impact de l'hybridation sur la qualité de sa production de miel est également méconnu.

Cette thèse se propose ainsi de mesurer les conséquences possibles de l'hybridation en comparant un groupe de colonies noires à un groupe de colonies hybridées sur les principaux mois de la saison apicole. Dans un premier temps sera dressé un état des lieux général sur la diversité et les niveaux d'hybridation actuels des populations d'abeilles noires françaises. Dans un second temps, le protocole et les résultats de l'étude expérimentale seront décrits et interprétés.

De nombreux partenaires scientifiques ont été fédérés à ce sujet de thèse, tels que le CNRS, l'ANSES et l'INRAE. Il a été financé par la Fondation Lune de Miel® et ICKO Apiculture.





# Première partie : Introduction générale

## I. Diversité d'*Apis mellifera*

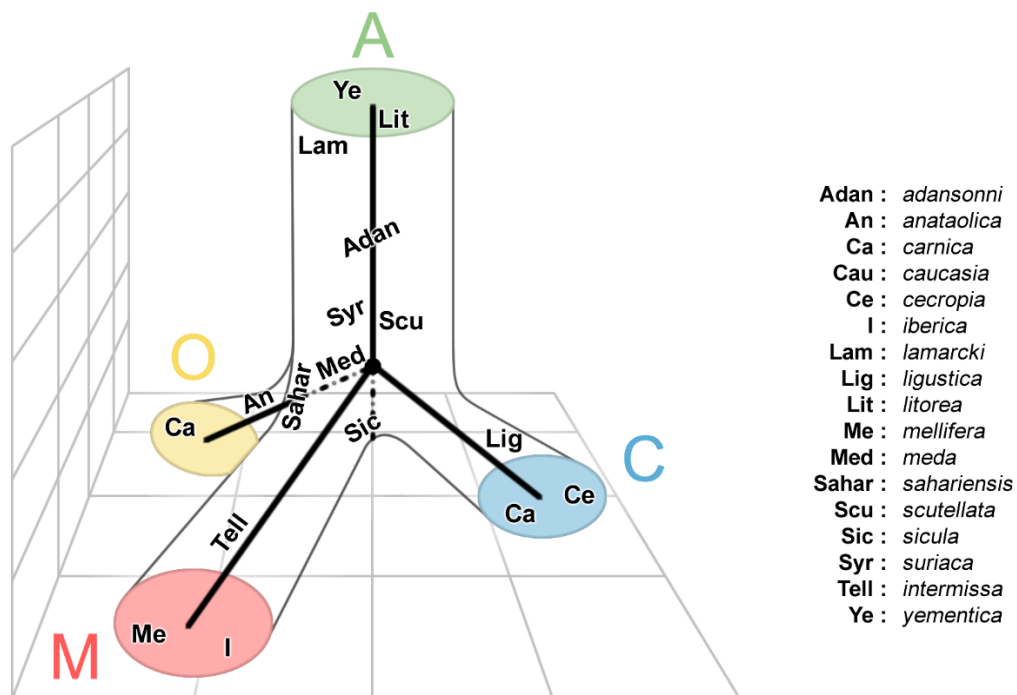
Le genre *Apis*, qui regroupe les insectes sociaux à long proboscis (pièces buccales tubulaires) pratiquant l'essaimage, comprend neuf espèces parmi lesquelles *Apis mellifera*, l'abeille mellifère (Danforth *et al.*, 2006a ; Danforth *et al.*, 2006b). Son aire de répartition naturelle initiale recouvre l'Europe, le Proche-Orient et l'Afrique. Cette distribution globale a conduit, par le biais d'isolements géographiques (chaînes de montagne et océans) ou climatiques (zones refuges durant les périodes glaciaires) à la mise en place de caractéristiques écologiques singulières parmi les populations d'abeilles mellifères (Ruttner, 1988 ; Sheppard *et al.*, 1997 ; Sheppard et Meixner, 2003), ainsi qu'à l'apparition de sous-espèces, dont *Apis mellifera mellifera*, l'abeille noire Ouest-Européenne.

Par la suite, ce n'est qu'à la faveur des migrations humaines que l'aire de distribution de l'espèce s'est étendue à l'Amérique et à l'Australie, puis à l'ensemble du globe.

### A. Diversité morphométrique

Les sous-espèces d'*Apis mellifera* ont d'abord été différenciées par des critères morphométriques basés sur une quarantaine de variables, parmi lesquelles la taille de l'insecte ou la longueur de son proboscis (Ruttner, 1988). Ces variables ont été appliquées à des populations d'abeilles mellifères échantillonnées dans l'ensemble de leur aire de répartition. À l'heure actuelle, vingt-neuf sous-espèces ont été identifiées et classées en quatre lignées évolutives A, C, M et O (Figure 1), distinctement séparées géographiquement.

Figure 1 : Phénoqramme tridimensionnel d'*Apis mellifera* obtenu à partir des variables morphométriques (modifié d'après Ruttner, 1988)





Le phénogramme fait apparaître les quatre lignées évolutives classées par chaque axe selon des combinaisons de caractères, dont les plus représentatifs sont :

- La taille qui sépare les lignées africaine (A) et européennes (O, M, C) selon l'axe vertical
- L'indice cubital (rapport de points pris sur les nervures des ailes) qui sépare les lignées O, M, et C selon l'axe horizontal
- La taille du proboscis qui sépare les lignées O et M selon la profondeur.

Actuellement, les quatre lignées évolutives se répartissent comme suit (Tableau 1).

**Tableau 1 : Répartition géographique et composition des quatre lignées évolutives**

Nom de la lignée	Répartition géographique	Sous-espèces
A (Africaine)	Ensemble du continent africain	<i>Apis m. intermissa, sahariensis, major, adansonii, monticola, scutellata, capensis</i> et <i>unicolor</i>
C (Nord-Méditerranéenne)	Balkans, Italie	<i>Apis m. ligustica, carnica, cecropia</i> et <i>macedonica</i>
M (Ouest-Méditerranéenne)	De l'Espagne jusqu'en Scandinavie, en passant par les régions situées à l'Ouest de l'arc alpin, dont la France, et les îles britanniques	<i>Apis m. iberiensis</i> et <i>mellifera</i>
O (Orientale)	Turquie, Est de l'Ukraine, Ouest de la Russie, Caucase, Kazakhstan	<i>Apis m. anatolica, caucasia</i> et <i>pomonella</i>

La lignée M comprend deux sous-espèces :

- *Apis mellifera iberiensis* en Espagne et au Portugal
- *Apis mellifera mellifera*, l'abeille noire, objet de notre étude, sur le reste de son aire de répartition qui couvre l'Ouest et le Nord de l'Europe, depuis les Pyrénées jusqu'à l'Oural.

Par la suite, le développement des techniques d'étude du génome a permis l'exploitation des données moléculaires et l'établissement de la phylogénie d'*Apis mellifera*.

## B. Diversité génétique : apport des données moléculaires

### 1. Marqueurs enzymatiques

L'existence des quatre lignées évolutives a été confirmée par l'étude du polymorphisme enzymatique (Pamilo *et al.*, 1978 ; Sheppard et Berlocher, 1989). Cependant, ces marqueurs enzymatiques ne sont pas assez variables pour décrire de manière fine la structure génétique d'*Apis mellifera*.

## 2. Marqueurs de l'ADN mitochondrial

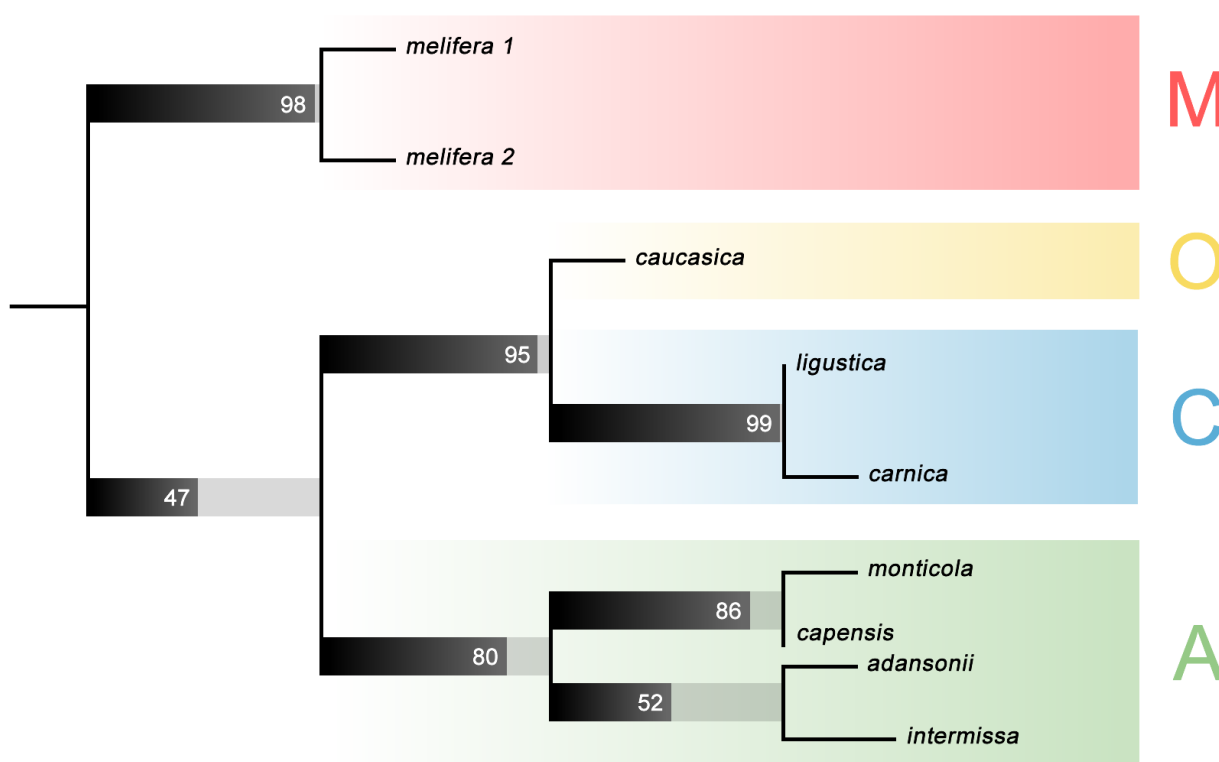
Dans le règne animal, les mitochondries contiennent un ADN (ADNmt) sous forme d'une molécule d'acides nucléiques circulaire double brin, dont la taille chez l'abeille est de l'ordre de 16 kb (Boursot et Bonhomme, 1986). Les marqueurs que contient cet ADNmt sont utilisés pour l'établissement de la phylogénie d'*Apis mellifera* pour plusieurs raisons :

- Sa transmission maternelle et son fort taux de mutation permettent d'établir les généalogies maternelles d'une colonie et d'étudier les échanges génétiques entre populations (Vilà *et al.*, 1999 ; Orlando *et al.*, 2003 ; Naderi *et al.*, 2007, Bertrand *et al.*, 2015)
- Son extraction à partir d'échantillons d'ouvrières est rapide et peu onéreuse (Smith, 1991 ; Garnery *et al.*, 1992 ; Moritz *et al.*, 1994).

L'étude des marqueurs de l'ADNmt d'*Apis mellifera* a confirmé l'existence des lignées évolutives A, C et M (Figure 2). Cependant, elle ne permet pas d'isoler la lignée O, qui reste indifférenciable de la lignée C.

**Figure 2 : Phylogénie des sous-espèces d'*Apis mellifera* basée sur les séquences de la région intergénique COI-COII de l'ADNmt**

*Apis m. cerana* a été utilisée pour raciner l'arbre. *Apis m. mellifera*, l'abeille noire, apparaît dans la lignée M (modifié d'après Cornuet *et al.*, 1991). Les chiffres sur les branches de l'arbre correspondent à une distance calculée en pourcentage de différence.



Par ailleurs, une cinquième lignée évolutive a depuis été identifiée (Alburaki *et al.*, 2011). Il s'agit de la lignée Z, distribuée au Proche-Orient (du nord de l'Egypte jusqu'en Iran en passant par l'ensemble de la Péninsule Arabique). Cette lignée contient les sous-espèces *Apis m. larmackii*, *syriaca* et *yemenitica*. Elle serait la plus ancienne, et constituerait le point de départ de l'expansion d'*Apis mellifera*.

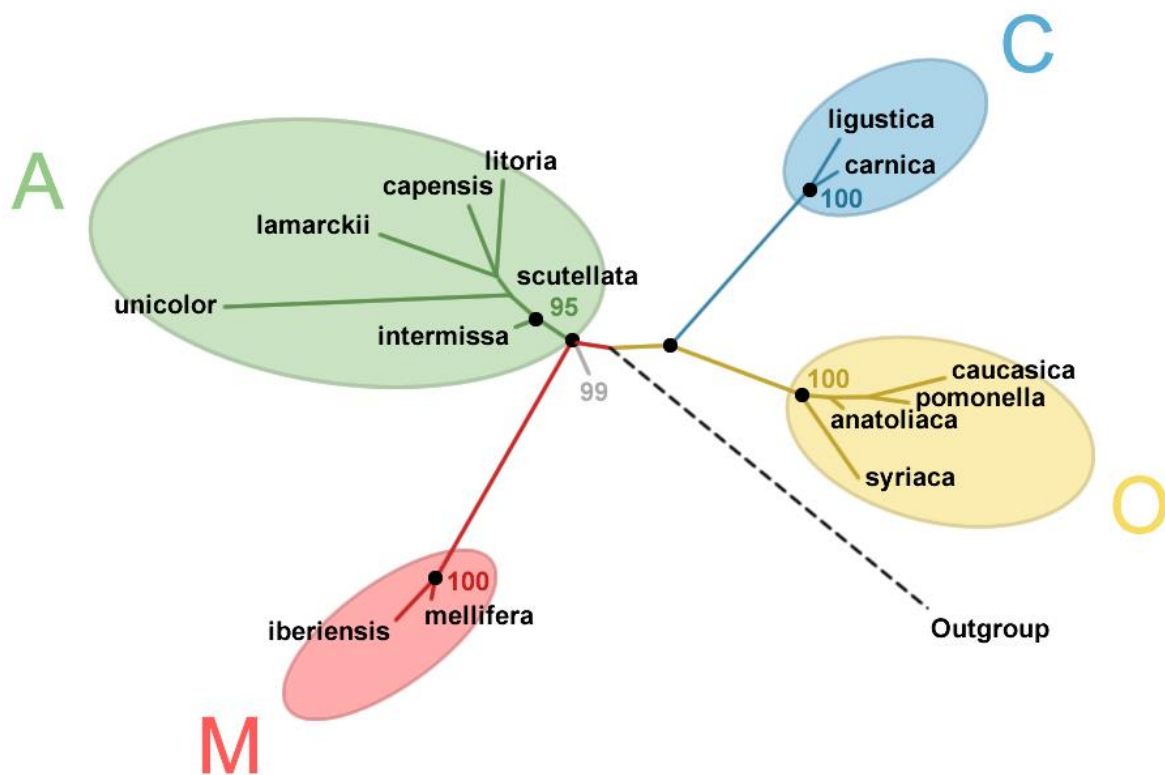
### 3. Marqueurs de l'ADN nucléaire : les microsatellites

Les microsatellites sont des motifs d'un à six nucléotides qui se répètent en tandem de manière variable d'un allèle à l'autre. Nous nous intéressons ici à l'ADN nucléaire, qui contient chez l'abeille plus de cinq cents microsatellites (Estoup *et al.*, 1995 ; Garnery *et al.*, 1998b ; Solignac *et al.*, 2003) et permet d'établir les généalogies paternelles d'une colonie appelées fratries (Arnold *et al.*, 2002 ; Chaline *et al.*, 2004).

L'étude des microsatellites a permis de confirmer à nouveau les quatre lignées évolutives et de distinguer les lignées O et C (Figure 3). La lignée Z a été confirmée plus tardivement, par Alburaki *et al.* en 2013.

**Figure 3 : Phylogénie des sous-espèces d'*Apis mellifera* basée sur les séquences des génomes**

*Apis m. cerana* a été utilisée pour raciner l'arbre (modifié d'après Whitfield *et al.*, 2006).



La lignée M est aujourd'hui la plus étudiée à l'aide des microsatellites, ce qui permet la mise en évidence d'hybridations avec d'autres lignées.

## II. Hybridation d'*Apis mellifera mellifera*

### A. Une faible diversité génétique au sein de la lignée M

Durant le Quaternaire, l'Europe traverse deux alternances de périodes glaciaires et interglaciaires.

Dans un premier temps, en période glaciaire, les abeilles mellifères réduisent leur aire de répartition en migrant vers les régions les plus chaudes, qui constituent alors des zones refuge. L'effectif des populations, et par là même leur pool génétique, se réduit proportionnellement à la surface des

biotopes : un goulot d'étranglement se met en place, entraînant des phénomènes de dérive génétique et de consanguinité.

Dans un second temps, en période interglaciaire, les zones refuges deviennent les centres d'impulsion des recolonisations. Le niveau de diversité génétique conservé dans ces zones refuges pendant les glaciations est donc crucial : plus il est élevé, plus il offre de possibilités d'adaptation aux conditions locales rencontrées par les abeilles mellifères à la faveur de leur recolonisation.

Or, les lignées évolutives n'ont pas été impactées de la même manière par les deux alternances de périodes glaciaires et interglaciaires qui ont entraîné deux cycles de refuge/colonisation :

- La lignée A, répartie sur le continent africain, ne subit pas l'effet des glaciations et conserve donc le niveau de diversité génétique le plus élevé
- La lignée C se répartit dans deux zones refuges : l'Italie et la Grèce. A la fin des périodes glaciaires, les populations des deux zones brassent leurs haplotypes : une diversité génétique importante est ainsi maintenue
- La lignée O garde un contact avec la lignée Z, ce qui permet les échanges de gènes et participe au maintien de la diversité génétique
- La lignée M est acculée dans une seule zone refuge : la péninsule Ibérique.

L'étude des microsatellites (Tableau 2) a démontré cette plus faible diversité génétique au sein de la lignée M (Estoup, 1995 ; Franck *et al.*, 1998 ; Garnery *et al.*, 1998a).

**Tableau 2 : Fréquence des hétérozygotes au sein des lignées évolutives, calculée sur la base de 11 *loci* microsatellites (modifié d'après Garnery, 2017)**

	Lignée A	Lignée C	Lignée O	Lignée M
Fréquence des hétérozygotes	0,571-0,798	0,413-0,666	0,615-0,643	0,314-0,486

## **B. Origines de l'hybridation d'*Apis m. mellifera* en France**

Les changements récents des paramètres biologiques et climatiques dans les niches écologiques des populations d'abeilles, couplés aux introductions de reines et d'essaims ou encore aux transhumances pratiquées par certains apiculteurs, ont mis en contact des populations d'abeilles autrefois isolées géographiquement (allopatriques).

Ces populations appartiennent initialement à des lignées évolutives bien différenciées sur la base des marqueurs morphométriques et moléculaires, et occupent des aires géographiques distinctes. Cela conduit à utiliser le terme « hybridation » pour désigner le brassage génétique résultant de la mise en contact de ces populations d'abeilles, alors qu'il est généralement utilisé au niveau interspécifique, et non intraspécifique.

Historiquement, l'hybridation de l'abeille noire débute avec la recherche par certains apiculteurs de souches plus productives. Elle se traduit par l'importation dès les années soixante de sous-espèces allochtones : *Apis m. ligustica* et *carnica* dans un premier temps, puis *Apis m. caucasia*, et enfin l'abeille « triple hybride » (fécondation de reines italo-caucasiennes par des mâles d'abeille noire) dans les années quatre-vingt (Cornuet, 1979).

C'est ensuite la souche Buckfast, un multi-hybride sélectionné provenant de la lignée C à 70%, qui est introduite et s'hybride avec l'abeille noire. La base maternelle de cette lignée synthétique est constituée des haplotypes C1 et C3 (Garnery, 2017). Elle a été développée par le frère Adam, un apiculteur, à partir de différentes sous-espèces afin de combiner leurs qualités : production, tenue au cadre, douceur et résistance à *Acarapis woodi*. Cette base maternelle a été conservée jusqu'en 2007, date à laquelle certains éleveurs l'ont modifiée pour introduire l'haplotype A4, originellement réparti depuis l'Afrique centrale jusqu'en Afrique du Sud.

Dès le milieu des années 1990, ce ne sont plus les objectifs de production mais la hausse du taux de pertes hivernales des colonies, d'origine multifactorielle, qui entretient les importations de sous-espèces allochtones (Shen *et al.*, 2005 ; Boncristiani *et al.*, 2009 ; Mullin *et al.*, 2010 ; Van Engelsdorp et Meixner, 2010 ; Villemant *et al.*, 2011). Elles sont alors utilisées pour reconstituer les cheptels. Ce phénomène est accentué par le manque d'éleveurs d'abeilles noires, à l'origine d'une pénurie de reines et d'essaims. Des caractères non adaptatifs sont alors introduits dans les cheptels, avec le risque d'augmenter le taux de pertes par le filtre de la sélection naturelle.

### **C. Etat des lieux de l'hybridation de l'abeille noire en France**

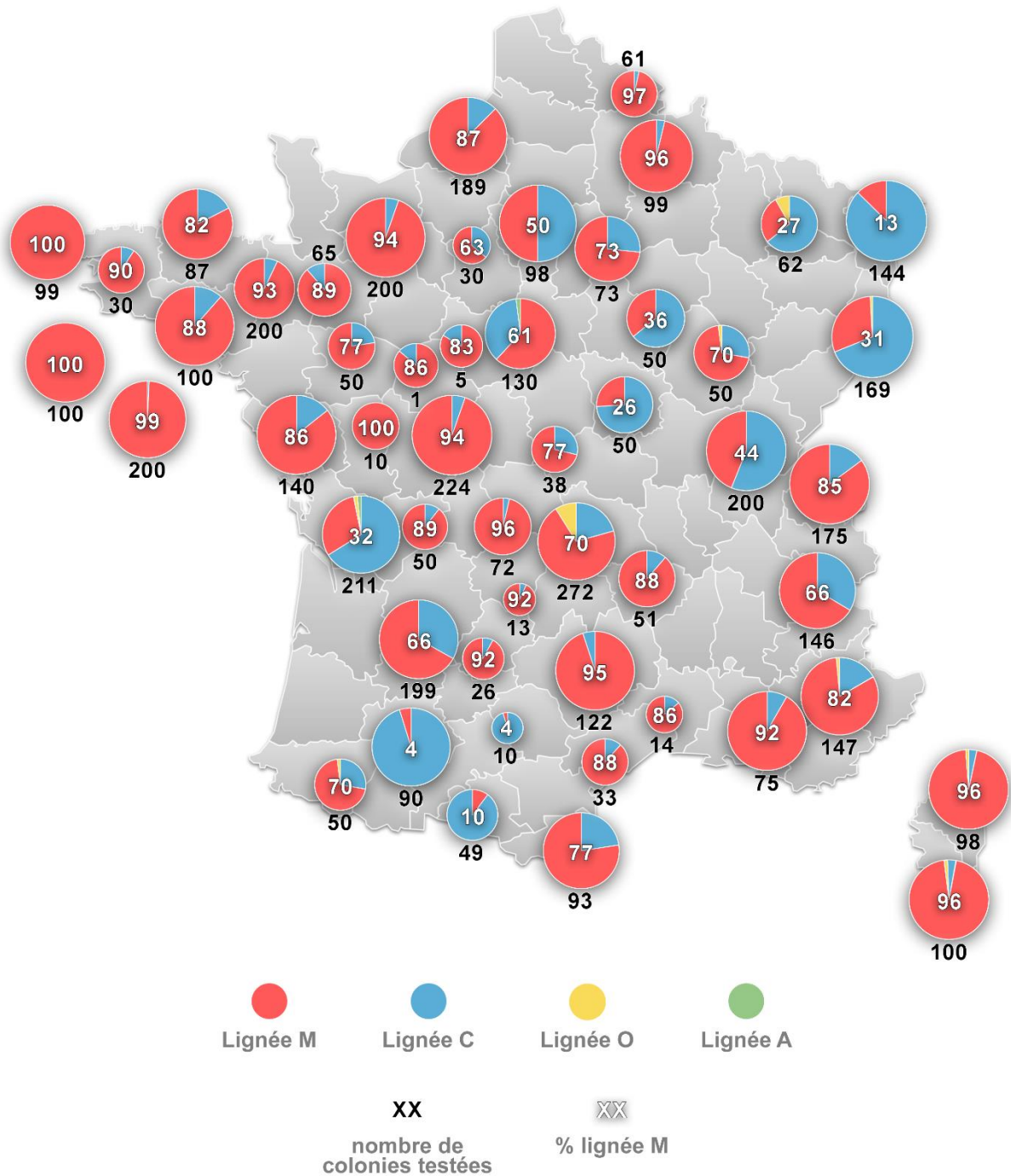
L'importation massive des sous-espèces *Apis m. carnica* et *ligustica* au détriment de l'abeille noire est rapportée dès les années quatre-vingt (Adam, 1983). Il en résulte des taux d'hybridation (ou taux d'introggression) importants, comme au Danemark (Jensen *et al.*, 2015) ou encore en France (Garnery *et al.*, 1998a ; Garnery *et al.*, 1998b ; Perrier *et al.*, 2003). En Suisse et en France, la souche Buckfast est désormais majoritaire. En France, une situation extrême existe dans certaines localités où l'abeille noire a disparu, remplacée par *Apis m. carnica* (Moritz *et al.*, 1986).

De plus, des niveaux d'introggression importants sont aujourd'hui observés dans les régions françaises (Figure 4).

**Figure 4 : Niveaux d'introgression mitochondriale des populations françaises (modifié d'après FEAGA, 2007-2008)**

Les chiffres noirs à l'extérieur des diagrammes représentent le nombre de colonies étudiées pour chaque région. Les chiffres blancs à l'intérieur des diagrammes représentent le pourcentage de colonies appartenant à la lignée M parmi la population étudiée.

Les haplotypes locaux de la lignée M deviennent minoritaires dans certaines régions (au Sud-Ouest et à l'Est de la France notamment).



## D. Conséquences de l'hybridation

Dans le cas général d'*Apis mellifera*, l'hybridation présente un risque de perte des adaptations des populations à leur biotope. Dans le cas particulier de l'abeille noire, il peut s'agir :

- De la résistance aux basses températures (Ruttner, 1987)
- De la capacité à voler sur de longues distances et en conditions venteuses (Ruttner, 1987)
- De la propension à réaliser des récoltes de pollen et de propolis abondantes (Imdorf *et al.*, 2010).

Ces caractères participent à son adaptation au climat tempéré européen. L'hybridation de l'abeille noire pourrait entraîner la perte des caractères responsables de sa différenciation adaptative, conduisant à une homogénéisation de la structure génétique de la sous-espèce.

L'importation des sous-espèces allochtones conduit non seulement à une hybridation de l'abeille noire, mais également à une sélection de souches qui amène les apiculteurs à utiliser une plus faible diversité génétique pour constituer leurs cheptels. L'effectif efficace des populations se réduit considérablement : elles ne sont plus soumises à la sélection naturelle mais évoluent sous le régime des petits effectifs soumis à la dérive génétique et à la consanguinité. Ce phénomène complique l'adaptation des colonies à leur environnement : si la sélection naturelle élimine les colonies les moins bien adaptées, leur maintien artificiel par certains apiculteurs (nourrissement au sirop de sucre ou au sucre cristallisé candi) peut avoir pour conséquence la disparition des adaptations locales.

En effet, les sous-espèces importées pour des raisons de productivité montrent parfois une adaptation médiocre aux environnements locaux :

- Hivernation sur un nombre de cadres (6 à 8 cadres) plus important que l'abeille noire (4 à 5 cadres) impliquant une consommation hivernale supérieure pouvant nécessiter un nourrissement artificiel
- Développement trop précoce au printemps entraînant un décalage entre force de la colonie et intensité des floraisons, avec risque de famine (Imdorf *et al.*, 2010).

Enfin, les sous-espèces allochtones véhiculent des pathogènes avec lesquels elles ont co-évolué, ce qui n'est pas forcément le cas des sous-espèces locales. C'est sur ce modèle que l'acarien *Varroa destructor* diffusa d'*Apis cerana* (originale d'Asie) à *Apis mellifera* en Europe (Vidal-Naquet, 2015). Or, l'abeille mellifère ne présente pas le comportement d'épouillement développé par l'abeille asiatique, ce qui favorise le développement du varroa dans les colonies d'abeilles noires.

# Deuxième partie : Étude expérimentale

---

## I. Problématique et objectifs de l'étude

### A. Problématique de l'étude

La diminution de la taille des populations, l'hybridation et l'homogénéisation des pools géniques liées aux importations d'abeilles allochtones sont aujourd'hui des menaces pour la diversité génétique et la conservation de l'abeille noire. Elles sont accentuées par la faible diversité génétique de la lignée M à laquelle elle appartient.

Cette hybridation n'est sans doute pas sans effet sur le cycle biologique des colonies et a comme répercussion l'augmentation du nourrissage pour compenser la baisse d'adaptation de celles-ci à leur environnement. Les conséquences pourraient être multiples :

- La disparition de l'abeille noire, véritable patrimoine vivant évolutif et adaptatif en France
- Une irrégularité de la production de miel liée à l'hétérogénéité génétique des populations d'abeilles
- Une baisse de la qualité des produits de la ruche avec pour corollaire un doute induit auprès des consommateurs sur le caractère naturel du miel du fait du risque d'édulcoration lors du nourrissage au sirop.

### B. Objectifs de l'étude

Si les taux d'introggression et leurs conséquences possibles sur la génétique et la survie des populations d'abeilles noires françaises sont bien documentés, aucune étude ne s'est encore intéressée à leurs conséquences en termes de performances apicoles. L'objectif de cette étude était de comprendre l'impact de l'hybridation sur la productivité de l'abeille noire, sa gestion des réserves, sa dynamique d'élevage de couvain, ou encore sa rusticité.

La plupart des apiculteurs en observent les effets, sans pour autant pouvoir s'appuyer sur une démonstration scientifique objective, dont les résultats pourraient les amener à mieux adapter leurs pratiques apicoles.

L'apport de l'étude semblait intéressant à plusieurs niveaux :

- Pour l'apiculteur travaillant déjà avec l'abeille noire, connaître les effets de l'hybridation pourrait l'amener à optimiser ses pratiques, renforcer les moyens de sélection de souches pures afin de maximiser sa production, ou encore minimiser les pertes d'essaims et mieux adapter son nourrissage et son hivernage. Une meilleure valorisation des productions semble aussi envisageable si des qualités particulières du miel d'abeille noire venaient à être démontrées
- Pour l'apiculteur souhaitant renouer avec l'abeille noire, une démonstration objective de ses adaptations aux terroirs locaux serait un argument de poids
- Si elles étaient mises en évidence, les qualités nutritionnelles et organoleptiques particulières du miel d'abeille noire pourraient séduire le consommateur soucieux d'adopter un mode de vie plus responsable. La Suisse et la Belgique sont des exemples de pays dont les consommateurs ont été massivement séduits par la création d'une gamme de miels spécifiques (Gauthier, 2018)



- Concernant la recherche fondamentale et appliquée, une telle étude comparative n'a encore jamais été menée en France.

Les résultats expérimentaux pourraient donc permettre de revaloriser l'abeille noire en la plaçant au cœur d'un cercle vertueux d'apiculture durable soutenu par les piliers :

- Culturel, avec la sauvegarde d'une espèce endémique et patrimoniale en voie de disparition
- Sociétal, en satisfaisant les besoins du consommateur
- Économique, en valorisant le travail de l'apiculteur.

Pour ce faire, des colonies d'abeilles noires ont été comparées à des colonies d'abeilles hybridées sur la base de 3 catégories de critères :

#### 1. Rusticité :

- Estimation de la charge et de la potentielle résistance aux agents infectieux et parasitaires
- Caractérisation du cycle biologique de chaque groupe et étude de son adéquation avec les ressources environnementales
- Évaluation du besoin éventuel de nourrissage.

#### 2. Production :

- Caractérisation du développement du couvain et du stockage du pollen et du nectar
- Quantification de la production de miel.

#### 3. Qualité :

- Analyse chimique et organoleptique des miels.

## II. Protocole général et méthode d'échantillonnage

### A. Déroulement général de l'étude

L'étude a été menée durant les principaux mois de la saison apicole 2022 (de Mai à Août 2022). Son déroulement général est présenté en Annexe 1.

### B. Méthode d'échantillonnage

#### 1. Choix du rucher expérimental

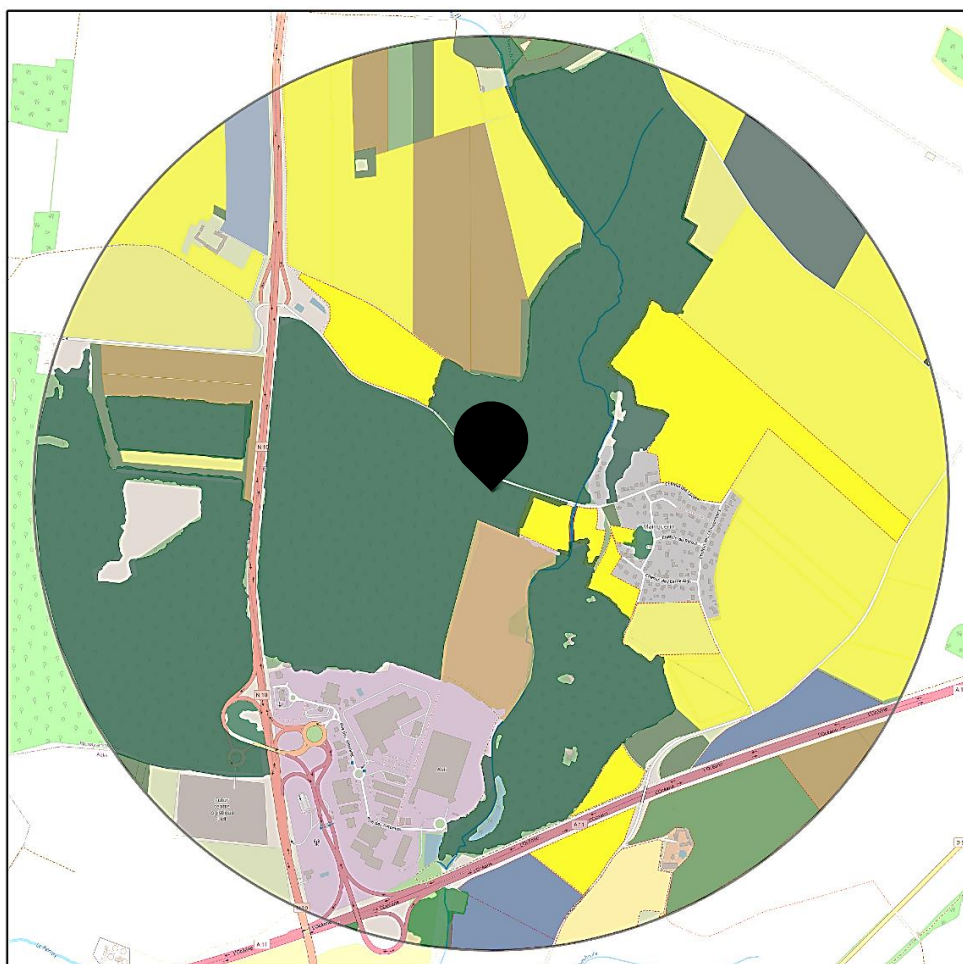
Les critères de choix du rucher expérimental étaient les suivants :

- Les ressources environnementales : le rucher et ses alentours devaient fournir aux colonies de l'étude suffisamment de nectar et de pollen tout au long de la saison apicole, afin de limiter au maximum les intrants distribués aux colonies (sirop, candi et complémentation protéique)
- Les conditions environnementales : le rucher devait bénéficier d'un ombrage et d'un ensoleillement adaptés au développement des colonies, d'une protection contre les vents dominants et d'une humidité modérée
- La sécurité : les colonies devaient bénéficier d'un rucher fermé afin d'écartier tout risque de vol ou d'interaction avec la faune sauvage.












Conformément à ces critères de choix, le rucher a été implanté à proximité de la commune d'Ablis (78 660) dans les Yvelines, sur un terrain mis à disposition par la communauté d'agglomération Rambouillet Territoires (Figure 5). Les coordonnées GPS étaient : 48°32'19.1"N 1°50'22.7"E.

**Figure 5 : Emplacement du rucher expérimental, réseau hydrographique et composition de la flore de l'aire de butinage**

*Un rayon de 1500 mètres de diamètre autour du rucher a été représenté (BeeGIS (itsap.asso.fr), consulté le 11/10/2022).*



**Milieu agricole (légende apicole)**

- |  |  |
|--|--|
|  Autre culture fourragère |  Bordure non cultivée |
|  Jachère                  |  Prairie temporaire   |
|  Pois                     |  Colza                |
|  Maïs grain et ensilage   |  Céréale              |
|  Féverole                 |  Luzerne              |
|  Tournesol                |  |

**Milieu forestier**

- |   |
|---|
|  Mélange de feuillus |
|---|

L'aire de butinage des colonies incluses dans l'étude comprenait des ressources nectarifières et pollinifères diversifiées et régulières tout au long de la saison apicole. Il s'agissait (BeeGIS (itsap.asso.fr), consulté le 11/10/2022) :

- Au printemps : de cultures de colza, féverolle et pois (respectivement 5,85%, 2,19% et 0,91% de l'aire de butinage)
- En été : de culture de tournesol (0,97% de l'aire de butinage)
- En automne : de culture de luzerne (2,29% de l'aire de butinage)
- Tout au long de la saison apicole : de haies, jachères et prairies temporaires (respectivement 5,22%, 2,01% et 0,41% de l'aire de butinage).

La proportion de cultures certifiées en agriculture biologique était de 12,41% de l'aire de butinage. Le reste des cultures était exploité en agriculture conventionnelle.

Le rucher bénéficiait d'une orientation Sud-Est en lisière de clairière, abritée des vents dominants.

## **2. Critères d'inclusion, de non-inclusion et d'exclusion des colonies**

L'étude incluait 22 colonies d'abeilles dont 11 colonies d'abeilles hybridées et 11 colonies d'abeilles noires dont la sous-espèce a été confirmée génétiquement et morphologiquement :

- Les colonies d'abeilles hybridées ont été tirées au hasard parmi les colonies initialement présentes dans le rucher expérimental
- Les colonies d'abeilles noires ont été tirées au hasard parmi 3 origines géographiques dont le biotope était similaire à celui du rucher expérimental et étaient réparties comme suit :
  - 5 colonies originaires du Morbihan (56)
  - 3 colonies originaires de l'Orne (61)
  - 3 colonies originaires du Calvados (14).

Toute colonie dont la reine était âgée de plus de deux ans n'était pas incluse dans l'étude.

Toute colonie morte en cours d'étude ou dont l'état sanitaire se dégradait était exclue de l'étude. Les principaux signes cliniques recherchés étaient les suivants (Vidal-Naquet, 2011) :

- Ouvrières mortes « en tapis » sur le devant de la ruche
- Planche d'envol souillée de déjections
- Présence de varroas phorétiques
- Ouvrières avec signes cliniques (ailes déformées ou signes neurologiques)
- Présence de couvain mosaïque ou momifié.

## **C. Conduite des colonies**

### **1. Matériel apicole**

Les ruches étaient au format Dadant 10 cadres en bois avec plateau grillagé anti-varroa (en bois ou en plastique), couvre-cadres en bois et toit en tôle non isolé. Les supports de ruche étaient composés de deux parpaings.

Les hausses utilisées en cours de saison étaient des hausses en bois au format Dadant 9 cadres.

## 2. Installation et soins aux colonies

Les colonies hybridées ont hiverné dans le rucher expérimental. Les colonies noires ont été installées en deux temps au rucher expérimental à partir du mois d'Avril (Annexe 1). Dès leur arrivée, elles ont été transférées en ruches et deux cadres de corps cirés ont été ajoutés de part et d'autre du nid à couvain.

Au début de l'étude, les colonies hybridées occupaient 10 cadres construits tandis que les colonies noires occupaient seulement 6 cadres construits.

Toutes les colonies ont été conduites par le même apiculteur sur l'ensemble de la période d'étude. Aucun intrant alimentaire ou chimique n'a été utilisé durant l'étude.

## III. Protocoles expérimentaux

### A. Analyses génétiques

En vue de leur inclusion dans l'étude, les 22 colonies échantillonnées ont été testées génétiquement afin de déterminer leur niveau d'introggression génétique et de les attribuer aux deux groupes d'étude. Les groupes d'étude ont été distingués sur le critère suivant :

- Les colonies noires devaient présenter un taux d'introggression <20%
- Les colonies hybridées devaient présenter un taux d'introggression >20%.

Deux types de marqueurs moléculaires complémentaires ont été utilisés pour caractériser la diversité génétique des colonies : l'ADN mitochondrial (région intergénique COI-COII) et l'ADN nucléaire (14 *loci* microsatellites).

#### 1. Prélèvement d'ouvrières

Pour chaque colonie, 24 ouvrières ont été prélevées (Annexe 1) et conservées dans des tubes Falcon de 40 mL remplis d'éthanol technique à 96% jusqu'à l'étape d'extraction de l'ADN.

Afin de limiter le risque d'échantillonner une ouvrière n'appartenant pas à la colonie (phénomène de dérive), les échantillons ont été prélevés sur un cadre de couvain naissant.

#### 2. Extraction de l'ADN

L'ADN total de chaque échantillon a été extrait par la méthode Chelex en tubes (Walsh *et al.*, 1991 modifié par Garnery *et al.*, 1995) à partir des têtes d'abeilles. Une extraction d'ADN total a été possible car les amorces utilisées dans l'étape de Polymerase Chain Reaction (PCR) sont suffisamment spécifiques et discriminantes, ce qui évite d'avoir à séparer l'ADNmt de l'ADN nucléaire.

Cette méthode est basée sur l'ajout d'une solution de 600 µL de Chelex 10% aux broyats des têtes, ce qui permet de chélater les cations bivalents dont certains sont inhibiteurs de PCR. L'ajout d'une solution de protéinase K a ensuite permis de dégrader les ADNases susceptibles d'altérer la qualité de l'ADN après 1h30 d'incubation à 50°C. La protéinase a ensuite été dégradée par chauffage à 95°C pendant 15 minutes.

L'ADN extrait a été centrifugé pendant 10 minutes à 12 000 rpm puis conservé à -20°C. Il a été utilisé à la fois pour l'étude de la diversité mitochondriale et nucléaire.

### 3. Étude de la diversité mitochondriale

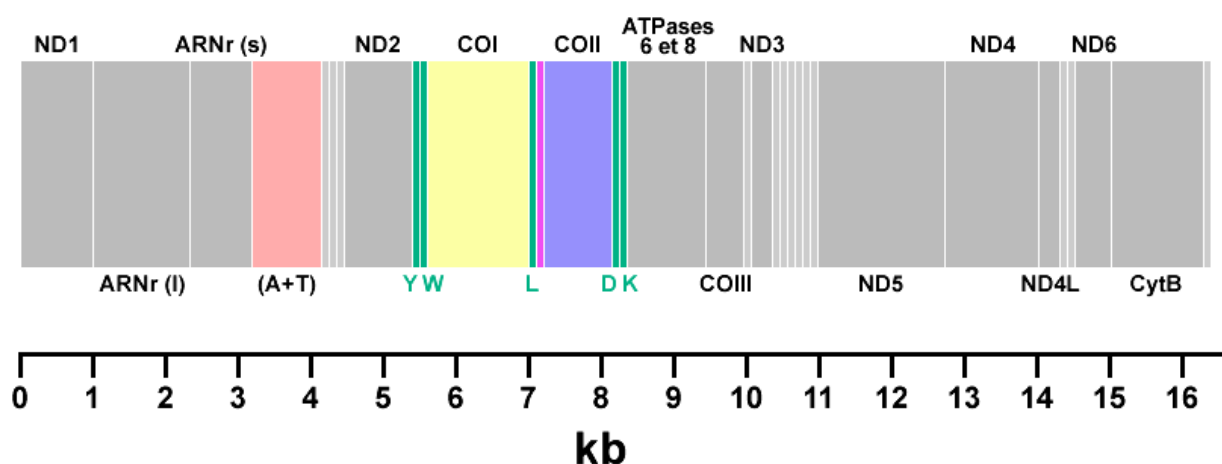
#### a. Principe général

L'ADNmt est un excellent marqueur génétique de la colonie car il est à transmission maternelle stricte. La reine d'une colonie transmet son ADNmt à tous ses descendants : ouvrières, faux-bourçons (mâles) et reines filles. L'analyse génétique d'une seule ouvrière permet donc de caractériser l'ensemble de la colonie en déterminant son origine maternelle (lignée de la reine) et en ayant une première estimation du taux d'introggression à l'échelle de la population (par les lignées en présence).

Chez l'abeille, l'ADNmt a une taille variable comprise entre 16 500 et 17 000 paires de bases (pb). La variabilité de taille de cette molécule a été étudiée (Smith et Brown, 1990 ; Hall et Smith, 1991 ; Smith, 1991 ; Smith *et al.*, 1997), permettant la mise en évidence d'une région d'ADNmt dont la taille varie en fonction de l'appartenance de la colonie aux lignées A, C, M et O (Figure 6).

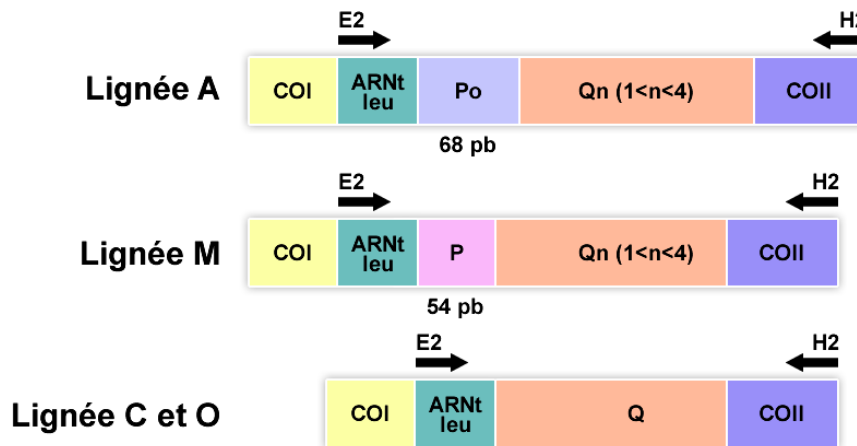
Cette région, utilisée pour le génotypage des colonies de l'étude, est située entre les séquences COI et COII du gène codant pour les sous-unités I et II de la cytochrome oxydase.

**Figure 6 : Différentes régions de l'ADNmt chez l'abeille et position de la région intergénique COI-COII (modifié d'après Garnery, 1992)**



La région intergénique COI-COII contient le gène de l'ARNt<sup>leu</sup> et une séquence non codante dont la détermination de la composition permet d'associer l'échantillon aux lignées A, C, M et O (Figure 7).

**Figure 7 : Polymorphisme observable entre les sous-unités COI-COII dans les lignées A, C, M et O qui permet leur distinction (modifié d'après Garnery, 1992)**



La longueur de la séquence non codante varie entre 200 et 800 pb. Elle se subdivise en deux parties (Cornuet *et al.*, 1991) :

- La séquence P admet deux versions : P et Po, cette dernière étant plus courte de 14 pb (un mécanisme d'insertion/délétion serait à l'origine de cette différence) ;
- La séquence Q mesure 195 pb et son extrémité terminale 3' est presque identique à celle de Po (Garnery *et al.*, 1992).

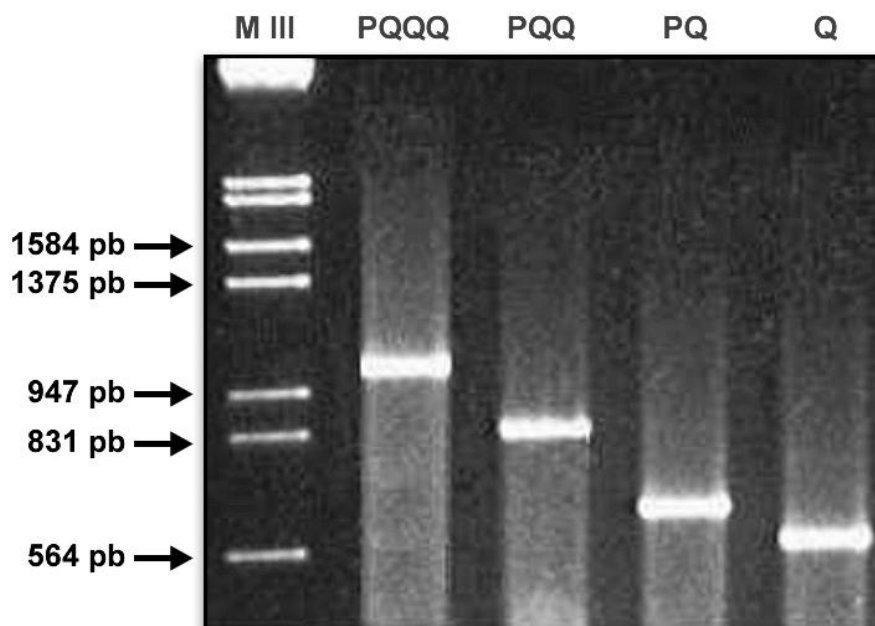
*b. Détermination de la lignée maternelle de la colonie*

Afin de déterminer l'organisation structurale de la région intergénique COI-COII des colonies de l'étude, celle-ci a été amplifiée par PCR grâce aux amorces E2 (5'-GGCAGAATAAGTGCATTG-3' sur le gène ARNt leu) et H2 (5'-CAATATCATTGATGACC-3' sur le gène COII), à partir de 1,2 µL d'ADN mélangé à 23 µL de mélange réactionnel. Un volume de 2 µL de produit de PCR dilué dans 4 µL de Bleu de Bromophénol ½ a ensuite été déposé sur gel d'agarose 1,4% et soumis à une électrophorèse menée en tampon TBE 1X.

Le résultat de l'électrophorèse a été révélé par rayons UV, après immersion du gel d'agarose pendant 10 minutes dans une solution de bromure d'éthidium (BET).

Cette première étape a permis de distinguer les lignées A et M d'un côté et C et O de l'autre (Figure 8) par la taille de la séquence non codante de la région intergénique COI-COII, et de vérifier que la PCR a bien fonctionné avant d'entamer l'étape de digestion.

**Figure 8 : Profils d'électrophorèse correspondant aux différentes longueurs des amplicons de la région non codante de COI-COII déterminées par le marqueur de poids moléculaire commercial M III**



- La longueur Q caractérise les lignées C et O ;
- Les longueurs PQ, PQQ et PQQQ caractérisent la lignée M ;
- Les longueurs PoQ, PoQQ et PoQQQ, caractéristiques de la lignée A, sont confondues avec PQ, PQQ et PQQQ, ce qui empêche de différencier les lignées A et M à ce stade, car la différence de taille entre P et Po n'est pas visible sur gel d'agarose.

*c. Détermination de l'haplotype de la colonie*

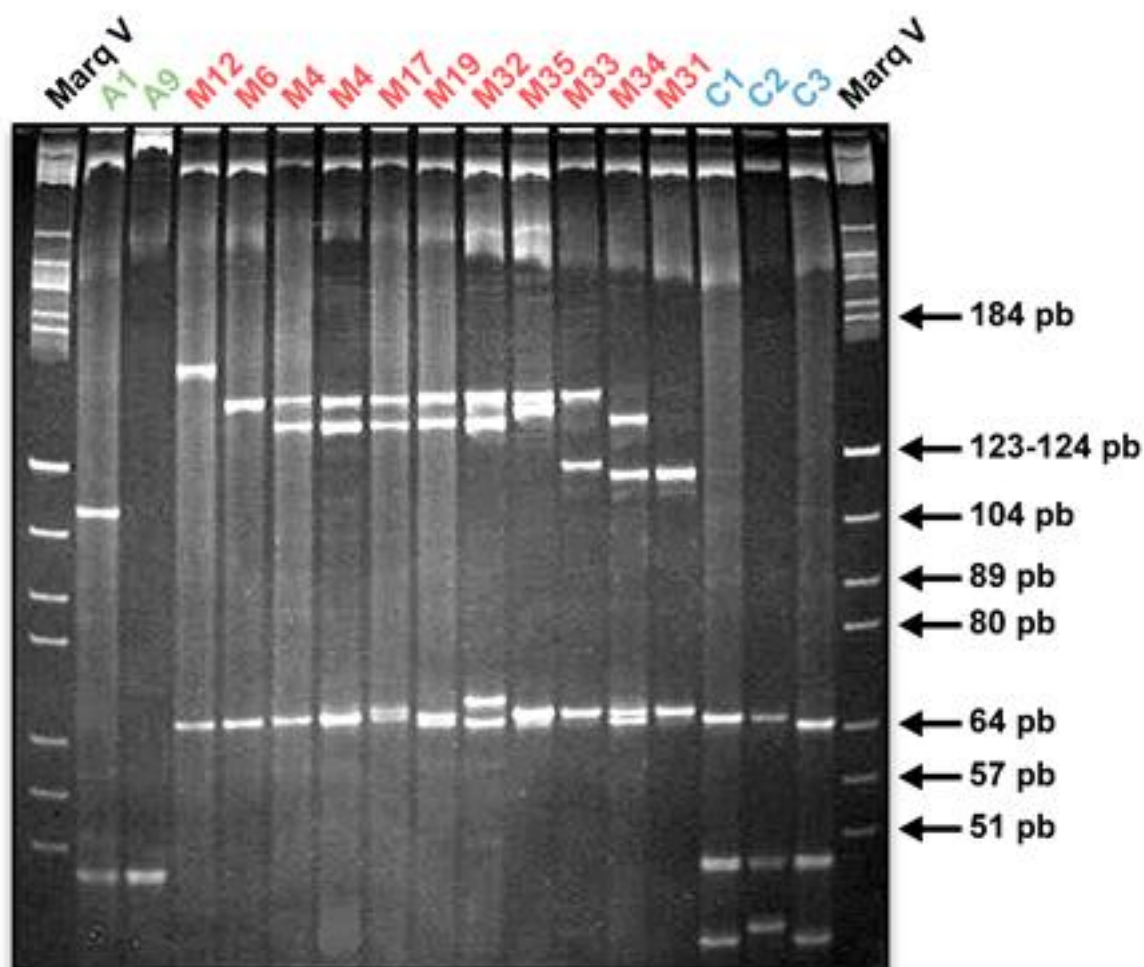
La région intergénique COI-COII est très riche en paires AT. L'étude du polymorphisme des sites de restriction TTTAAA qui la composent, reconnus par l'enzyme *DraI*, permet de :

- Distinguer les lignées A et M d'une part et C et O d'autre part
- Déterminer l'haplotype de la colonie (par exemple M2 ou M3 pour une colonie appartenant à la lignée M). L'haplotype définit la variabilité génétique de l'ADNmt (donc d'origine maternelle) au sein de la région intergénique.

Pour cela, le reste du produit de PCR a ensuite été digéré par l'enzyme de restriction *DraI* pendant 48 heures à 37°C (température d'activité enzymatique optimale). Cette enzyme coupe la séquence de la région intergénique (par exemple la séquence Q pour la lignée C) en différents fragments dès lors qu'elle rencontre un motif TTTAAA. Ces fragments migrent ensuite selon leur taille dans un gel polyacrylamide à 7% soumis à électrophorèse (Figure 9).

**Figure 9 : Profils de migration de différents haplotypes des lignées A, C et M après digestion par l'enzyme *DraI***

Les chiffres correspondant au numéro d'haplotype (A1 est l'haplotype 1 de la lignée A). La taille des fragments est révélée par le marqueur de poids moléculaire commercial M V.



#### 4. Étude de la diversité nucléaire

##### a. Principe général

L'étude de la diversité mitochondriale permet de caractériser la diversité populationnelle au sein du rucher expérimental grâce aux marqueurs mitochondriaux à transmission maternelle stricte. Ces derniers ont peu d'intérêt dans la caractérisation de la diversité intra-coloniale, puisque toutes les abeilles issues d'une même reine présentent le génotype de la reine à la mutation près.

Les marqueurs utilisés afin de caractériser la diversité intra-coloniale sont les marqueurs microsatellites à hérédité bi-parentale.

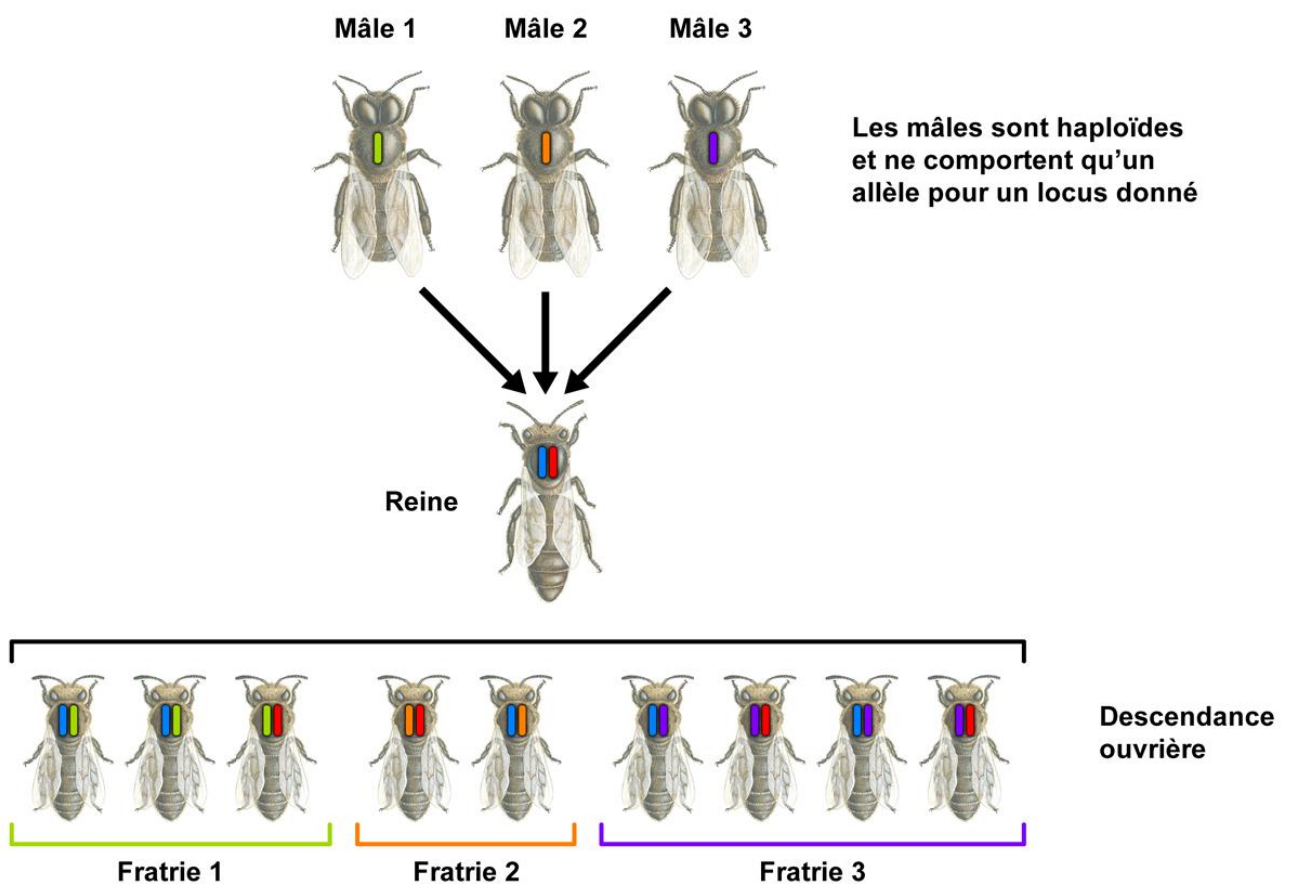
L'abeille est un insecte polyandre : 7 à 17 mâles vont ainsi féconder la reine vierge et diffuser leur patrimoine génétique de manière inégale dans la descendance, car la quantité de spermatozoïdes déposée peut varier entre les mâles (Winston, 1991).



Des fratries apparaissent alors dans la descendance (il y aura autant de fratries que de mâles féconds, Figure 10). Ainsi, pour un même locus, le génotype de l'ouvrière pourra varier en fonction de celui de la reine (homozygote ou hétérozygote à ce locus) et du mâle fécondant (qui est haploïde donc ne contient qu'un seul allèle par locus). La connaissance du mécanisme de polyandrie permet par la suite de reconstituer le génotype de la reine et des mâles féconds à partir de celui des ouvrières et de déterminer le taux d'introgression de chaque individu et de la colonie.

**Figure 10 : Principe de polyandrie illustré par la fécondation d'une reine hétérozygote (allèles bleu et rouge) à un locus donné**

*Par souci de simplification, seuls 3 mâles féconds sont représentés, tous porteurs d'un allèle différent au locus (respectivement vert, orange et violet). Trois fratries différentes sont observées, de taille inégale, proportionnelle à la quantité de sperme déposé pour un mâle donné (modifié d'après Garnery, 2017).*



L'étude de la diversité nucléaire complète donc l'analyse mitochondriale en permettant de :

- Déterminer la diversité génétique d'une colonie (nombre d'allèles différents)
- Déterminer la variabilité génétique d'une colonie (fréquence des différents allèles)
- Déterminer les généalogies paternelles d'une colonie (fratries)
- Déterminer le niveau d'introgression d'une colonie grâce aux allèles diagnostiques d'une lignée. Pour cela, le génotype de la reine et des mâles a été déterminé de manière indirecte à partir de celui des ouvrières. Le taux d'introgression a ensuite été calculé pour la reine, les mâles et les ouvrières.

La formule utilisée pour le calcul du taux d'introgession a été la suivante :

$$\frac{\text{Nombre d'allèles diagnostiques des lignées hors lignée M}}{\text{Nombre d'allèles diagnostiques total}}$$

Les allèles diagnostiques sont des allèles caractéristiques d'une lignée, qui ont été fixés dans une population au cours de son histoire évolutive par le phénomène de dérive génétique.

#### *b. Diversité nucléaire*

L'étude de la diversité nucléaire s'appuie sur 14 *loci* utilisés en routine et regroupés en Plex (respectivement 6, 4 et 4 *loci* pour les Plex 1, 2 et 4). Chaque Plex regroupe les amorces spécifiques des *loci* correspondants.

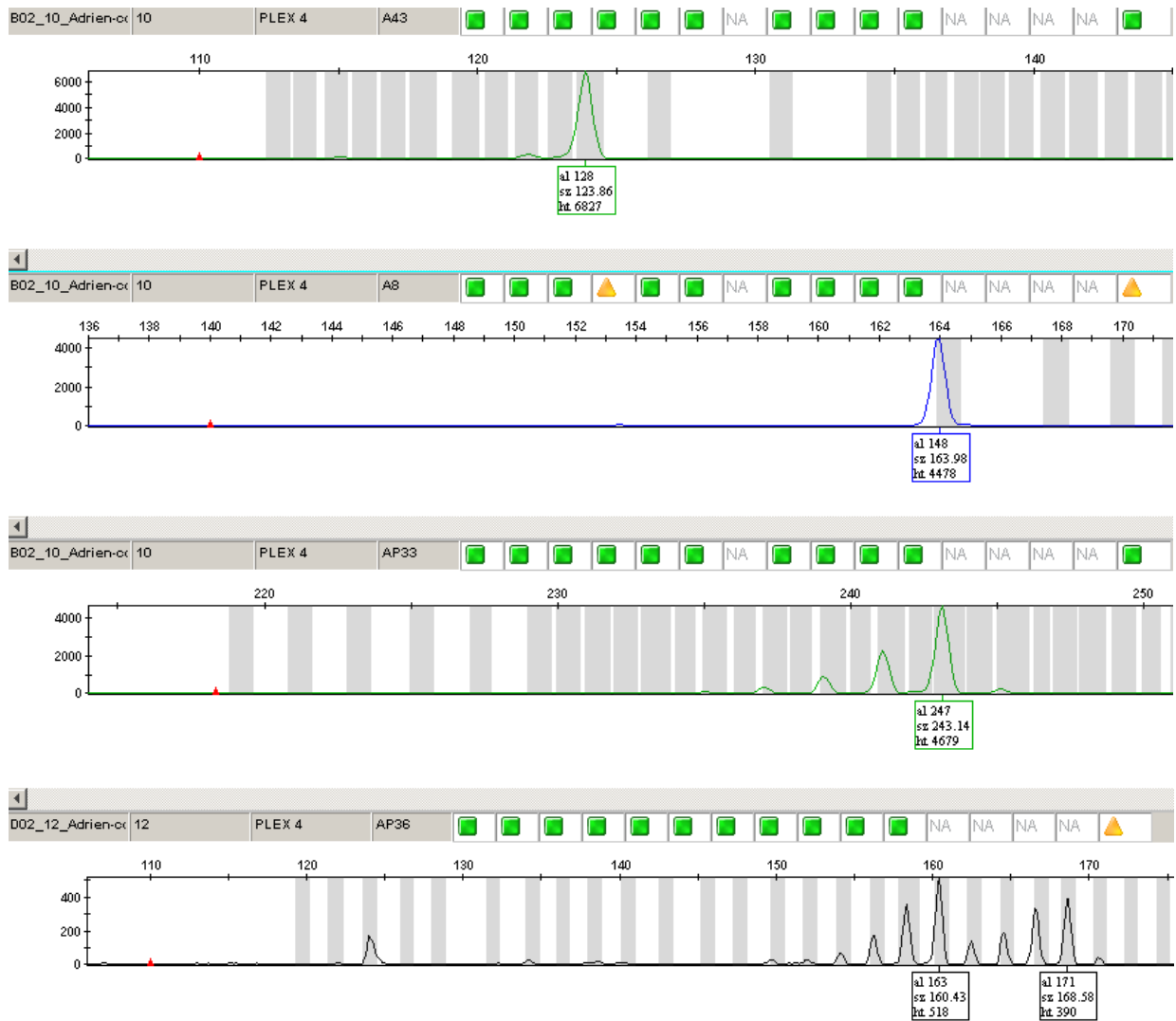
Dans chaque locus a été déterminé le nombre d'allèles différents (diversité) et leur fréquence (variabilité) grâce aux marqueurs microsatellites, qui sont des régions répétées au sein du génome (par exemple : [CA]<sub>n</sub>), à hérédité biparentale. Le nombre de répétitions de chaque motif détermine la taille de l'allèle.

L'analyse a été pratiquée sur 24 ouvrières pour chaque colonie de l'étude.

L'ADN a d'abord été amplifié par PCR selon les conditions générales décrites par Estoup *et al.* (1995), modifiées par Garnery *et al.* (1998b) à l'aide des amorces spécifiques fluorescentes contenues dans les Plex. Les amplicons ont ensuite été passés au séquenceur automatique 16 capillaires ABI3130XL qui permet de détecter chaque allèle (grâce à la fluorescence émise par les amorces) et de déterminer sa taille (grâce au temps de passage dans les capillaires). Les résultats ont été analysés par le logiciel GeneMapper software version 4 (Figure 11).

**Figure 11 : Capture d'écran du logiciel GeneMapper**

L'utilisation du logiciel permet la détermination des allèles des 4 loci (représentés par les couleurs noire, bleue et verte), du Plex 4 (amorces A8 (bleu), AP36 (noir), A43 (vert) et AP33 (vert)) pour une ouvrière appartenant à la colonie 12. Chaque pic correspond à la détection de la fluorescence donc à la présence d'un allèle. L'ouvrière est donc homozygote aux loci A8, A43 et AP33, et hétérozygote au locus AP36.



La matrice d'une Analyse en Coordonnées Principales (ACP) réalisée sur la matrice de distances interindividuelles (851 colonnes x 851 lignes) permet de placer les 24 abeilles échantillonnées pour chaque colonie de l'étude ainsi que la reine sous forme de nuages de points dans un ensemble délimitant une population de référence.

La diagonalisation de la matrice des distances interindividuelles permet d'obtenir des composantes principales qui sont les principaux axes mettant en évidence le maximum de variance exprimée entre les génotypes. Les axes obtenus sont indépendants (orthogonaux) et expriment donc un pourcentage de variance par rapport à l'ensemble des données de distances entre individus.

## **B. Analyses morphométriques**

### **1. Prélèvement d'ouvrières et préparation des ailes**

Pour chaque colonie, un prélèvement de 5 ouvrières conservées dans l'éthanol technique (96%) a été réalisé. Le protocole de préparation des ailes entre lame et lamelle était le suivant :

- Couper l'aile antérieure droite à sa base à l'aide d'un scalpel
- Tremper l'aile pendant une minute dans une coupelle d'eau afin de la réhydrater
- Déposer une goutte d'agent mouillant (obtenu par le mélange de 4 gouttes de liquide vaisselle dans 250 mL d'eau) sur une lame
- Saisir l'aile à sa base à l'aide d'une pince mousse et la déposer dans la goutte d'agent mouillant
- Déposer une goutte d'eau sur la lamelle et appliquer délicatement l'ensemble sur l'aile afin de limiter la formation de bulles d'air
- Photographier la lame à l'aide d'un microscope à champ plat afin d'éviter la déformation optique des nervures de l'aile. La numérisation de l'aile doit se faire le plus rapidement possible après préparation afin de limiter l'évaporation du liquide entre lame et lamelle.

Les photographies ont été réalisées à l'aide du microscope Axiolmager Z1 de Zeiss et du logiciel d'acquisition d'image Zen-Zeiss Efficient Navigation 3.5.

### **2. Utilisation du logiciel ApiClass**

Mis en place par le Muséum National d'Histoire Naturelle (MNHN) en collaboration avec Lionel Garnery, le logiciel ApiClass permet d'identifier les sous-espèces de l'abeille domestique grâce à la morphométrie géométrique alaire des ouvrières, basée sur les coordonnées de points-repère. Ils sont au nombre de 19 et correspondent aux intersections des nervures de l'aile antérieure des ouvrières de la colonie (Coulet *et al.*, 2011).

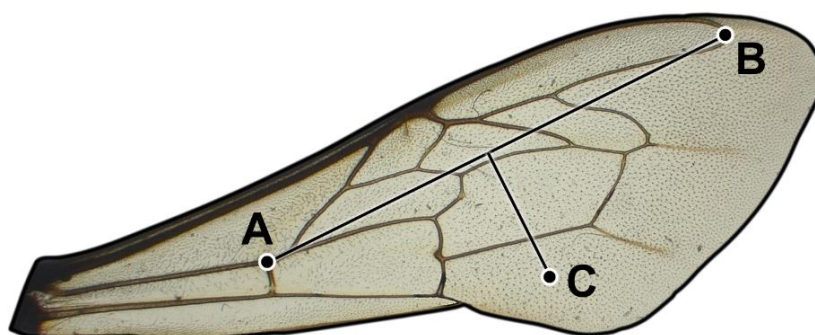
Ces points-repère sont prétraités manuellement sur les photographies d'ailes avant d'être analysées par un système expert. Celui-ci compare les coordonnées des points-repère avec ceux des ouvrières d'une base constituée de plus de 5000 individus dont l'appartenance aux différentes sous-espèces a été confirmée par analyses génétiques. Pour chaque ouvrière, la probabilité d'appartenance aux différentes sous-espèces est ensuite calculée par analyse statistique.

Le protocole d'utilisation du logiciel était le suivant :

- Ouvrir une photographie d'aile dans le logiciel
- Placer manuellement les points-repère A, B et C tels que repérés sur la Figure 12
- Lancer la reconnaissance automatique des 16 autres points par le logiciel
- Vérifier la position de ces points puis lancer l'analyse statistique.

**Figure 12 : Position des points-repère A, B et C à pointer manuellement sur le logiciel ApiClass (photographie personnelle)**

*Le point C sert uniquement à orienter l'aile et n'a pas de localisation précise.*



### **3. Interprétation des données**

Pour chaque colonie a été calculé le pourcentage moyen de probabilité d'appartenance à *Apis m. mellifera* parmi les 5 ouvrières testées. Le taux d'introgression a été obtenu par la formule :

$$1 - \text{Probabilité d'appartenance à } Apis m. mellifera$$

## **C. Analyses de pathogènes**

### **1. Prélèvement d'abeilles**

Les prélèvements d'abeilles ont été réalisés à deux moments clés dans le développement de la colonie :

- Au mois de Juin, car cette période correspond généralement au pic de population des colonies (Liebig, 1997). De plus, c'est au printemps que l'infection par des pathogènes réduit le plus la durée de vie des abeilles (Imdorf *et al.*, 2010)
- Lorsque la dynamique de développement du varroa admet une croissance exponentielle (Imdorf *et al.*, 2010) avec un second prélèvement au mois de Juillet (Annexe 1).

Pour chaque colonie, 50 ouvrières ont été prélevées sur cadre de couvain et stockées à -20°C avant leur transfert en laboratoire pour y être conservées à -80°C.

### **2. Extraction de l'ADN**

Pour chaque colonie, les 50 ouvrières échantillonnées ont été placées dans des tubes de 50 mL stériles préalablement refroidis dans de la glace. Ont été ajoutés 50 mL d'une solution de tampon phosphate (soit 1 mL par abeille). Le tout a été broyé 60 secondes à une vitesse de 6000 rpm dans un broyeur Ultra Turrax Ika. A l'issue du cycle, les tubes stériles ont été placés dans la glace quelques minutes afin de décanter le broyat.

Une partie de la suspension de broyage a été prélevée pour être transvasée dans 3 microtubes de 2 mL sous Poste de Sécurité Microbiologique (PSM). Deux des trois tubes ont été centrifugés pendant 10 minutes à 8,000xg en centrifugeuse réfrigérée à 4°C, le troisième a été conservé à -80°C. Le surnageant a été transvasé dans un microtube et l'opération de centrifugation a été répétée dans les mêmes conditions. Enfin, le dernier surnageant, appelé clarifiat, a été transvasé dans un nouveau microtube et conservé à -80°C jusqu'à l'étape d'extraction.

Les extractions d'ADN et d'ARN ont été effectuées grâce au kit d'extraction Nucleospin RNA de Macherey Nagel.

La rétrotranscription des ARN en ADNc a été effectuée immédiatement après l'étape d'extraction grâce au kit I Script cDNA Synthesis de Biorad.

### 3. Détection des pathogènes

La Taq polymérase utilisée dans l'étape de PCR était la DreamTaq Hot Start Green PCR with Master Mix 2X de chez Thermofisher scientific.

- Pour la détection des virus, autant de PCR que de virus recherchés ont été réalisées. Les virus recherchés étaient : ABPV, BQCV, CBPV, DWV-A, DWV-B et SBV. L'étape comprenait une dénaturation de l'ADN à 94°C pendant 2 minutes, 30 cycles avec une étape de dénaturation à 94°C pendant 30 secondes, l'hybridation d'amorces spécifiques de chaque virus à 55°C pendant 30 secondes et l'élongation à 72°C pendant 45 secondes. Le protocole complet est donné en Annexe 2.
- Pour la détection de la nosérose, deux mix réactionnels (pour *N. apis* et *N. ceranae*) ont dû être préparés en parallèle. Le protocole complet est donné en Annexe 3.
- Pour la détection des loques (*Paenibacillus larvae* et *Melissococcus plutonius*), les spécificités de l'étape de PCR sont données en Annexe 4.

Deux témoins ont été utilisés pour valider l'étape d'amplification par PCR :

- Un témoin positif par pathogène, afin de contrôler l'efficacité de l'amplification. Il s'agissait de plasmides contenant la séquence cible
- Un premier témoin négatif réalisé lors de l'étape d'extraction des acides nucléiques (le clarifiat a été remplacé par un tampon phosphate), afin de contrôler l'absence de contaminants dans le tampon et les réactifs du kit d'extraction
- Un second témoin négatif (l'acide nucléique a été remplacé par l'eau de préparation du mix de PCR) afin de s'assurer de l'absence de contaminant dans le mix de PCR.

L'interprétation des résultats était basée sur la présence ou l'absence de produit amplifié. Un résultat était validé si le témoin positif de PCR était bien positif, et si les deux témoins négatifs d'extraction et de PCR étaient bien négatifs.

De plus, en cas de résultat négatif pour l'ensemble des pathogènes recherchés sur un même échantillon, il était nécessaire de s'assurer de l'absence d'inhibiteur de polymérase dans l'extrait qui aurait pu conduire à un résultat faussement négatif. Une PCR d'amplification du gène codant la  $\beta$ -Actine était alors réalisée, dont le protocole et l'interprétation sont donnés en Annexe 5.

### D. Analyses chimiques et organoleptiques du miel

Si la variation de composition du miel en fonction des origines florales butinées par les ouvrières est bien documentée (Baude *et al.*, 2016 ; Donkersley *et al.*, 2017), très peu d'études scientifiques ont investigué une possible différence de propriétés chimiques et organoleptiques entre les miels récoltés par des sous-espèces d'abeilles différentes.

Pourtant, le miel d'abeilles noires est plébiscité par certains consommateurs (Gauthier, 2018) et de grandes marques telles que Guerlain l'utilisent comme matière première dans le développement de gammes de produits cosmétiques haut de gamme.

Afin de déterminer si l'hybridation impacte les propriétés du miel de l'abeille noire, des échantillons de miels ont donc été comparés.

## 1. Prélèvement du miel

Le miel de chaque groupe d'étude a été extrait séparément dans un extracteur tangentiel. Chez les colonies noires, des sous-groupes ont été créés et le miel a été extrait par origine géographique (Calvados, Morbihan et Orne), ce qui représentait donc 3 échantillons.

Le miel de l'ensemble des colonies de chaque groupe ou sous-groupe a été homogénéisé et un échantillon de 500g a été analysé par le laboratoire AB LABO (département des Pyrénées-Atlantiques, 64) accrédité COFRAC 17 025.

Deux récoltes ont été analysées :

- Un miel de printemps récolté début Juin 2022
- Un miel d'été récolté fin Août 2022 (Annexe 1).

## 2. Méthodes d'analyse

Le Tableau 3 présente les analyses effectuées sur les échantillons récoltés, les méthodes d'analyses utilisées et leurs caractéristiques.

**Tableau 3 : Principe et caractéristiques des méthodes d'analyse pratiquées sur les échantillons de miels. (a) = mesure accréditée**

Analyses physico-chimiques	Méthode	Étendue de mesure et limite de détection	Limite de quantification
Humidité (a)	Réfractométrie à 20°C	14 à 22%	14%
Hydroxyméthylfurfural (HMF) (a)	Chromatographie liquide (HLPC UV)	2 à 40 mg/kg	2 mg/kg
Couleur	Mesure comparative de teintes (Lovibond)	5 à 100 mm Pfund	-
pH (a)	pH-métrie	3,1 à 4,9	3,1
Conductivité électrique (a)	Conductimétrie	80 à 1550 µs/cm	80 µs/cm
Taux de sucre (a)	Résonnance magnétique nucléaire (RMN 1H)	Fructose : 31,2 à 45,2% Glucose : 23,5 à 39,9% Sucrose : 1,9 à 5,7% Maltose : 1 à 4,8% Turanose : 1,4 à 2,6% Mélézitose : 3,7 à 8,7%	-
Amylase (a)	Dosage au nitrophénol	1,1 à 29 DZ (indice de Schade)	-

<b>Analyses de contaminants</b>	<b>Méthode</b>	<b>Etendue de mesure et limite de détection</b>	<b>Limite de quantification</b>
Tétracyclines (a), Tylosine (a), Quinolones (a), Streptomycines	Kits de dépistage ELISA (Randox)	Tétracyclines : 9 ppb Tylosine : 2 ppb Quinolones : 4 ppb Streptomycines : 5 ppb	-
Glyphosate	Méthode ELISA	Limite maximale miel non BIO = 50 ppb	0,05 mg/kg

### 3. Interprétation des résultats

Deux types de contaminants ont été analysés :

- Des antibiotiques : ils peuvent être détectés dans le miel suite à une introduction par l'apiculteur ou une contamination des butineuses par l'environnement. Une source de contamination possible est l'eau stagnante à proximité d'élevages porcins (Menjou, 2002, communication orale)
- Le glyphosate : il peut être détecté dans le miel suite à une contamination croisée des butineuses dans l'environnement.

Une analyse organoleptique des miels a également été effectuée. Elle consistait en une description précise des échantillons par des testeurs évaluant l'aspect visuel, la texture, les impuretés, l'existence d'un odorat exogène (odeur fermentée ou fumée par exemple) et les notes aromatiques. Cette méthode d'évaluation des miels n'est pas accréditée.

Une analyse pollinique qualitative a également été effectuée par microscopie optique.

Les résultats d'analyses n'ont pas fait l'objet d'une analyse statistique car le nombre de répétitions des mesures était trop faible. Leur valeur est uniquement descriptive.

## E. Méthode ColEval©

Dans un cheptel apicole, la connaissance de la dynamique de chaque colonie est essentielle pour adapter au mieux la conduite du rucher et ainsi maximiser les productions de miel, pollen et essaims (Adam, 1980).

Or, chaque sous-espèce d'abeilles présente des adaptations à son environnement d'origine, et par là même une dynamique singulière en termes d'élevage de couvain et de stockage des réserves. Afin de mesurer l'impact de l'hybridation sur le développement des colonies noires, une estimation mensuelle de la quantité de couvain et de réserves a été réalisée.

### 1. Protocole de terrain

La méthode ColEval© pour « Colony Evaluation » a été conçue au sein de l'UMT PrADE par Alban Maisonnasse et André Kretzschmar (Maisonnasse *et al.*, 2016). Elle a pour objectif de décrire la dynamique des colonies à travers l'évaluation de la surface du couvain (ouvrières et mâles, ouvert et operculé) et des réserves (miel et pollen) sur chaque cadre de la ruche. Cette méthode présente



l'avantage de ne pas perturber le fonctionnement des colonies testées (Maisonnasse *et al.*, 2016 ; Imdorf et Maquelin, 1993).

Cette méthode prévoit initialement l'évaluation des différentes surfaces par un opérateur entraîné et auto-formé sur une application en ligne. Il évalue ensuite visuellement les surfaces de chaque composante du cadre, directement sur le terrain.

Afin de diminuer l'erreur de mesure liée à l'opérateur, la méthode ColEval© a donc été adaptée dans le contexte de l'étude : les surfaces ont été estimées à l'aide du logiciel de traitement d'images Mesurim version 2.

De plus, à la différence de la méthode initiale, le protocole de l'étude prévoyait la distinction entre miel operculé et nectar grâce à deux mesures de surface distinctes, permettant ainsi une meilleure estimation de la dynamique des miellées.

Enfin, l'étude prévoyait la prise en compte du couvain mâle en distinguant couvain ouvert de mâles et couvain fermé de mâles, ce qui n'est pas le cas dans la version initiale de la méthode ColEval© qui l'évalue comme espace « vide » (Maisonnasse *et al.*, 2016).

Un autre apport supplémentaire de l'étude était la caractérisation de la structuration spatiale de la ruche.

Le protocole adopté pour la réalisation de la méthode ColEval© sur le terrain consistait à :

- Enfumer l'entrée de la ruche
- Ouvrir le toit et ôter le couvre cadre, photographier les intercadres, puis enfumer le corps de ruche
- Photographier les deux faces de chaque cadre de corps pris de la gauche vers la droite de la ruche pour un observateur placé face à elle.

## **2. Traitement des données**

### *a. Population d'ouvrières adultes*

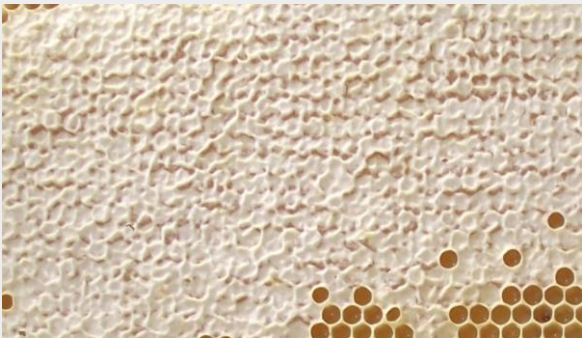
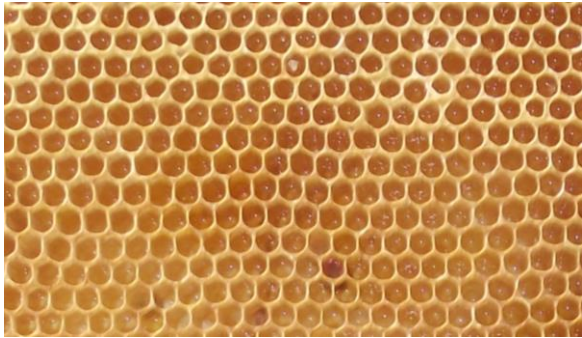

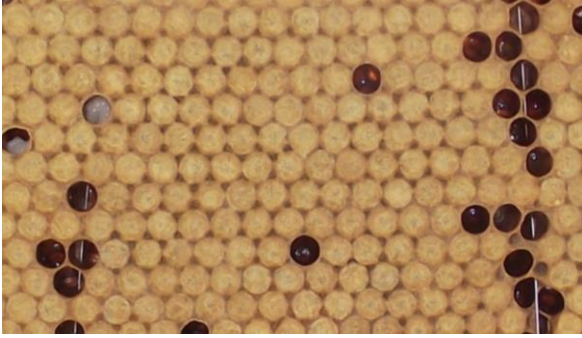
La population d'ouvrières adultes a été estimée mensuellement par le dénombrement des intercadres occupés par les abeilles à l'ouverture de la ruche, avant enfumage de la tête des cadres.



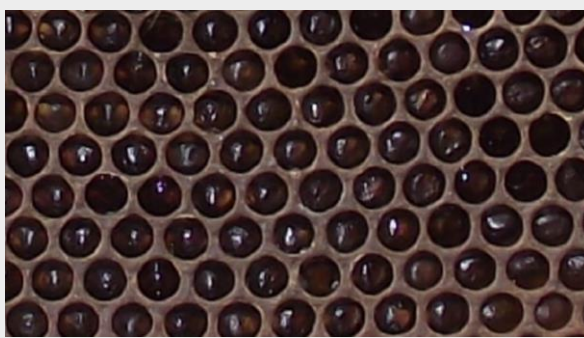
### *b. Composantes des cadres*

Pour chaque colonie, 4 composantes ont été mesurées mensuellement (Annexe 1) sur les faces de cadres (Tableau 4) :

- Réserves (miel operculé, nectar, pollen sous forme de pain d'abeilles)
- Couvain fermé (d'ouvrières et de mâles)
- Couvain ouvert (d'ouvrières et de mâles sans faire la distinction entre les œufs, les larves et leurs différents stades)
- Vide (cellules non occupées).

**Tableau 4 : Illustration des composantes mesurées sur les cadres (photographies personnelles)**

Composant	Illustration
Miel operculé	
Nectar	
Pollen	
Couvain fermé d'ouvrières	

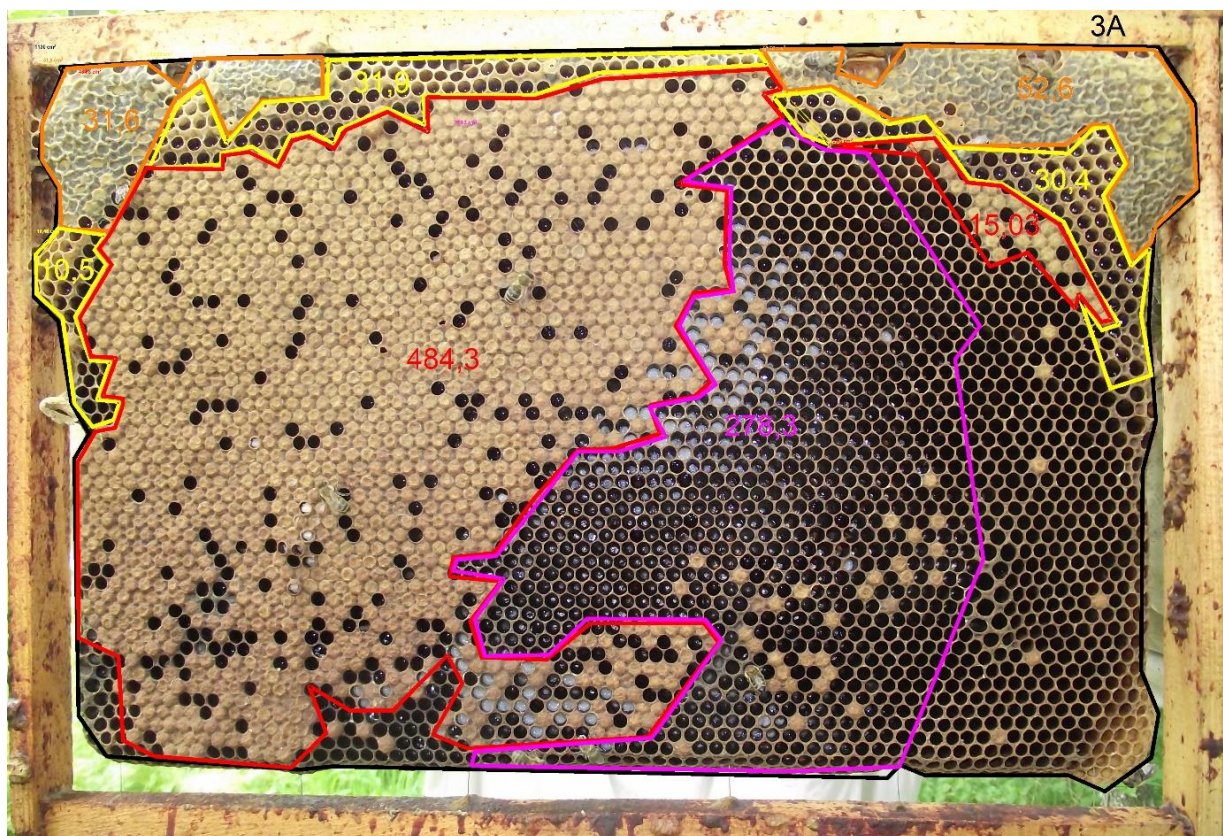
Composant (suite)	Illustration
Couvain ouvert d'ouvrières	
Couvain fermé de mâles	
Couvain ouvert de mâles	

Chaque face de cadre au format Dadant mesure 1134 cm<sup>2</sup>. Les surfaces occupées par chacune des 4 composantes ont été mesurées à l'aide du logiciel Mesurim version 2 (Figure 13).



### Figure 13 : Détermination des surfaces des 4 composantes à l'aide du logiciel Mesurim (photographie Garnery L.)

Le cadre présenté ici était le cadre 3A de la colonie 2, photographié au mois de Mai 2022. Il est possible de distinguer la surface de miel operculé (orange), de nectar (jaune), de couvain fermé d'ouvrières (rouge), de couvain ouvert d'ouvrières (rose). La surface des différentes composantes est indiquée dans la couleur correspondante (cm<sup>2</sup>).



#### c. Structuration spatiale de la ruche

Afin d'étudier la manière dont les deux groupes de colonies répartissaient les réserves et le couvain dans la ruche, une comparaison a été effectuée en divisant les cadres de corps en 3 parties à partir du côté gauche de la ruche pour un observateur placé face à elle :

- Partie 1 : cadres numéros 1 à 3
- Partie 2 : cadres numéros 4 à 7
- Partie 3 : cadres numéros 8 à 10.

Ainsi, les parties 1 et 3 pouvaient être assimilées aux cadres de rive, tandis que la partie 2 constituait la partie centrale de la ruche.

#### d. Variabilité intra-groupe

Disposer de colonies homogènes est un critère important pour l'apiculteur professionnel (Adam, 1980). En effet, si l'apiculteur dispose de colonies homogènes en termes de population, de dynamique d'élevage et de gestion des réserves, la conduite du rucher en sera facilitée car chaque opération sera appliquée au même moment à l'ensemble des colonies.

Partant de ce constat, la variabilité intra-groupe a été évaluée de manière descriptive par le calcul de l'écart type mensuel de la surface des 4 composantes des cadres. Cette analyse est descriptive et n'a pas fait l'objet de traitement statistique.

## **F. Suivi de l'infestation en varroa**

*Varroa destructor* est un acarien hématophage de l'ordre des Mesostigmata à l'origine d'une maladie parasitaire de l'abeille appelée varroose, occasionnant des pertes économiques importantes (Vidal-Naquet, 2015). Ce parasite est probablement l'un des dangers biologiques majeurs capables d'affecter la santé des colonies (Vidal-Naquet, 2022, communication écrite).

Autrefois Danger Sanitaire de catégorie II (article L2101-1 du Code Rural et de la Pêche Maritime), la varroose est désormais classée par la Loi Santé Animale (LSA) en catégorie C (maladie soumise à contrôle volontaire de l'État Membre : éradication volontaire) ; D (maladie pour laquelle des restrictions aux mouvements s'appliquent entre États Membres) ; et E (maladie soumise à surveillance), Règlement (UE) 2016/429 relatif aux maladies animales transmissibles.

Si certaines études ont comparé les dynamiques de la varroose entre sous-espèces d'abeilles mellifères différentes (De Guzman, 2008), aucune ne s'est encore intéressée à l'abeille noire. Afin de comprendre comment l'hybridation pouvait impacter l'abeille noire en termes de dynamique d'infestation par *Varroa destructor*, des mesures répétées du taux d'infestation et une estimation du comportement hygiénique ont été réalisées.

### **1. Taux d'infestation**

Le nombre de varroas pour 300 ouvrières a été mesuré mensuellement (Annexe 1) grâce à l'outil Varroa EasyCheck® de Vêto-pharma par la méthode de roulement au sucre glace. Cette méthode provoque la séparation mécanique des varroas phorétiques et épargne les ouvrières échantillonnées. Le protocole appliqué était le suivant :

- Déposer 2 cuillères à soupe de sucre glace au fond du Varroa EasyCheck®
- Prélever 300 ouvrières de préférence sur un cadre de couvain operculé
- Fermer le Varroa EasyCheck® et rouler les ouvrières dans le sucre glace pendant 1 minute (Figure 14)
- Laisser reposer pendant 3 minutes pour une meilleure séparation des varroas phorétiques
- Relâcher les ouvrières à l'entrée de la ruche prélevée
- Stocker les varroas détachés dans le sucre glace dans un flacon à prélèvement de 40 mL conservé au sec
- Au laboratoire, mélanger le sucre glace à de l'eau et passer l'ensemble au tamis afin de dénombrer les varroas.

**Figure 14 : Roulement des abeilles au sucre glace (photographie personnelle)**



## **2. Comportement hygiénique**

Le comportement hygiénique des abeilles mellifères est une des caractéristiques potentiellement associées à leur résistance à *Varroa destructor*. Les ouvrières au comportement hygiénique ont la capacité de détecter, désoperculer et détruire les nymphes infestées par un ou plusieurs varroas (Boecking et Drescher, 1991), ce qui contribue à la résistance globale contre la varroose.

Dans le cadre de l'étude, le comportement hygiénique des deux groupes a été mesuré afin d'évaluer l'impact de l'hybridation sur la capacité de détection du couvain parasité des colonies noires. Le test hygiénique a été pratiqué sur 9 colonies noires et 5 colonies hybridées tirées au hasard parmi les colonies incluses dans l'étude.

Environ 100 cellules de couvain d'ouvrières operculé au stade L2 ont été perforées avec une aiguille afin de tuer la nymphe (adapté de Dietemann *et al.*, 2013). Afin d'identifier le stade larvaire adéquat, des cellules ont été auparavant désoperculées, ce qui a permis de délimiter une aire contenant des nymphes au stade approprié (nymphe aux yeux roses, cuticule non pigmentée).

Six heures plus tard ont été dénombrés :

- Le nombre de cellules vides (la cellule a été désoperculée et la nymphe détruite)
- Le nombre de cellules entamées (la cellule a été désoperculée et la nymphe partiellement détruite)
- Le nombre de cellules ouvertes (la cellule a été désoperculée et la nymphe était intacte)
- Le nombre de cellules intactes (non désoperculées).

La distinction des différents types de cellules désoperculées (ouvertes et entamées) constituait une originalité du protocole appliqué et devait permettre une caractérisation plus fine du comportement hygiénique des colonies.

## **G. Suivi du poids des colonies**

Le suivi continu du poids des colonies est une source d'information très riche concernant le dynamisme et la santé des colonies (Meikle *et al.*, 2006 ; Meikle et Holst, 2015 ; Meikle *et al.*, 2016). Il peut même être utilisé pour estimer la récolte de miel (Mc Lellan, 1977).

Dans ce but, une mesure continue du poids brut des colonies, traitée en données hebdomadaires, a été réalisée dans le cadre de l'étude.

### **1. Poids brut**

Des balances connectées de marque Optibee® ont été installées sous chaque ruche, permettant un suivi en temps réel du poids des colonies et une estimation des récoltes. La mesure obtenue était le poids brut correspondant à la somme du poids du matériel apicole (corps, cadres et hausses éventuelles), de celui de la colonie et de ses réserves. L'estimation des récoltes était également une donnée brute incluant le poids de la hausse, des cadres, de la cire et du miel.

Les données traitées dans le cadre de l'étude correspondaient à des enregistrements de poids relevés chaque semaine à minuit, de sorte que toutes les ouvrières d'une colonie étaient bien présentes à l'intérieur de la ruche. Deux variables ont été comparées en tenant compte du retrait ou de l'ajout éventuel de hausses :

- Le différentiel de poids calculé entre chaque semaine afin de comparer les dynamiques de perte et de gain de poids entre les deux groupes
- Le poids cumulé calculé à partir d'un poids nul affecté à l'ensemble des colonies en début de période d'étude. Chaque semaine, les pertes ou gains de poids étaient ajoutées à ce poids initial.

La production moyenne de miel par colonie a été estimée en calculant la différence de poids des hausses récoltées avant et après extraction.

La variabilité intra-groupe a été évaluée de manière descriptive par le calcul de l'écart type moyen du poids brut des colonies, la moyenne étant calculée entre les différentes semaines de chaque mois.



**Figure 15 : Installation des balances Optibee® au rucher expérimental (photographie Garnery L.)**

*L'erreur de mesure du poids des colonies a été limitée par la correction de l'horizontalité des ruches à l'aide d'un niveau à bulles.*



## **2. Conditions environnementales**

Chaque balance Optibee® a été connectée à des modèles numériques de prévision des conditions météorologiques du rucher expérimental. Température, hygrométrie, pluviométrie et vitesse du vent ont ainsi été mesurées.

Dans des conditions climatiques particulières comme des périodes de mauvais temps, les poids cumulés moyens des deux groupes ont été calculés en prenant le poids en début d'épisode climatique comme référence nulle, afin d'être comparés statistiquement.

## **H. Analyses statistiques**

### **1. Analyses génétiques**

#### *a. Distances génétiques*

Le calcul des distances génétiques a permis de caractériser l'appartenance des colonies et des individus échantillonnés aux populations de référence. Elles ont donc été calculées :

- Entre les colonies de l'étude et les populations de référence ;
- Entre les ouvrières de chaque colonie et les populations de référence.



Les distances génétiques entre colonies et populations de référence ont été calculées à l'aide du logiciel Populations (version 1.2.21, Langella, 1999) et de la formule de Cavalli-Sforza et Edwards (1967) qui constitue, avec la distance  $DA$  de Nei, la meilleure estimation de distance génétique pour les études populationnelles (Takezaki et Nei, 1996).

Les distances entre individus ont été calculées à partir de la distance des allèles partagés ou distance DAS (Shared Allele Distance, Chakraborty et Jin, 1993).

#### *b. Arbres de proximité*

Les arbres de proximité ont été simulés par l'algorithme du Neighbor-Joining (Saitou et Nei, 1987) et la visualisation des populations sur l'arbre a été réalisée avec le logiciel Treemaker (Cornuet et Piry, 2000).

Les regroupements des colonies sur l'arbre de proximité ont été validés par les valeurs de Bootstrap correspondant au pourcentage de chance de retrouver ce regroupement à partir de 2000 tirages aléatoires avec remise effectués parmi les colonies de l'étude.

#### *c. Analyse en Coordonnées Principales (ACP)*

L'ACP est une analyse multivariée traitée par le programme Nuees (version 0.8, Langella 2001) qui permet une visualisation rapide de l'emplacement des colonies ou des individus les uns par rapport aux autres grâce au logiciel graphique Xgobi (version 1.1).

## **2. Traitement statistique des mesures répétées**

Le traitement statistique des données en mesures répétées obtenues dans le cadre de l'étude a été effectué par le logiciel SAS® (Statistical Analysis System) dont la procédure Mixed permet de prendre en compte les effets mixtes selon la méthode du maximum de vraisemblance (REML, Littell *et al.*, 1998).

La procédure MIXED de SAS® est un modèle mixte linéaire incluant un effet aléatoire de la colonie dans tous les modèles (SAS® Institute 2021, SAS® OnDemand for Academics).

Les effets de la sous-espèce d'abeille, du temps et leur interaction ont été testés pour les mesures de population, les données ColEval© ainsi que pour les données de poids et d'infestation par *Varroa destructor*. L'instruction Contrast de la procédure MIXED qui compare les moyennes des moindres carrés (mmc) été utilisée.

L'effet de la sous-espèce d'abeille pour les données du test hygiénique a également été testé par l'instruction Contrast de la procédure MIXED.

Enfin, les effets de la sous-espèce d'abeille, du temps, de la partie de la ruche et leur interaction ont été testés pour la comparaison de la structuration spatiale de la ruche avec l'instruction Contrast de la procédure MIXED.

Les résultats sont présentés sous forme de mmc  $\pm$  erreur type. Une valeur de  $p < 0,05$  indique une différence significative, tandis qu'une valeur  $p$  comprise entre 0,05 et 0,10 indique une tendance significative.

## IV. Résultats

### A. Caractérisation de l'échantillon d'étude

#### 1. Résultats des analyses génétiques

##### a. Résultats de l'étude de la diversité mitochondriale (lignée maternelle des colonies)

- Taille de la région intergénique COI-COII

Tous les échantillons collectés ont pu être amplifiés et analysés. Des exemples de gels de migration sur agarose des produits de PCR sont présentés en Annexe 6. Le Tableau 5 présente les résultats obtenus.

**Tableau 5 : Résultats de l'analyse mitochondriale**

*La première colonne correspond au numéro de colonie de l'étude. La seconde colonne présente la longueur du fragment amplifié de la région intergénique COI-COII. La troisième colonne montre le numéro d'haplotype correspondant à un profil de migration particulier. Ce numéro d'haplotype est précédé par une lettre correspondant à la lignée évolutive d'origine.*

Colonie	Longueur de la région intergénique	Haplotype
1	Q	C1
2	PQQ	M4
3	Q	C1
4	Q	C2
5	PQQ	M4
6	PQQ	A4
7	Q	C1
8	Q	C1
9	Q	C1
10	PQQ	M28
11	PQQ	M4
12	PQQ	M4
13	PQQ	M4
14	PQQ	M4
15	PQQQ	M4'
16	PQQ	M4
17	PQQ	M4
18	PQQ	M4
19	PQQQ	M4'

Colonie (suite)	Longueur de la région intergénique	Haplotype
20	PQQ	M4
21	PQQ	M4
22	PQQ	M4

- Détermination des haplotypes

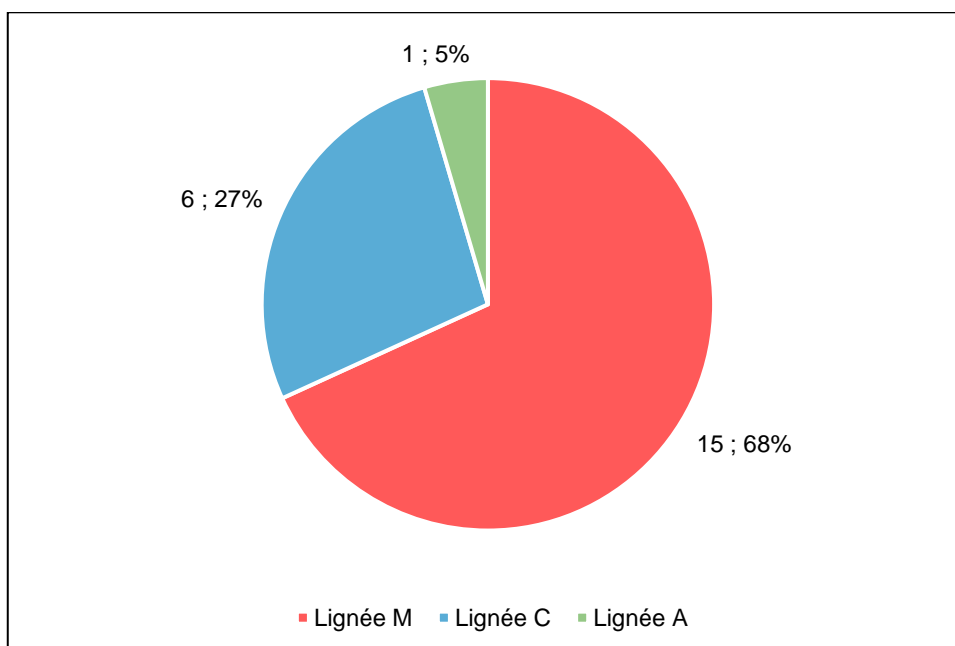
Les gels de migration en poly-acrylamide, obtenus après digestion du produit de PCR par l'enzyme *Dral*, sont présentés en Annexe 7.

L'analyse de la population du rucher expérimental a révélé la présence de 6 haplotypes :

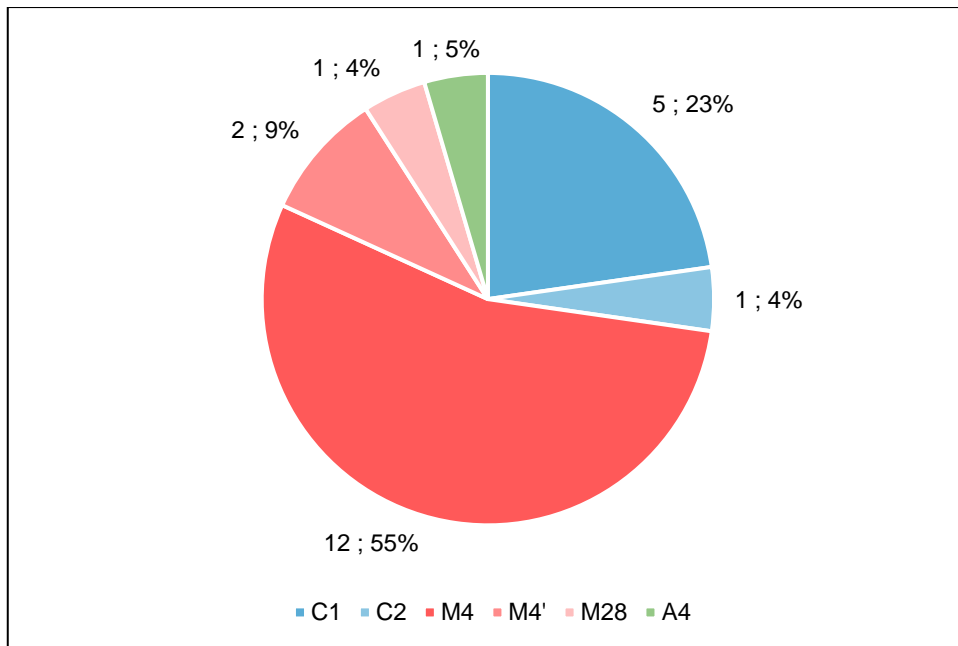
- 3 haplotypes appartenant à la lignée M (M4, M4' et M28)
- 2 haplotypes appartenant à la lignée C (C1 et C2)
- 1 haplotype appartenant à la lignée A (A4).

Aucun haplotype des lignées O et Z n'a été détecté dans la population. Parmi les 22 colonies, 68% (n=15) avaient des profils mitochondriaux typiques de la lignée M et 27% (n=6) avaient des profils typiques de la lignée C (Figure 16). La Figure 17 présente la fréquence des haplotypes.

**Figure 16 : Fréquence des différentes lignées maternelles parmi les colonies de l'étude**

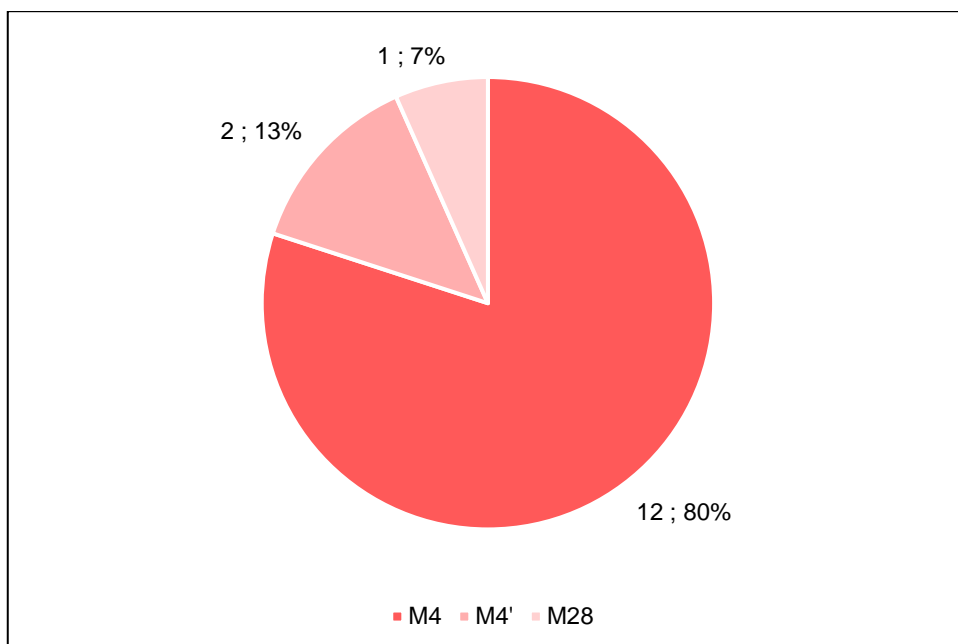


**Figure 17 : Fréquence des différents haplotypes parmi les colonies de l'étude**



La figure 18 présente la répartition des différents haplotypes du rucher expérimental au sein de la lignée M.

**Figure 18 : Fréquences des différents haplotypes au sein de la lignée M**



*b. Résultats de l'analyse de la diversité nucléaire (lignées mâles des colonies)*

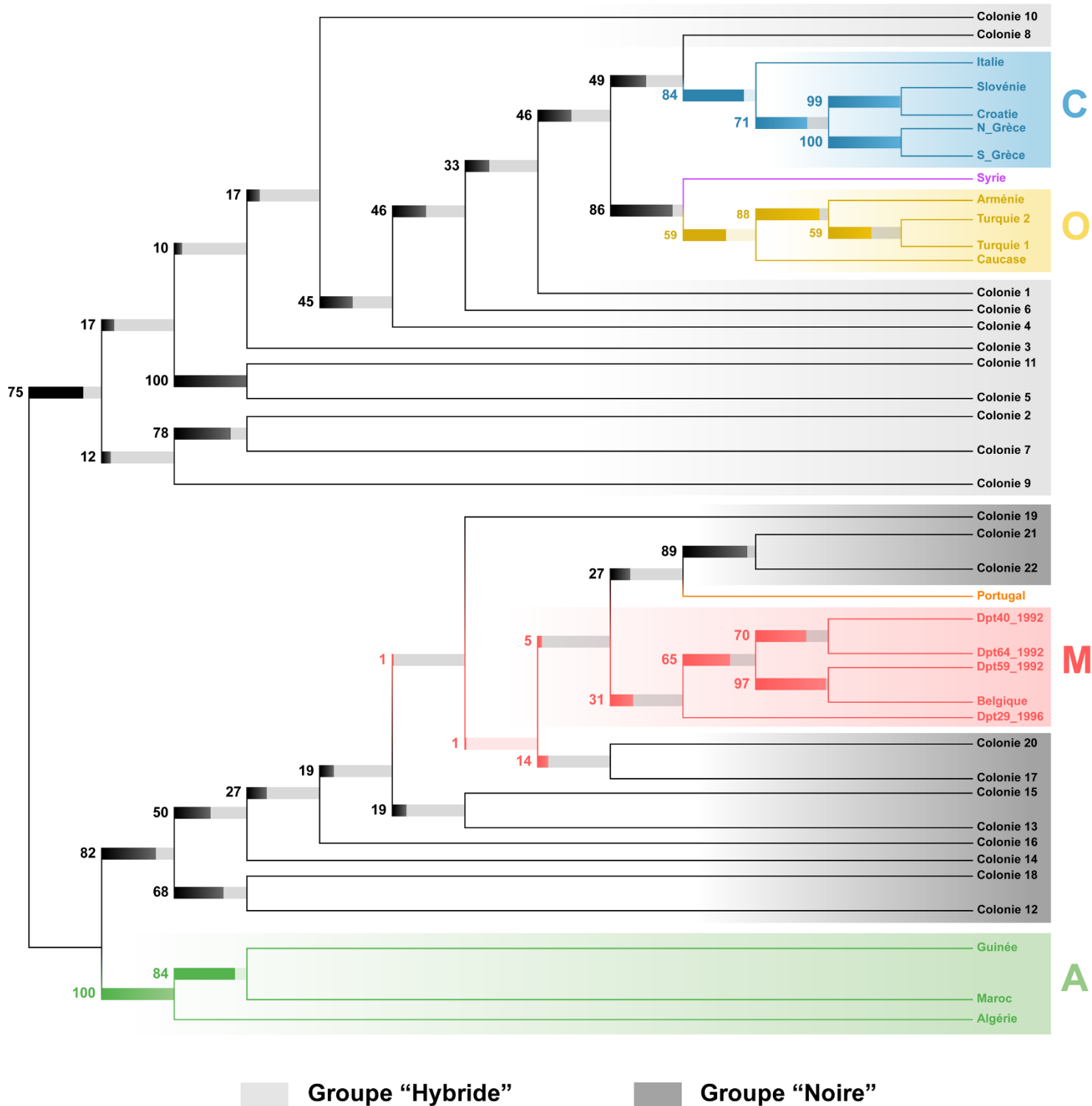
- Place des colonies échantillonnées dans l'arbre de proximité génétique

Les colonies échantillonnées ont été replacées dans le cadre de la diversité à l'échelle de l'espèce. Pour cela, une matrice de distance a été calculée à partir des données des marqueurs microsatellites

entre les colonies échantillonnées et les populations de référence des différentes lignées (Figure 19).

**Figure 19 : Arbre de proximité génétique calculé à partir des distances de Cavalli-Sforza et Edwards (1967) et de 14 *loci* microsatellites**

*Les valeurs de « Bootstrap » sont proportionnelles au nombre de fois où chaque branche a été retrouvée lors des rééchantillonnages.*



La Figure 19 met en évidence une répartition des populations de référence en 5 groupes évolutifs distincts :

- La lignée M
  - Populations de Belgique, des Landes, du Nord, de l'Orne, d'Ouessant et des Pyrénées Atlantiques pour *Apis m. mellifera*
  - Populations du Portugal pour *Apis m. iberiensis*
- La lignée C : populations de Croatie, de Grèce, d'Italie et de Slovénie
- La lignée A : populations d'Algérie, du Burkina Fasso, d'Égypte, de Guinée et du Maroc
- La lignée O : populations d'Arménie, du Caucase et de Turquie
- La lignée Z : populations de Syrie (Alburaki *et al.*, 2013).

Le détail de la composition de ces lignées est donné en Annexe 8.

- Taux d'introgression à l'échelle de la colonie

Les taux d'introgression mesurés, présentés par le Tableau 6, ont montré l'existence de deux groupes distincts :

- Le groupe de colonies hybridées montrait des taux d'introgression compris entre 35 et 71%, avec une moyenne de 48,5% (n=11)
- Le groupe de colonies noires montrait des taux d'introgression compris entre 2 et 22%, avec une moyenne de 9,8% (n=11).

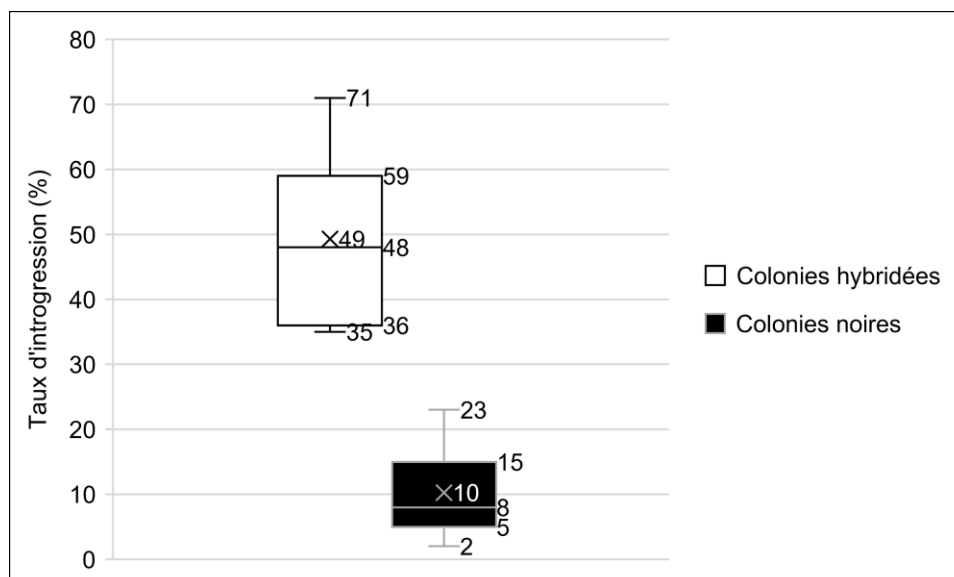
**Tableau 6 : Taux d'introgression calculés pour les colonies de l'étude**

Colonie	Taux d'introgression (%)		
	De la colonie	De la reine	Des mâles
1	60	79	51
2	36	17	58
3	48	54	53
4	53	42	62
5	46	41	52
6	59	75	45
7	35	29	50
8	71	71	67
9	36	33	51
10	45	46	52
11	53	38	57
12	15	8	27
13	15	13	2
14	19	13	24
15	8	5	10

Colonie (suite)	Taux d'introgression (%)		
	De la colonie	De la reine	Des mâles
16	10	8	16
17	5	4	7
18	23	21	28
19	6	14	12
20	6	4	10
21	4	0	7
22	2	4	2

La Figure 20 présente les résultats des analyses génétiques sous forme de diagrammes à quartiles.

**Figure 20 : Taux d'introgression des deux groupes calculés sur la base de l'analyse génétique**



- ACP interindividuelles

Les populations de référence sont représentées (Figures 21 et 22) :

- En rouge pour le lignée M
- En vert pour la lignée A
- En bleu pour la lignée C
- En jaune pour la lignée O
- En violet pour la lignée Z.

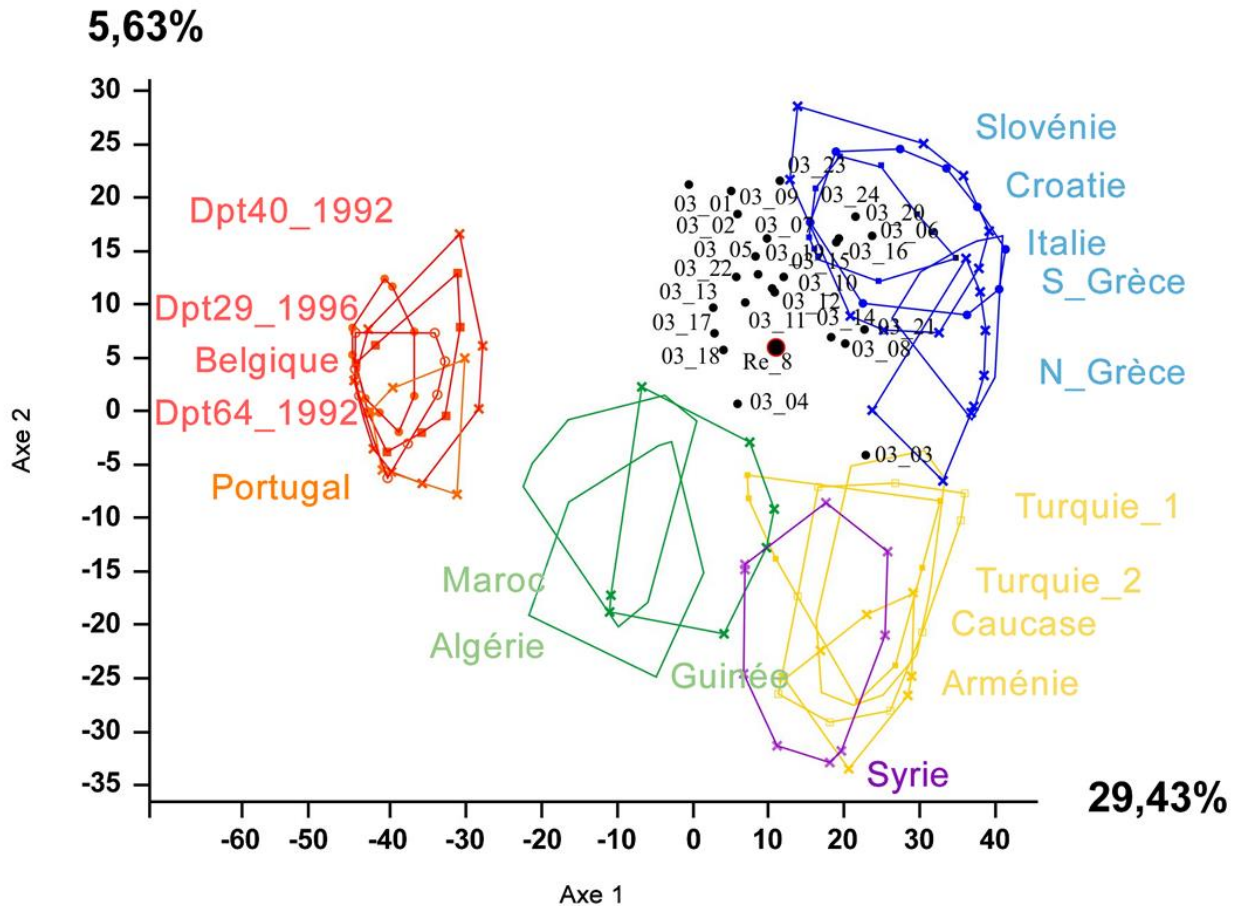
Chaque ouvrière testée a été représentée de manière individuelle par un cercle noir affecté du numéro d'échantillonnage correspondant. La reine a été représentée par un cercle noir de plus grande taille, cerclé de rouge. Deux exemples de projections d'individus appartenant aux deux groupes d'étude sont présentés en Figures 19 et 20. Les autres ACP sont présentées en Annexe 9.

**Figure 21 : Projections des individus de la colonie 3 sur les deux premiers axes de l'ACP réalisées avec la matrice des distances interindividuelles**

Seuls les pourtours des nuages de points, représentant l'ensemble des individus de chaque population de référence, ont été représentés.

Les lignées A, C, M, O et Z sont représentées respectivement par les couleurs verte, bleue, rouge, jaune et violette.

Les pourcentages sur les branches représentent le maximum de variance exprimée.

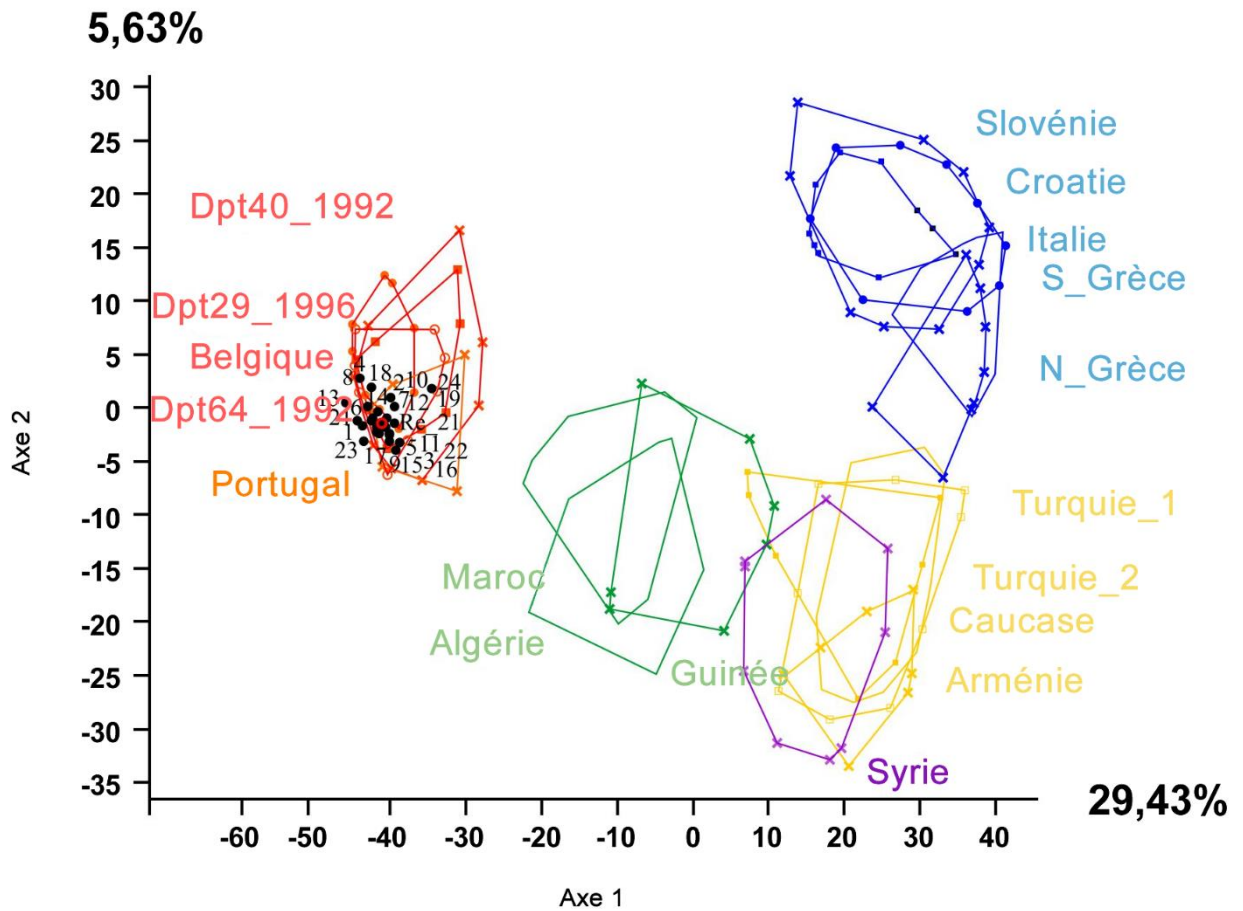


La position des 24 ouvrières de la colonie formait un ensemble assez hétérogène, réparti entre les lignées A, C et O, ce qui confirmait les résultats mitochondriaux et plaçait la colonie 23 dans le groupe des colonies hybridées.

L'ouvrière 03\_03 avait subi un phénomène de dérive et n'appartenait pas à la ruche. En effet, elle ne présentait aucun allèle de la reine aux *locis* B124, AP66, A113 et A7.



Figure 22 : Projections des individus de la colonie 21 sur les deux premiers axes de l'ACP réalisées avec la matrice des distances interindividuelles

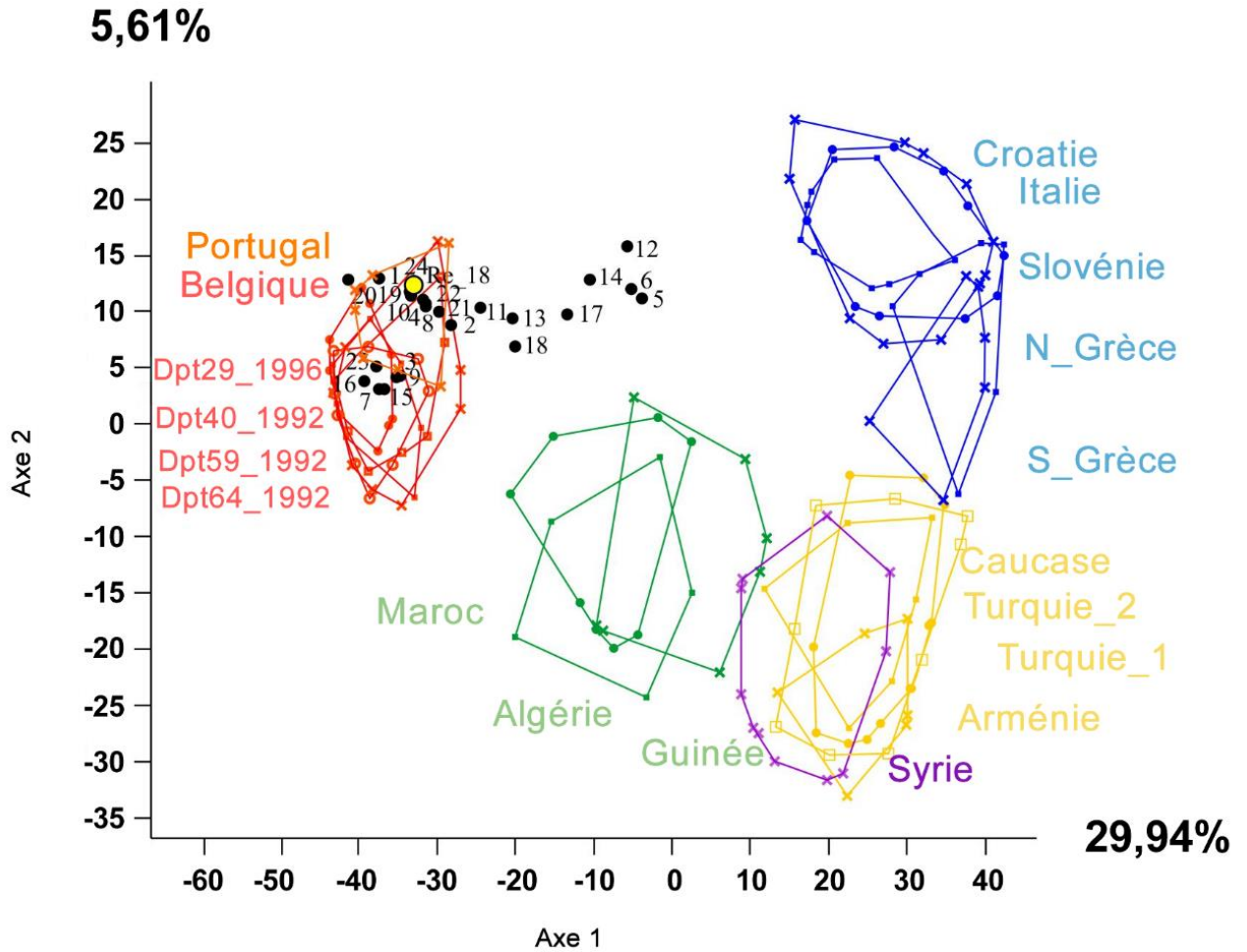


La position des 24 ouvrières de la colonie 21 formait un ensemble très homogène au sein des populations de référence de la lignée M, ce qui a confirmé les résultats mitochondriaux et l'a placée dans le groupe des colonies noires.

La Figure 23 présente l'ACP de la colonie 18 dont l'appartenance au groupe des colonies noires est discutée par la suite.

**Figure 23 : Projections des individus de la colonie 18 sur les deux premiers axes de l'ACP réalisée avec la matrice des distances interindividuelles**

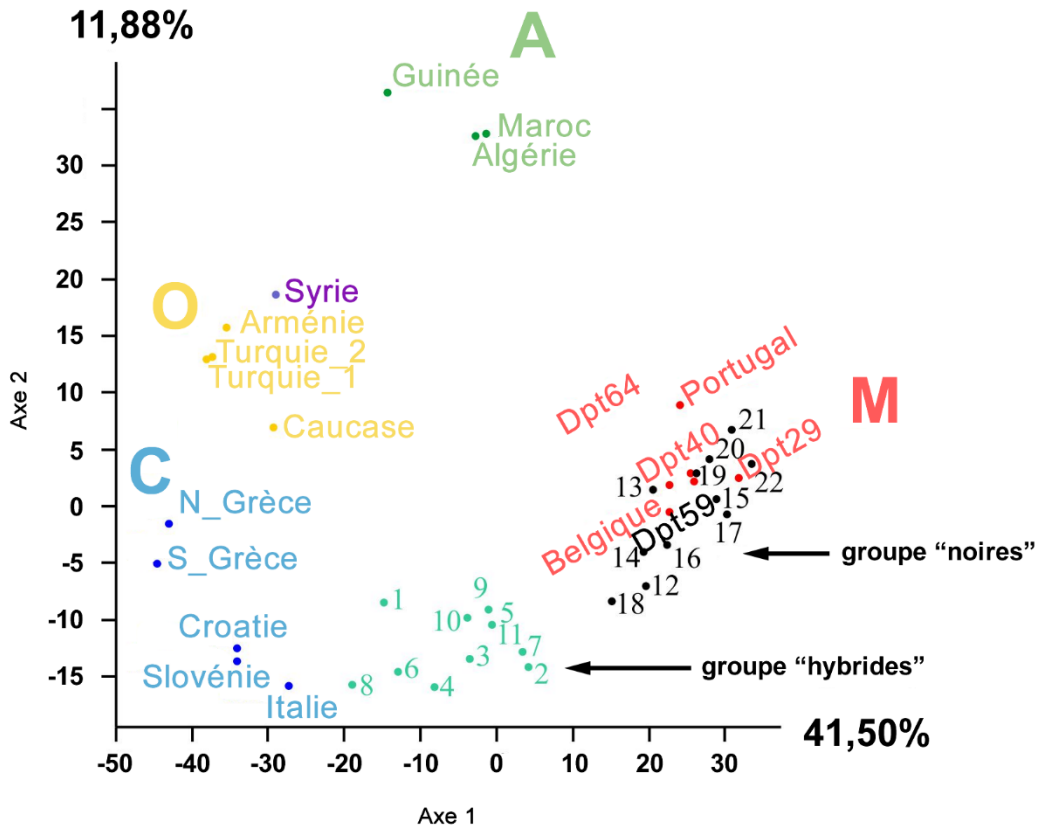
La reine, représentée en jaune, présentait un taux d'introggression de 21%. La reine ainsi que 66,7% des ouvrières (16/24) étaient incluses dans les populations de référence de la lignée M, justifiant le rattachement de la colonie 18 au groupe des colonies noires.



La figure 24 présente les résultats de l'ACP réalisée à l'échelle de la colonie.

**Figure 24 : Projections des colonies recrutées sur les deux premiers axes de l'ACP réalisée avec la matrice des distances interindividuelles**

L'axe 1 sépare la lignée M des lignées C et O. L'axe 2 sépare la lignée A des autres lignées. Les colonies noires forment un groupe bien différencié autour des populations de référence de la lignée M.



## 2. Résultats des analyses morphométriques

Les taux d'introgression obtenus pour chaque colonie, calculés sur la base des critères morphométriques, sont présentés dans le Tableau 7.

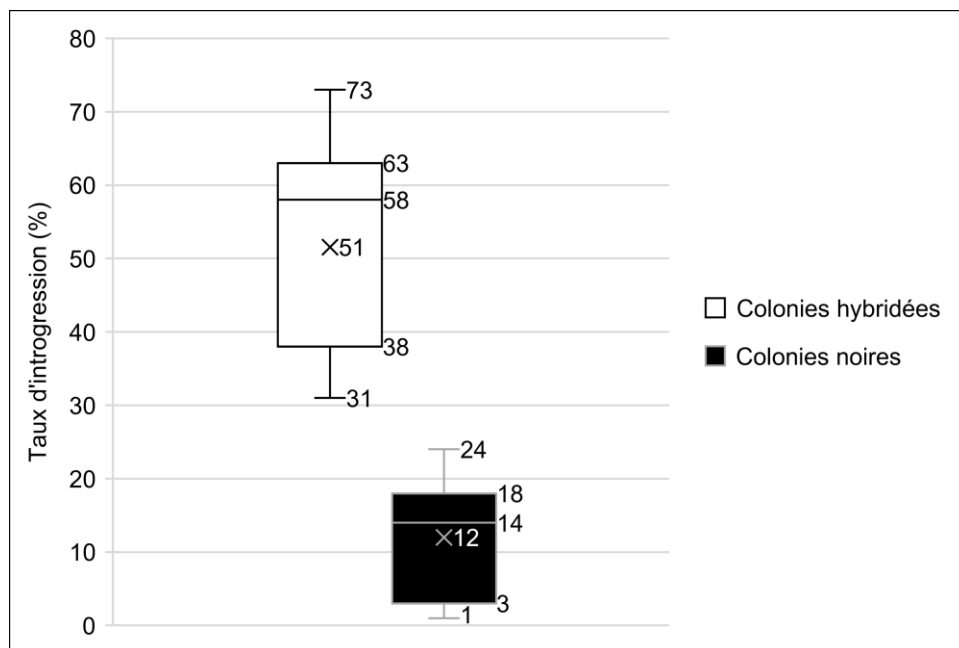
**Tableau 7 : Taux d'introgression basés sur les critères morphométriques**

Colonie	Taux d'introgression (%)
1	40
2	58
3	61
4	59
5	31
6	63
7	64
8	73

Colonie (suite)	Taux d'introgession (%)
9	38
10	48
11	32
12	24
13	14
14	18
15	18
16	8
17	1
18	8
19	20
20	16
21	2
22	3

La Figure 25 présente les résultats des analyses morphométriques sous forme de diagrammes à quartiles.

**Figure 25 : Taux d'introgession des deux groupes calculés sur la base des critères morphométriques**



## B. Résultats des analyses de pathogènes

Concernant la détection des virus et des agents de nosémose, les plasmides contenant la séquence cible ont bien été amplifiés mais n'avaient pas la taille attendue. Les résultats n'étaient donc pas interprétables car il était impossible de confirmer les résultats positifs.

Toutes les colonies des deux groupes d'étude étaient indemnes de loque européenne et américaine. Les résultats étaient interprétables car les témoins positifs étaient bien positifs et présentaient la bonne taille, et les témoins négatifs étaient bien négatifs. L'absence d'inhibiteurs de la polymérase a été contrôlée.

Les gels de migration sur agarose sont présentés en Annexe 10.

### C. Résultats des analyses chimiques et organoleptiques du miel

Les résultats des analyses chimiques des miels sont présentés dans le Tableau 8. Pour les colonies noires, une moyenne a été calculée entre les 3 échantillons correspondant aux origines géographiques des colonies. Pour les colonies hybridées, les résultats correspondent à la moyenne des 11 colonies testées.

Les valeurs des différents paramètres étaient semblables entre les différentes origines géographiques pour le miel d'été. En revanche, les colonies noires originaires du Morbihan ont produit un miel de printemps singulier, caractérisé par une couleur très foncée, une forte conductivité et une faible teneur en glucose (Tableau 9).

**Tableau 8 : Résultats des analyses physico-chimiques des miels de printemps et d'été**

Paramètre	Colonies noires		Colonies hybridées	
	Printemps (n=3)	Été (n=3)	Printemps	Été
Humidité (%)	16,7	17,5	17,5	17,7
HMF (%)	4,5	6,3	4,1	4,4
Couleur (mm Pfund)	18,3	43,3	5	45
pH (s.u)	4,2	3,8	4	4,1
Conductivité électrique ( $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ )	213,3	297	213	484

Paramètre (suite)		Colonies noires		Colonies hybridées	
		Printemps (n=3)	Été (n=3)	Printemps	Été
Taux (%) de	Glucose	31,7	32	29,7	29,8
	Fructose	40,2	39,5	41,5	39,1
	Saccharose	<1,9	<1,9	<1,9	<1,9
Amylase (DZ Schade)		22,1	>35	24,8	>35

**Tableau 9 : Composition du miel de printemps des colonies noires originaires du Morbihan**

Paramètre	Colonies noires du Morbihan	Autres origines (n=2)
Couleur (mm Pfund)	45	5
Conductivité électrique ( $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ )	251	194,5
Taux de glucose (%)	29,3	32,9

Aucun contaminant n'a été retrouvé dans les miels de printemps et d'été pour les deux groupes (Tableau 10).

**Tableau 10 : Résultat des analyses des contaminants des miels**

<b>Molécules recherchées</b>	<b>Colonies noires</b>	<b>Colonies hybridées</b>
Tétracyclines (a), Tylosine (a), Quinolones (a), Streptomycines	Absence	Absence
Glyphosate	Absence	Absence

Le Tableau 11 présente le nombre d'origines florales différentes totales retrouvées dans les miels pour les deux groupes d'étude.

**Tableau 11 : Résultats de l'analyse pollinique**

<b>Paramètre</b>	<b>Colonies noires</b>		<b>Colonies hybridées</b>	
	Printemps	Été	Printemps	Été
Nombre d'origines florales différentes	18	16	9	12

Le tableau 12 présente le nombre moyen d'origines florales différentes par colonie.

**Tableau 12 : Nombre moyen d'origines florales différentes retrouvé dans les miels par colonie**

<b>Paramètre</b>	<b>Colonies noires</b>		<b>Colonies hybridées</b>	
	Printemps	Été	Printemps	Été
Nombre d'origines florales différentes	9	10	9	12

Les données complètes sont présentées en Annexe 11.

## D. Résultats de la méthode ColEval©

Pour chaque mesure, 3 types de représentations graphiques ont été généralement réalisées :

- Le premier type de graphique (exemple de la Figure 26) présente l'évolution de la surface de la composante (réserves ou couvain) pour chacun des deux groupes au cours de la période d'étude (4 dates de mesures mensuelles). Il a été utilisé pour déterminer l'évolution des caractéristiques de chaque groupe d'étude concernant une composante donnée
- Le deuxième type de graphique (exemple de la Figure 27) présente la moyenne de la composante sur l'ensemble de la période d'étude. Il a été utilisé pour caractériser le comportement global de chaque groupe sur la période d'étude
- Le troisième type de graphique (exemple de la Figure 28) présente l'évolution de la surface moyenne de la composante tous groupes confondus au cours de la période d'étude (4 dates de mesures mensuelles). Il a été utilisé pour caractériser le comportement de l'ensemble des colonies du rucher expérimental sur la période d'étude.

Les données brutes sont présentées en Annexe 12.

### 1. Dynamique générale des colonies et conditions environnementales

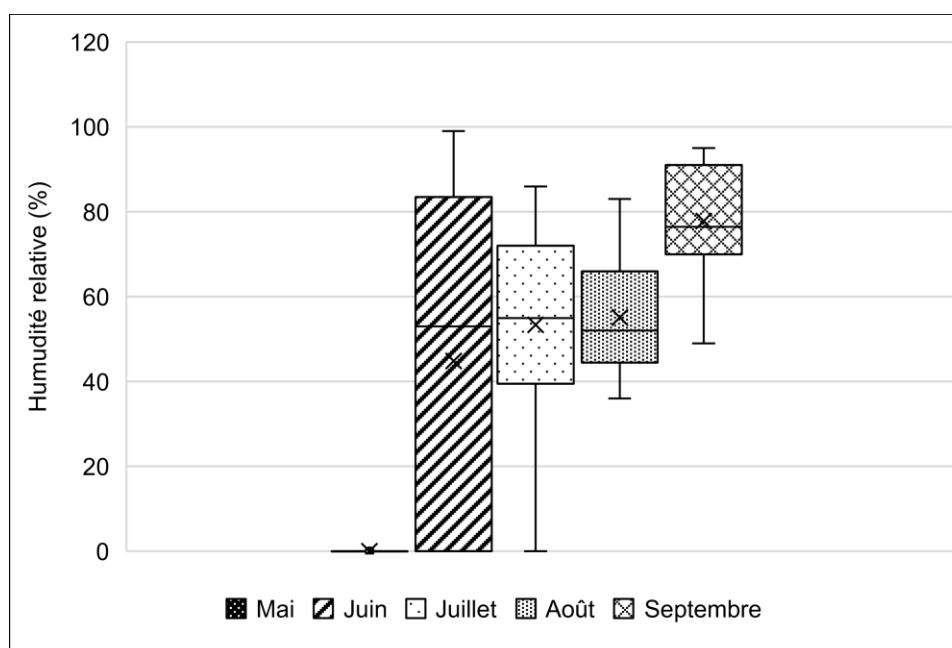
#### a. Dynamique générale des colonies

Durant la période d'expérimentation, aucune colonie n'est morte. Cependant, une colonie noire a été touchée par la maladie du couvain plâtré ou ascosphérose (*Ascosphaera apis*). Son affaiblissement a conduit à son exclusion du protocole expérimental dès le mois de Juin.

#### b. Conditions environnementales

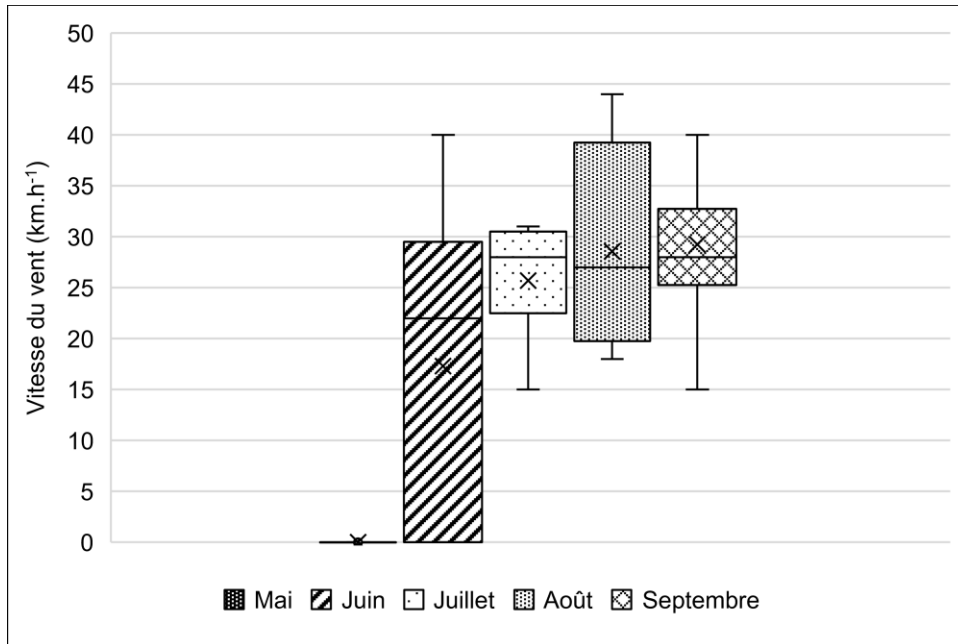
Les plus fortes variations d'humidité relative ont été mesurées en Juin (Figure 26). L'humidité relative moyenne en Juin était cependant équivalente à celle de Juillet et d'Août. L'humidité relative moyenne du rucher expérimental augmentait au cours de la période d'étude et était maximale en Septembre.

**Figure 26 : Evolution mensuelle de l'humidité relative au rucher expérimental**



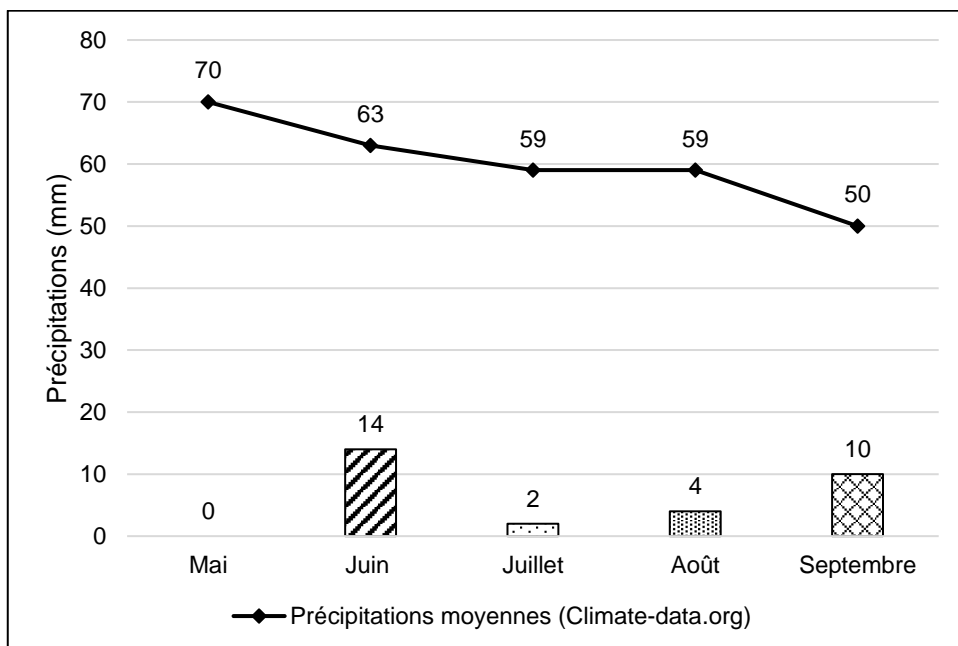
Bien que les conditions de vent en Juin étaient très variables (Figure 27), la vitesse moyenne du vent était la plus élevée en Juillet. Les colonies ont bénéficié d'un mois de Mai exceptionnellement clément, avec absence d'humidité relative, de vent et de précipitations (Figures 26, 27 et 28).

**Figure 27 : Evolution mensuelle de la vitesse du vent au rucher expérimental**



Un déficit hydrique marqué a été observé durant la période d'étude (Figure 28). Les précipitations étaient nulles en Mai, alors que cette période de l'année est en moyenne celle qui enregistre le plus fort niveau de précipitations (Climate-data.org, consulté le 15/11/2022). Sur le reste de la période d'étude, les précipitations restaient très inférieures aux niveaux mesurés sur les dernières années, représentés par la courbe noire.

**Figure 28 : Niveau de précipitations mesuré en 2022**

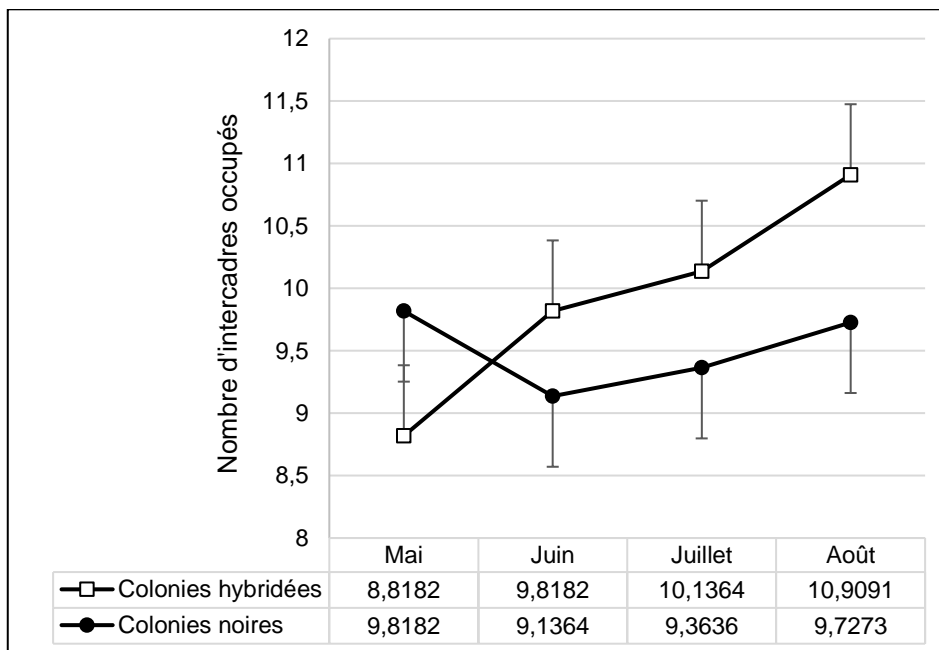




## 2. Population d'ouvrières adultes

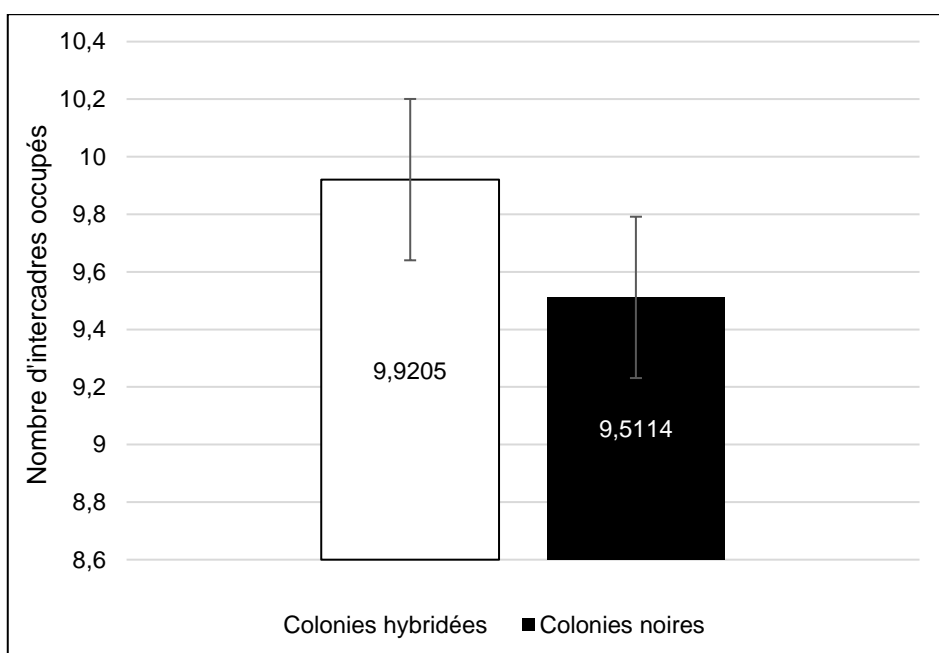
Au sein des deux groupes, la population était croissante au cours de la période d'étude, bien que les différences entre les dates n'étaient pas significatives d'un point de vue statistique (Figure 29). Aucune différence significative n'a été observée entre les deux groupes pour chacune des dates.

**Figure 29 : Evolution mensuelle de la population d'ouvrières adultes par groupe d'étude**



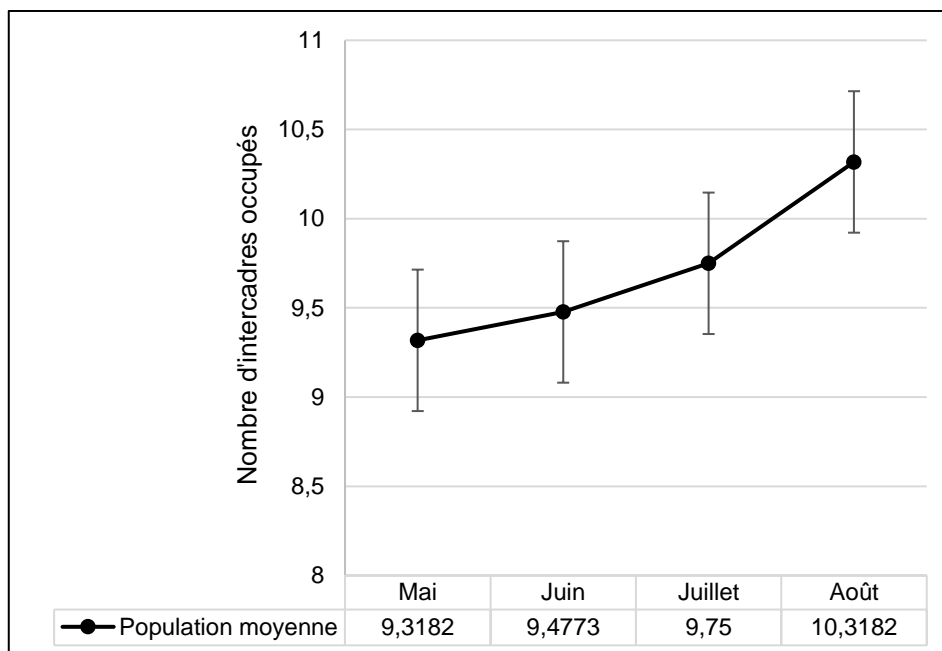
Sur l'ensemble de la période, les populations étaient équivalentes (Figure 30) entre les deux groupes.

**Figure 30 : Population d'ouvrières adultes par groupe d'étude sur la période (Mai à Août 2022)**



Enfin, l'étude de la population moyenne dans l'ensemble des colonies sur la période d'étude, sans distinction de groupe, montre que les populations étaient croissantes, bien que les différences n'étaient pas significatives d'un point de vue statistique (Figure 31).

**Figure 31 : Evolution mensuelle de la population moyenne d'ouvrières adultes toutes colonies confondues**



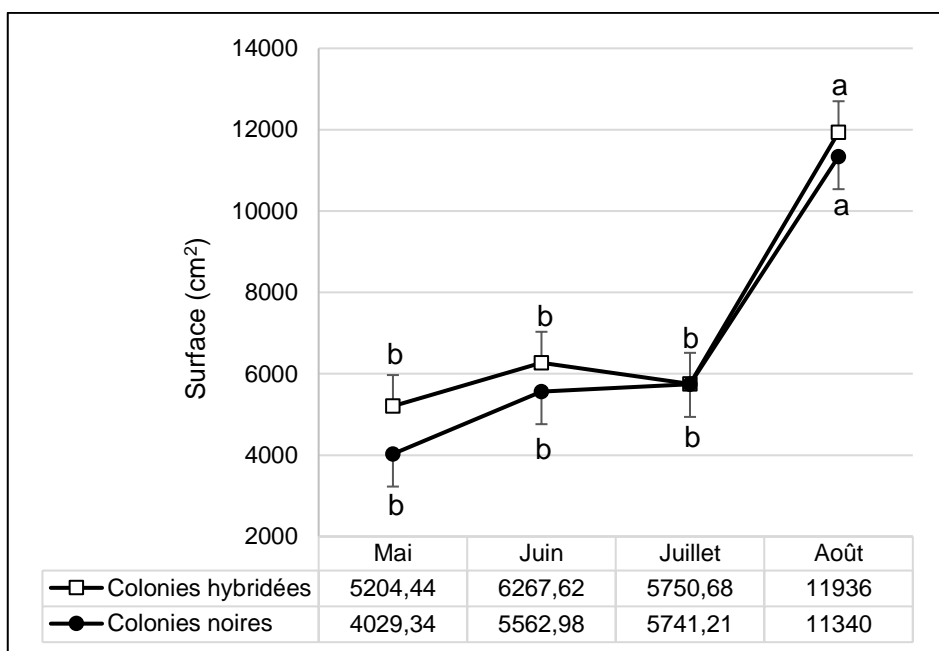
### 3. Réserves

La méthode ColEval© ayant été pratiquée sur les cadres de corps, les réserves évaluées ici ne concernent pas le miel operculé et le nectar stocké dans les hausses. Ces derniers ont été évalués lors des récoltes.

#### a. Miel operculé

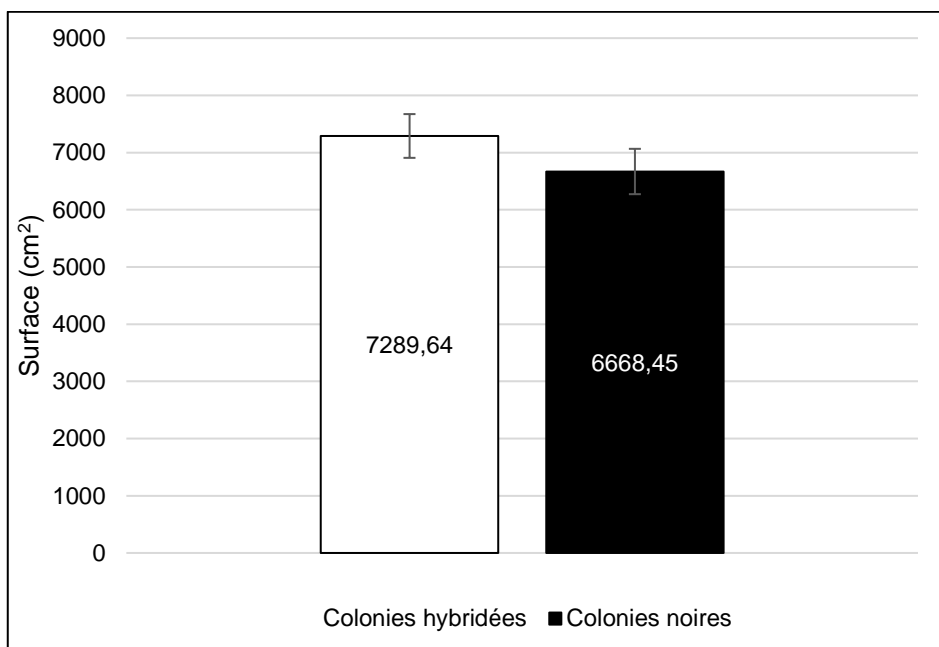
L'étude de la surface de miel operculé montre que les réserves ne variaient pas significativement au sein des deux groupes entre Mai et Juillet (Figure 32). Les réserves de miel operculé étaient significativement plus élevées en Août comparativement aux mois de Mai ( $p < 0,0001$ ), Juin et Juillet ( $p < 0,01$ ) pour les deux groupes. Aucune différence significative n'a été observée entre les deux groupes pour chacune des dates.

**Figure 32 : Evolution mensuelle de la surface de miel operculé par groupe d'étude : effet date  $p < 0,0001$**



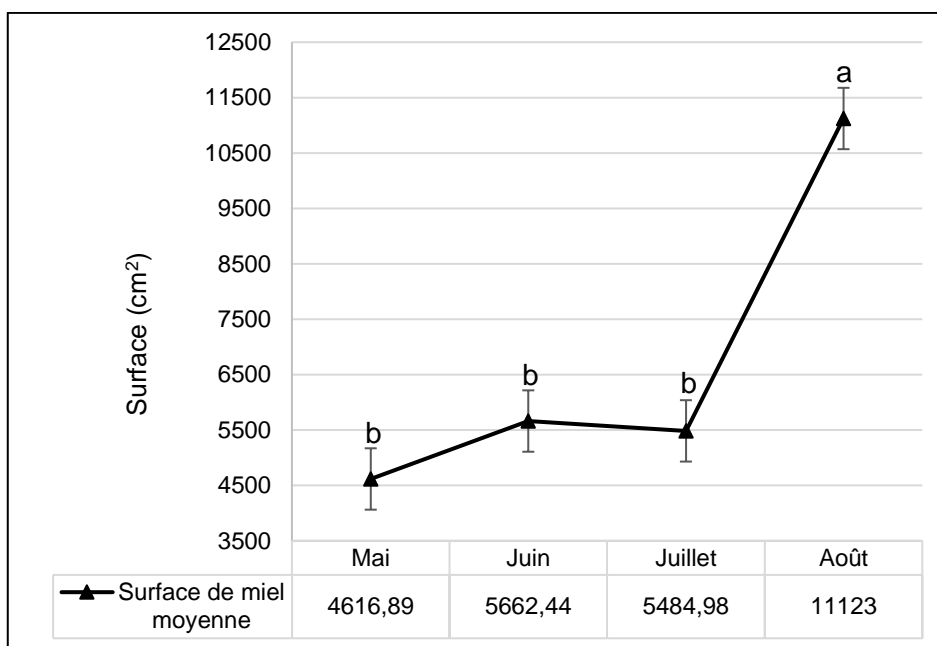
Sur l'ensemble de la période, la surface moyenne de miel operculé était équivalente entre les deux groupes (Figure 33).

**Figure 33 : Surface de miel operculé moyenne par groupe d'étude sur la période (Mai à Août 2022)**



Enfin, l'étude de la quantité moyenne de miel operculé stocké dans l'ensemble des colonies sur la période, sans distinction de groupe, montre que les réserves étaient significativement plus élevées ( $p < 0,0001$ ) en Août que sur le reste de la période d'étude (Figure 34), tandis que les réserves ne variaient pas significativement entre Mai et Juillet.

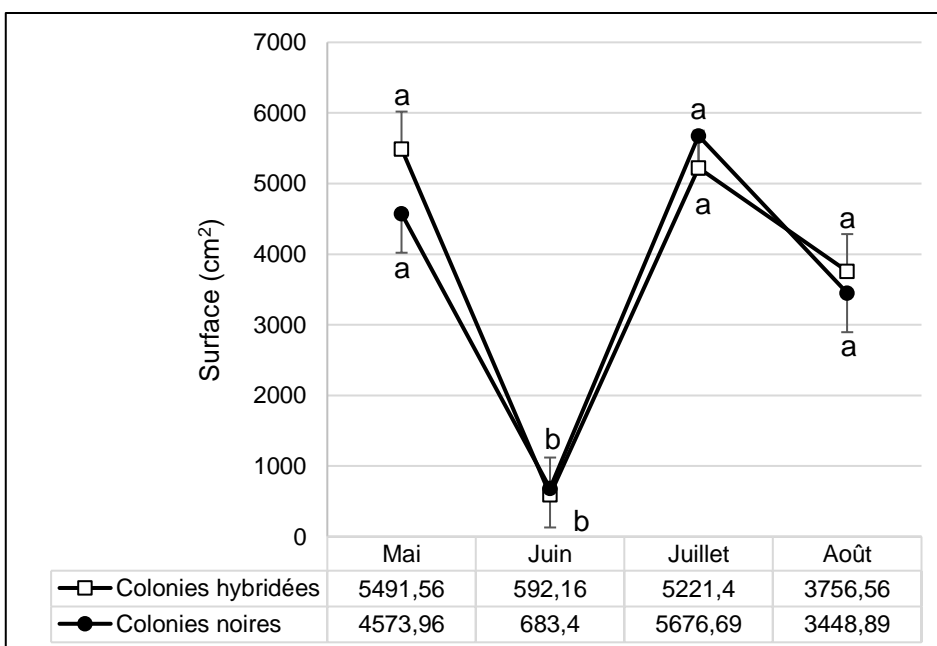
**Figure 34 : Evolution mensuelle de la surface de miel operculé moyenne toutes colonies confondues : effet date  $p < 0,0001$**



*b. Nectar*

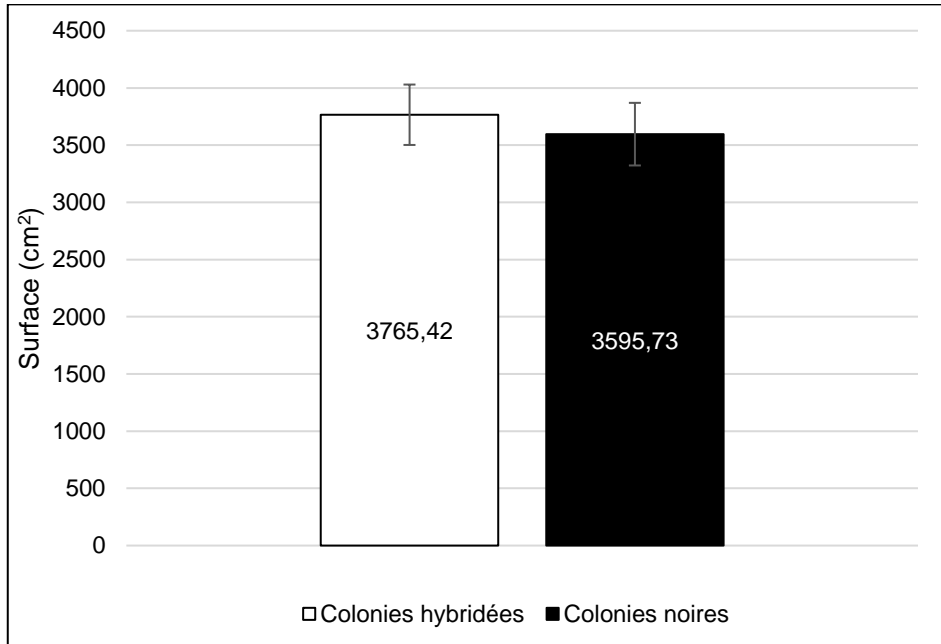
Chez les colonies hybridées, la quantité de nectar stocké en Juin était significativement plus faible qu'au mois de Mai ( $p < 0,0001$ ), de Juillet ( $p < 0,0001$ ) et d'Août ( $p < 0,05$ ). Chez les colonies noires, la récolte de nectar était également la plus faible en Juin avec une différence significative par rapport aux mois de Mai ( $p < 0,05$ ) et de Juillet ( $p < 0,0001$ ). En revanche chez ce groupe, la quantité de nectar stocké en Juin n'admettait pas de différence significative avec celle stockée en Août (Figure 35). Aucune différence significative n'a été observée entre les deux groupes pour chacune des dates.

**Figure 35 : Evolution mensuelle de la surface de nectar par groupe d'étude**



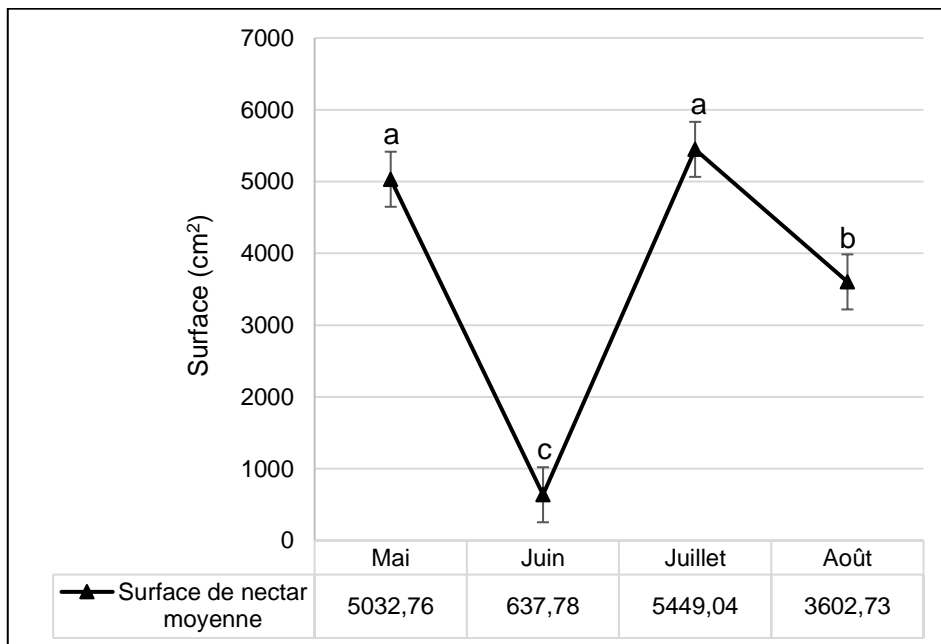
Sur l'ensemble de la période, la quantité moyenne de nectar stocké était équivalente entre les deux groupes (Figure 36).

**Figure 36 : Surface de nectar moyenne par groupe d'étude sur la période (Mai à Août 2022)**



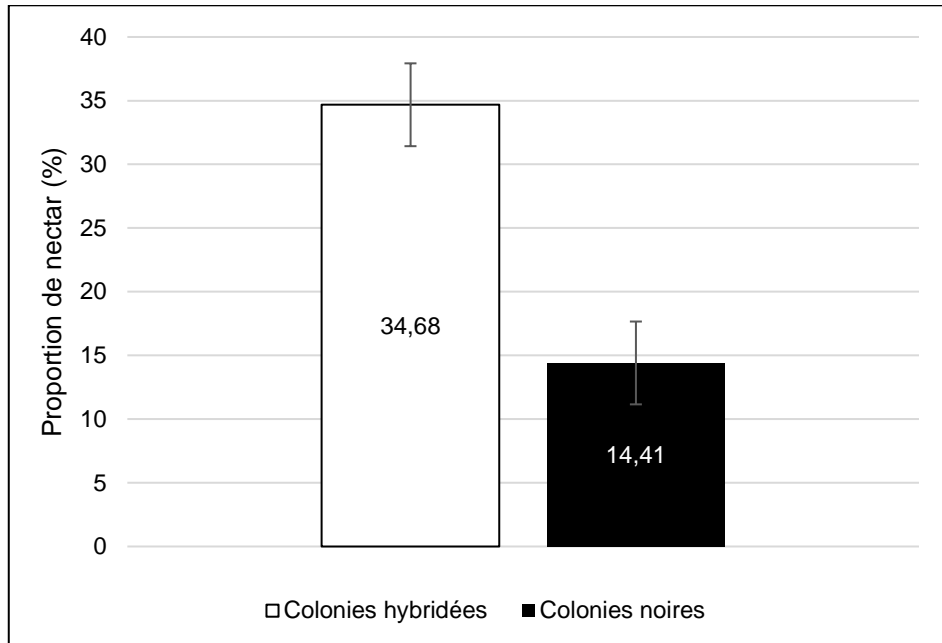
Enfin, l'étude de la quantité moyenne de nectar dans l'ensemble des colonies sur la période, sans distinction de groupe (Figure 37), montre que la récolte de nectar diminuait entre Mai et Juin ( $p < 0,0001$ ), augmentait entre Juin et Juillet ( $p < 0,0001$ ), puis diminuait entre Juillet et Août ( $p < 0,05$ ). La quantité de nectar était également plus élevée en Mai qu'en Août ( $p < 0,1$ , tendance significative) et plus élevée en Août qu'au mois de Juin ( $p < 0,0001$ ).

**Figure 37 : Evolution mensuelle de la surface de nectar moyenne toutes colonies confondues : effet date  $p < 0,0001$**



L'étude de la proportion de nectar parmi les réserves glucidiques totales au mois d'Août a montré que la proportion de nectar était plus faible chez les colonies noires (effet race,  $p < 0,001$ ) de  $20,27 \pm 4,60\%$  (Figure 38).

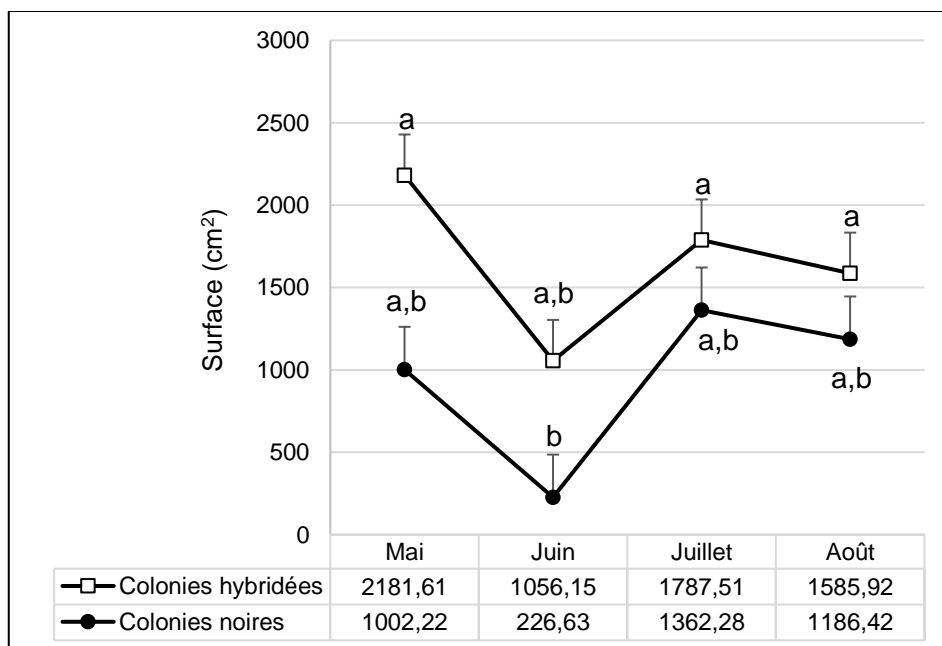
**Figure 38 : Proportion de nectar parmi les réserves glucidiques totales au mois d'Août par groupe d'étude**



*c. Pollen*

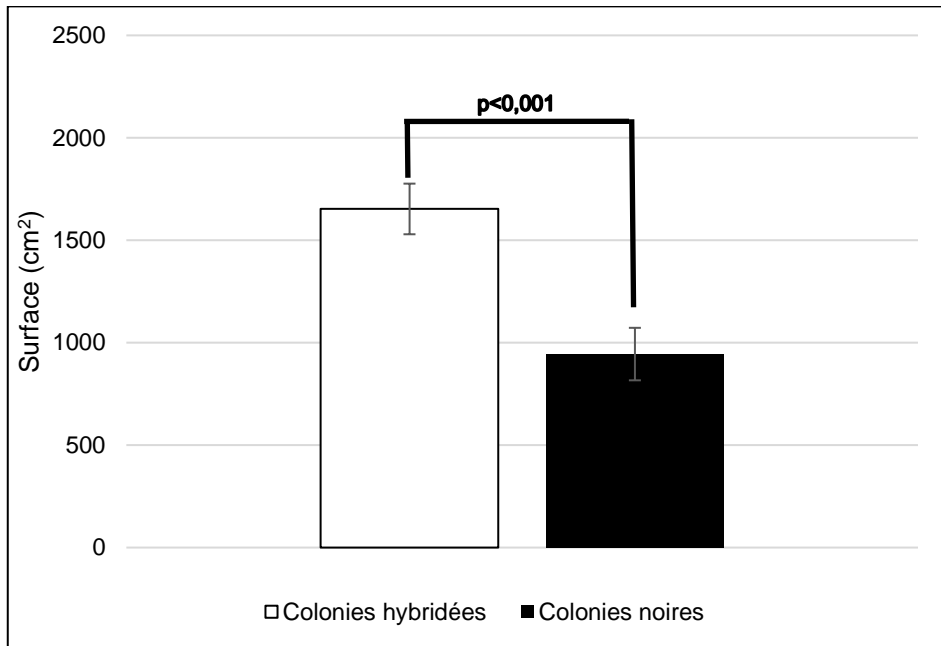
Au sein des deux groupes, la quantité de pollen était équivalente entre les mesures (pas de différence significative entre les dates, Figure 39). Aucune différence significative n'a été observée entre les deux groupes pour chacune des dates.

**Figure 39 : Evolution mensuelle de la surface de pollen par groupe d'étude**



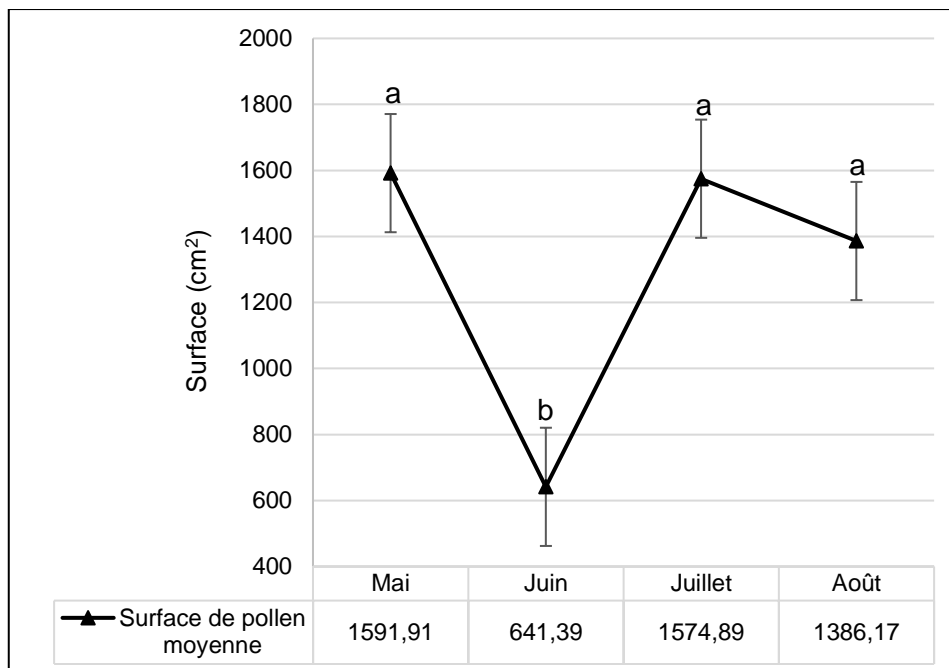
Sur l'ensemble de la période, la quantité moyenne de pollen stocké était plus élevée chez les colonies hybridées (effet race,  $p < 0,001$ ) de  $708,41 \pm 177,99 \text{ cm}^2$  (Figure 40).

**Figure 40 : Surface de pollen moyenne par groupe d'étude sur la période (Mai à Août 2022)**



Enfin, l'étude de la quantité moyenne de pollen stocké par l'ensemble des colonies sur la période (Figure 41), sans distinction de groupe, montre que la quantité de pollen était significativement plus faible en Juin qu'aux mois de Mai, de Juillet ( $p < 0,01$ ) et d'Août ( $p < 0,05$ ).

**Figure 41 : Evolution mensuelle de la surface de pollen moyenne toutes colonies confondues : effet date  $p < 0,001$**



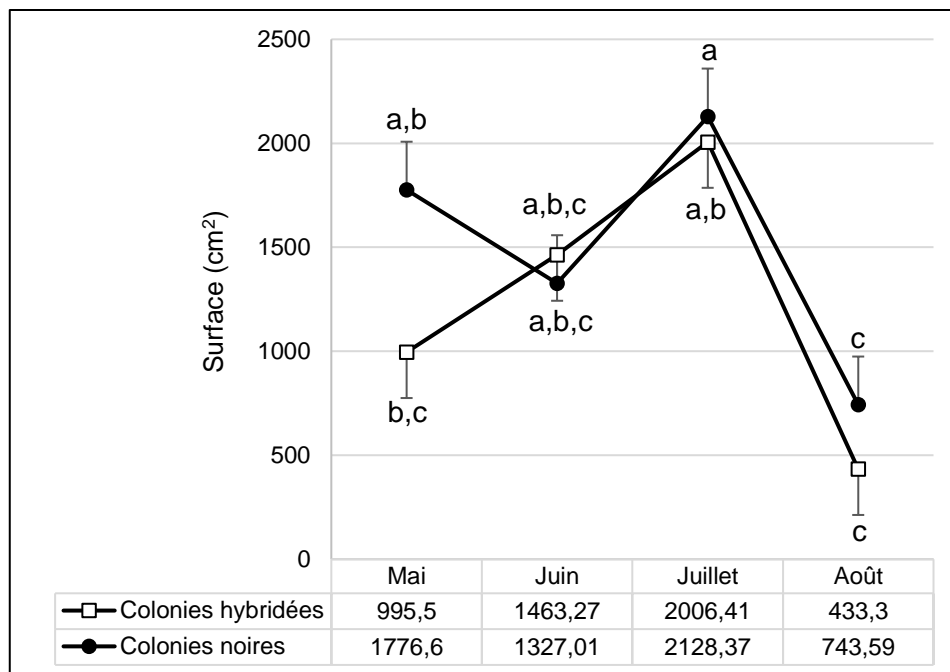
## 4. Couvain

### a. Couvain d'ouvrières

- Couvain ouvert

Chez les colonies hybridées, la surface de couvain ouvert d'ouvrières était significativement plus faible en Août qu'au mois de Juillet ( $p < 0,01$ , Figure 42). Une observation similaire a été faite chez les colonies noires ( $p < 0,05$ ). Dans les deux groupes, la surface de couvain ouvert d'ouvrières était équivalente entre Mai et Juillet. Aucune différence significative n'a été observée entre les deux groupes pour chacune des dates.

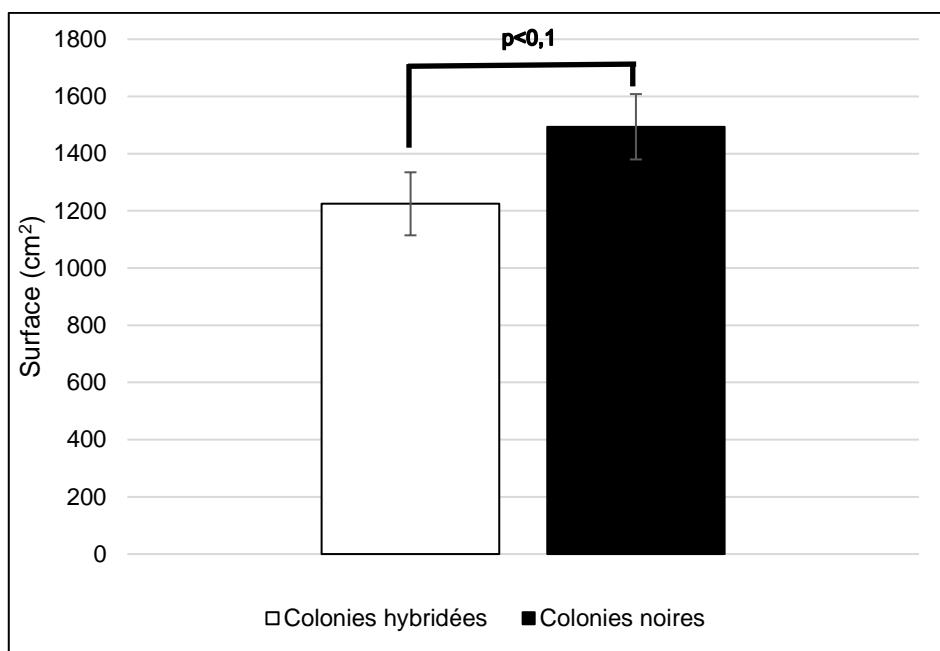
**Figure 42 : Evolution mensuelle de la surface de couvain ouvert d'ouvrières par groupe d'étude**



Sur l'ensemble de la période, la surface moyenne de couvain ouvert d'ouvrières était plus élevée chez les colonies noires (effet race,  $p < 0,1$ , tendance significative) de  $269,27 \pm 158,72 \text{ cm}^2$  (Figure 43).

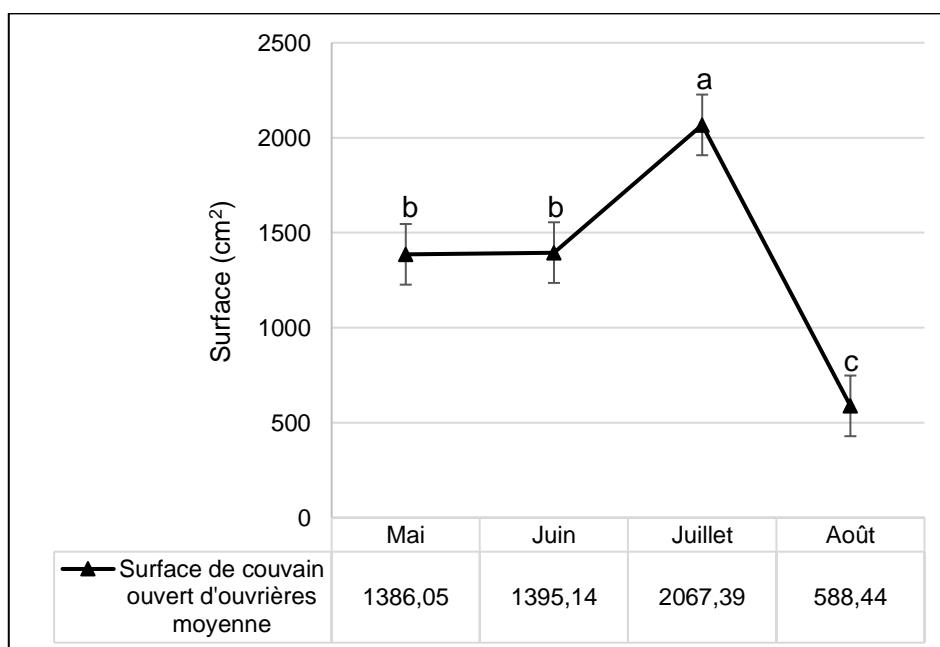


**Figure 43 : Surface de couvain ouvert d'ouvrières moyenne par groupe d'étude sur la période (Mai à Août 2022)**



Enfin, la surface moyenne de couvain ouvert d'ouvrières dans l'ensemble des colonies sur la période (Figure 44), étudiée sans distinction de groupe, était significativement plus élevée en Juillet qu'aux mois de Mai et de Juin ( $p < 0,05$ ) et significativement plus faible en Août qu'aux mois de Mai et de Juin ( $p < 0,01$ ), et qu'au mois de Juillet ( $p < 0,0001$ ).

**Figure 44 : Evolution mensuelle de la surface de couvain ouvert d'ouvrières moyenne toutes colonies confondues : effet date  $p < 0,0001$**

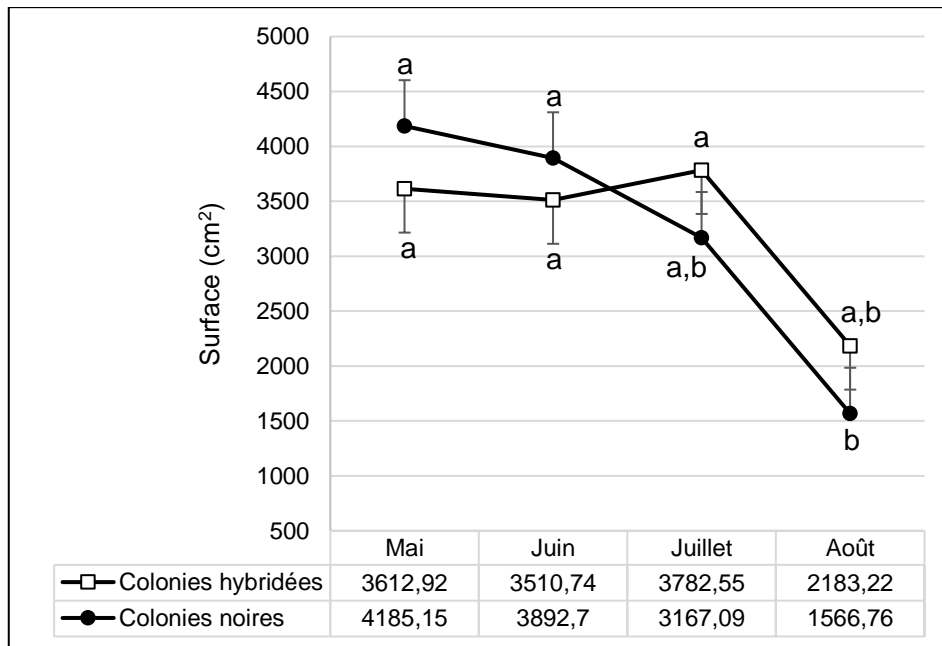


- Couvain fermé

Chez les colonies noires, la surface de couvain fermé d'ouvrières était significativement plus faible en Août qu'aux mois de Mai ( $p < 0,05$ ) et Juin ( $p < 0,05$ , Figure 39). Chez les colonies hybridées,

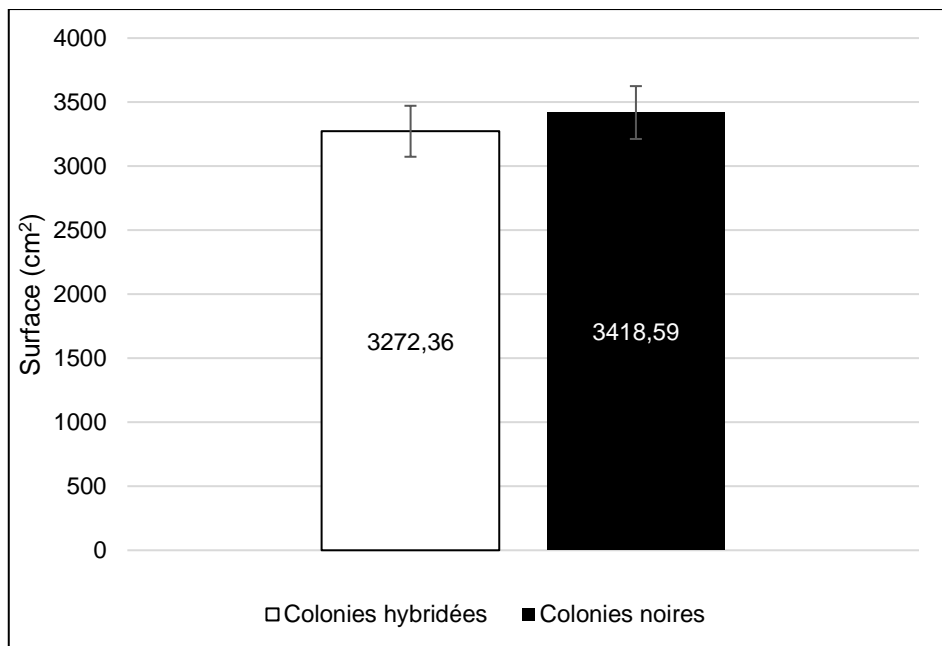
aucune différence significative n'a été observée. Aucune différence significative n'a été observée entre les deux groupes pour chacune des dates (Figure 45).

**Figure 45 : Evolution mensuelle de la surface de couvain fermé d'ouvrières par groupe d'étude**



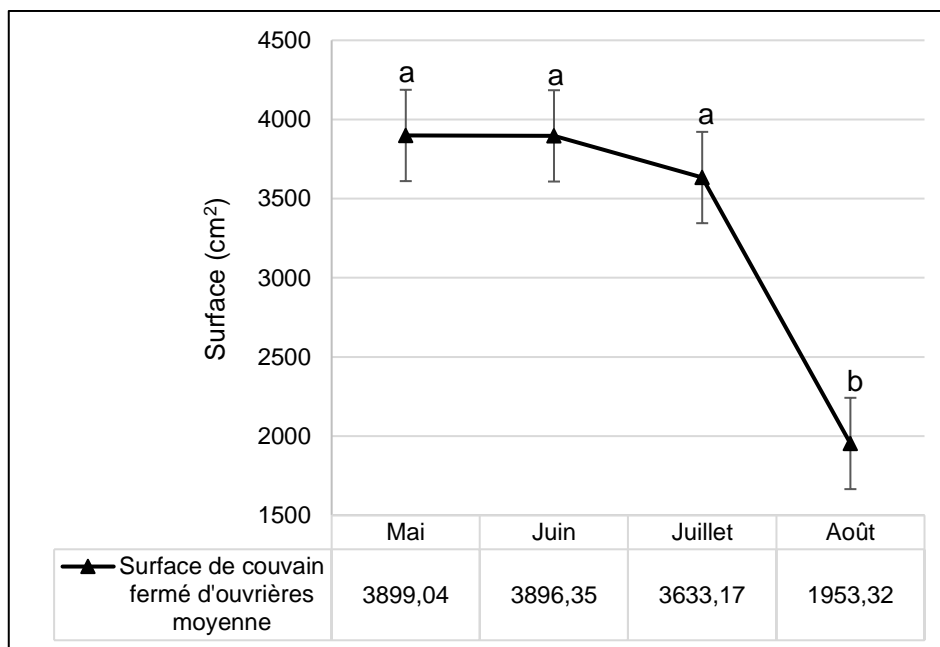
Sur l'ensemble de la période, la surface moyenne de couvain fermé d'ouvrières n'a pas montré de différence significative entre les deux groupes (Figure 46).

**Figure 46 : Surface de couvain fermé d'ouvrières moyenne par groupe d'étude sur la période (Mai à Août 2022)**



Enfin, la surface moyenne de couvain fermé d'ouvrières dans l'ensemble des colonies sur la période (Figure 47), étudiée sans distinction de groupe, était significativement plus élevée en Mai, Juin et Juillet qu'au mois d'Août ( $p < 0,01$ ), et ne variait pas significativement entre Mai et Juillet.

**Figure 47 : Evolution mensuelle de la surface de couvain fermé d'ouvrières moyenne toutes colonies confondues : effet date  $p < 0,0001$**

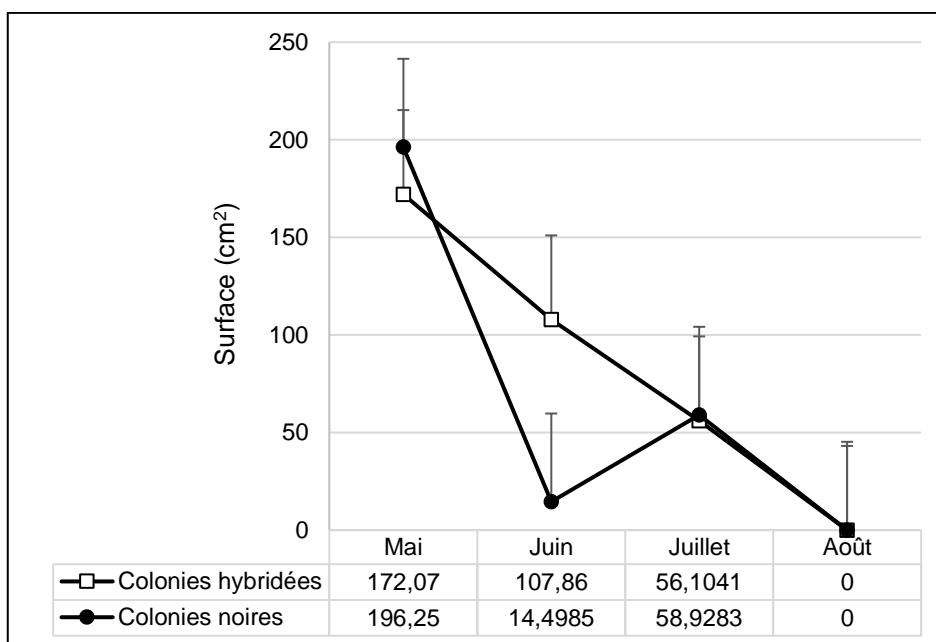


*b. Couvain de mâles*

- Couvain ouvert

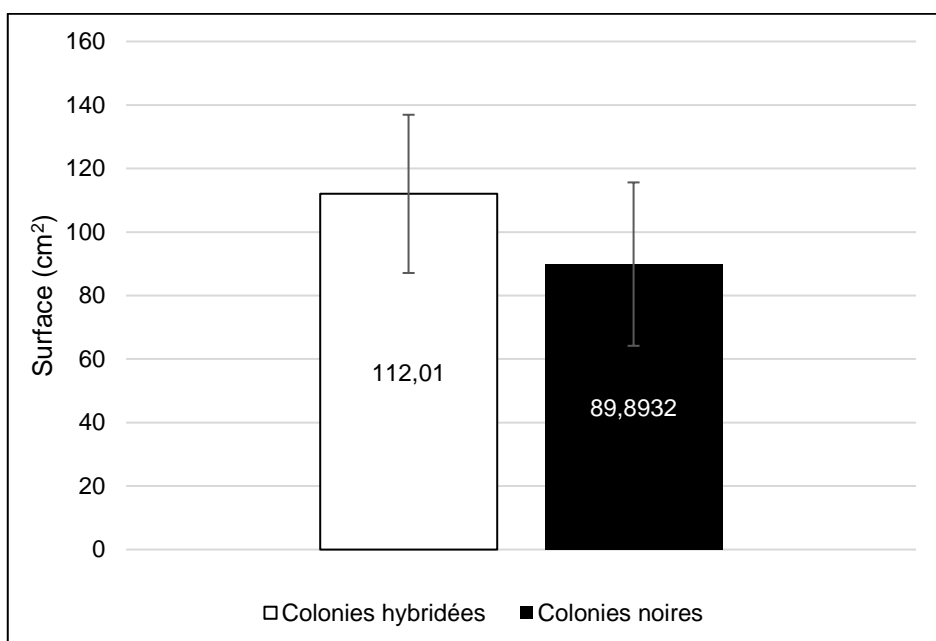
Au sein des deux groupes, la quantité couvain ouvert de mâles ne variait pas significativement au cours de la période d'étude (pas de différences significatives entre les dates, Figure 48). Aucune différence significative n'a été observée entre les deux groupes pour chacune des dates.

**Figure 48 : Evolution mensuelle de la surface de couvain ouvert de mâles par groupe d'étude**



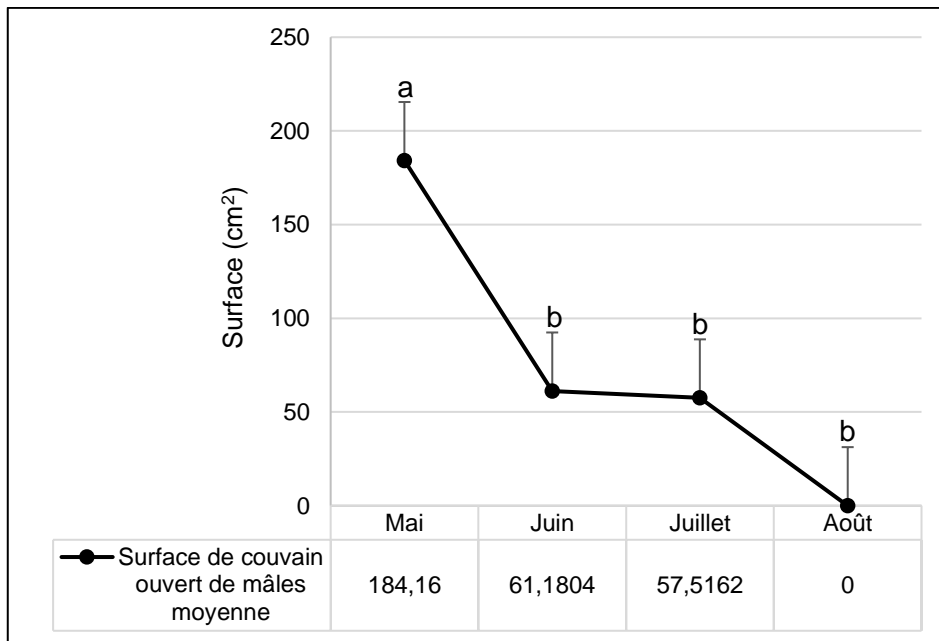
Sur l'ensemble de la période, la surface moyenne de couvain ouvert de mâles n'a pas montré de différence significative entre les deux groupes (Figure 49).

**Figure 49 : Surface de couvain ouvert de mâles moyenne par groupe d'étude sur la période (Mai à Août 2022)**



Enfin, la surface moyenne de couvain ouvert de mâles dans l'ensemble des colonies sur la période (Figure 50), étudiée sans distinction de groupe, était significativement plus élevée en Mai qu'aux mois de Juin et de Juillet ( $p < 0,05$ ). Elle ne montrait pas de différence significative entre les mois de Juin et de Juillet.

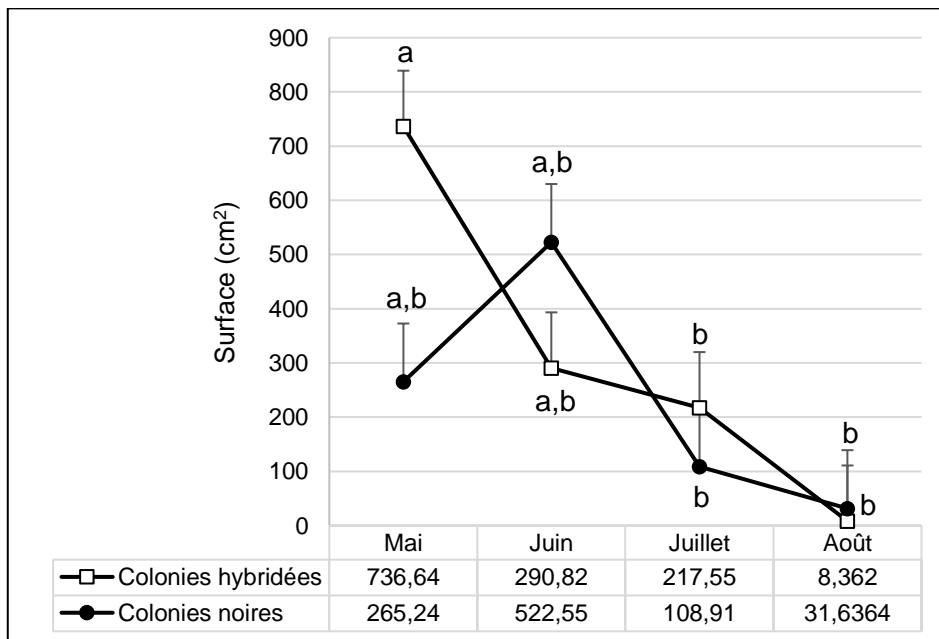
**Figure 50 : Evolution mensuelle de la surface de couvain ouvert de mâles moyenne toutes colonies confondues : effet date  $p < 0,0001$**



- Couvain fermé

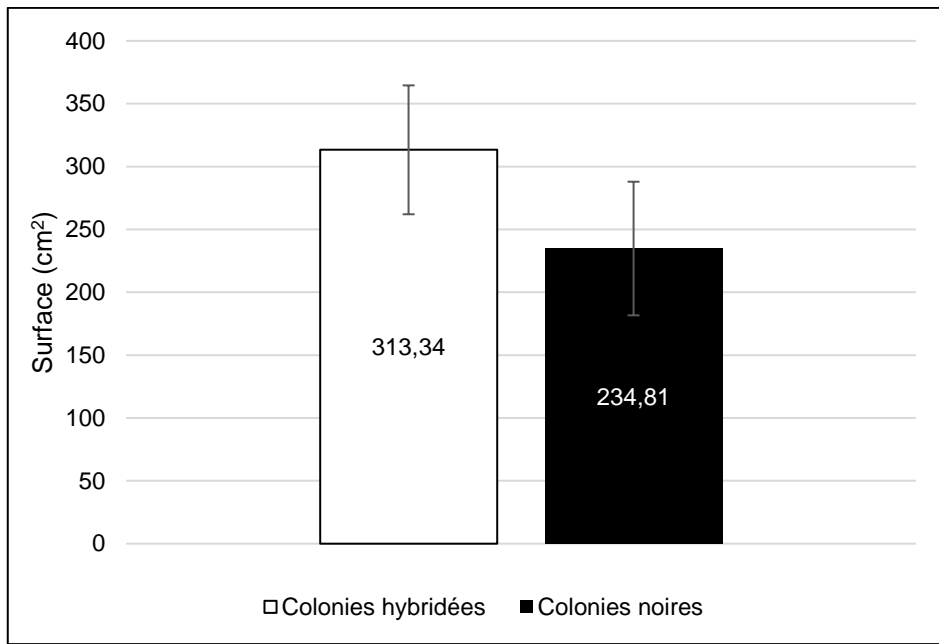
Chez les colonies hybridées, la surface de couvain fermé de mâles était plus élevée en Mai qu'en Juillet ( $p < 0,1$ , tendance significative) et qu'en Août ( $p < 0,01$ , Figure 51). Chez les colonies noires, aucune différence significative n'a été observée entre les dates. Aucune différence significative n'a été observée entre les deux groupes pour chacune des dates.

**Figure 51 : Evolution mensuelle de la surface de couvain fermé de mâles par groupe d'étude**



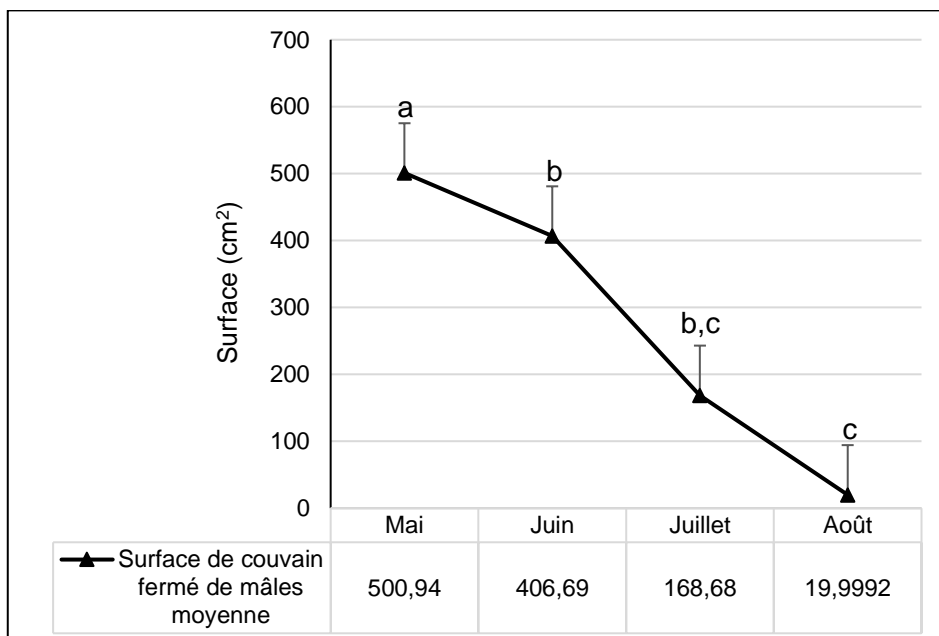
Sur l'ensemble de la période, la surface moyenne de couvain fermé de mâles n'a pas montré de différence significative entre les deux groupes (Figure 52).

**Figure 52 : Surface de couvain fermé de mâles moyenne par groupe d'étude sur la période (Mai à Août 2022)**



Enfin, la surface moyenne de couvain fermé de mâles dans l'ensemble des colonies sur la période (Figure 53), étudiée sans distinction de groupe, était significativement plus élevée en Mai qu'aux mois de Juin et de Juillet ( $p < 0,05$  et  $p < 0,01$  respectivement). Elle était également plus élevée au mois de Juin qu'au mois d'Août ( $p < 0,01$ ).

**Figure 53 : Evolution mensuelle de la surface de couvain fermé de mâles toutes colonies confondues : effet date  $p < 0,0001$**

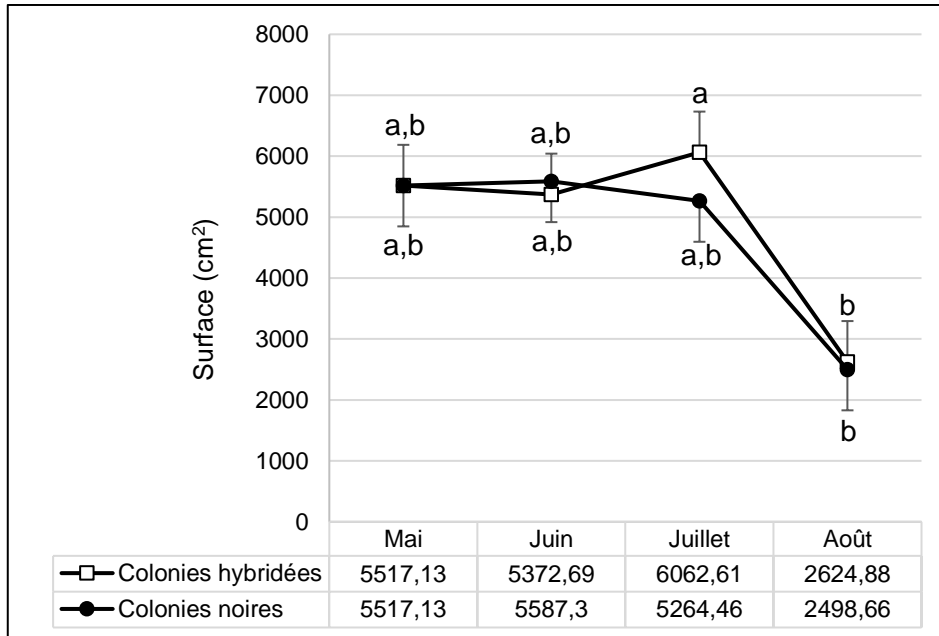


*c. Couvain total*

Afin de caractériser de manière plus globale la dynamique d'élevage du couvain, la surface de couvain total (somme du couvain ouvert et fermé d'ouvrières et de mâles) a été comparée.

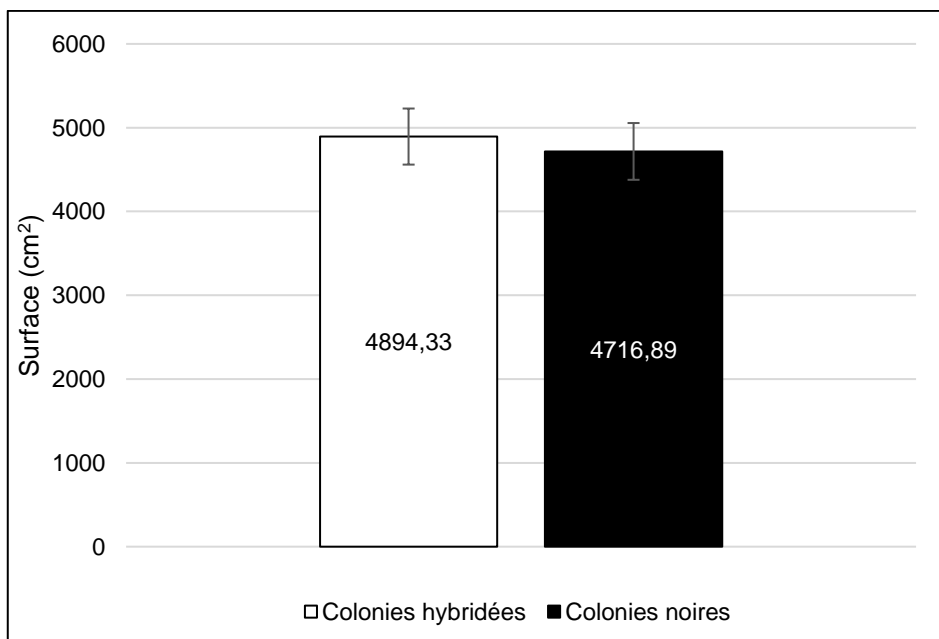
Chez les deux groupes, la surface de couvain total ne variait pas significativement entre Mai et Juillet. Cependant, elle était significativement plus faible en Août qu'au mois de Juillet chez les colonies hybridées ( $p < 0,1$ , tendance significative, Figure 54). Une telle observation n'a pas été retrouvée chez les colonies noires.

**Figure 54 : Evolution mensuelle de la surface de couvain total par groupe d'étude**



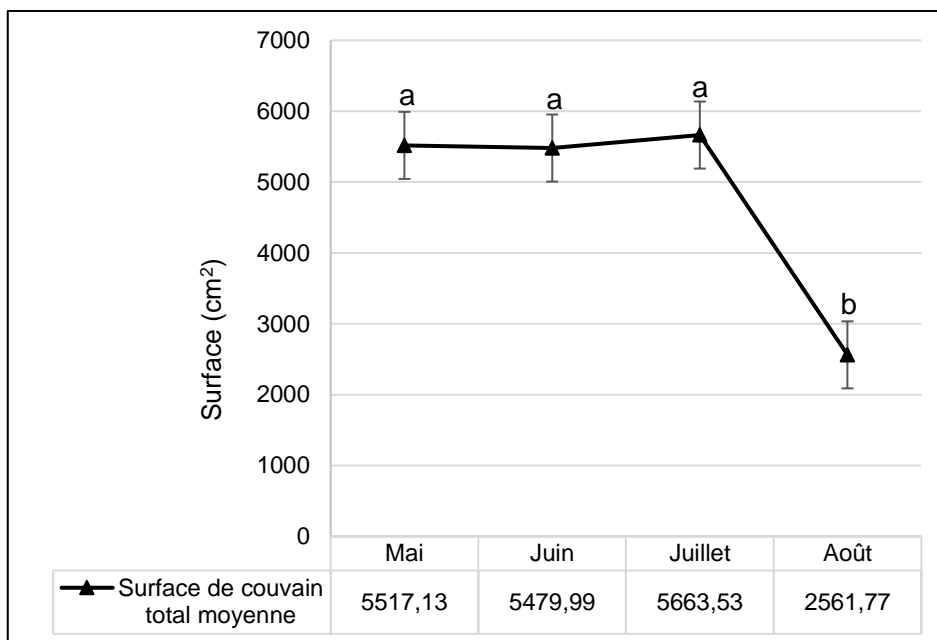
Sur l'ensemble de la période, la surface moyenne de couvain total n'a pas montré de différence significative entre les deux groupes (Figure 55).

**Figure 55 : Surface de couvain total moyenne par groupe d'étude sur la période (Mai à Août 2022)**



Enfin, la surface moyenne de couvain total dans l'ensemble des colonies sur la période, étudiée sans distinction de groupe (Figure 56), était significativement plus faible en Août qu'aux mois de Mai, Juin et Juillet ( $p < 0,01$ ).

**Figure 56 : Evolution mensuelle de la surface de couvain total moyenne toutes colonies confondues : effet date  $p < 0,0001$**

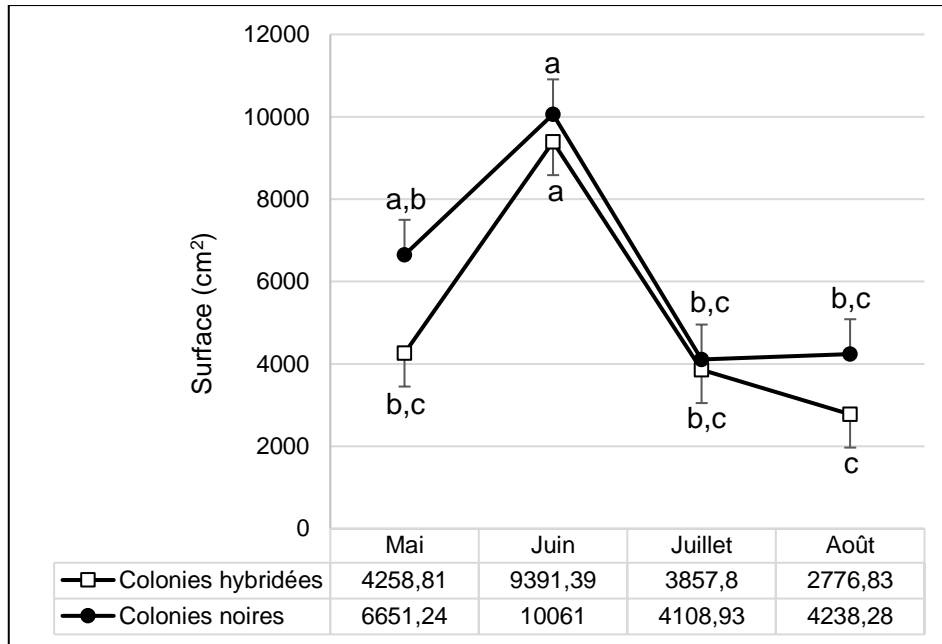


### 5. Cellules vides

Chez les colonies hybridées, la surface de cellules vides était plus élevée en Juin qu'aux mois de Mai ( $p < 0,05$ , Figure 57), de Juillet ( $p < 0,01$ ) et d'Août ( $p < 0,01$ ). Chez les colonies noires, la surface vide en Juin n'était pas statistiquement différente de celle au mois de Mai, mais était plus élevée qu'aux mois de Juillet et d'Août ( $p < 0,05$ ).

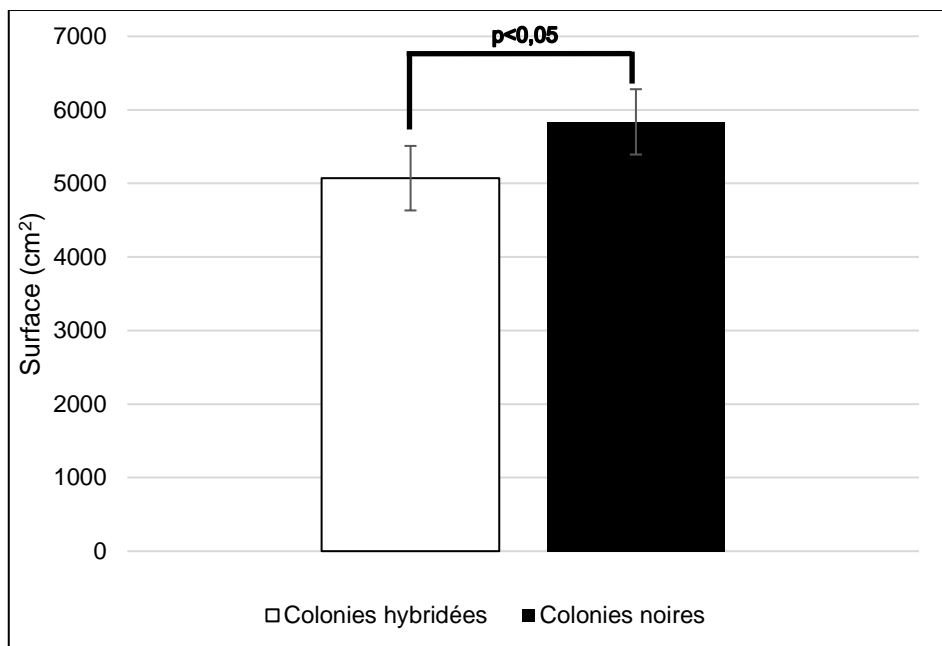


**Figure 57 : Evolution mensuelle de l'espace vide par groupe d'étude**



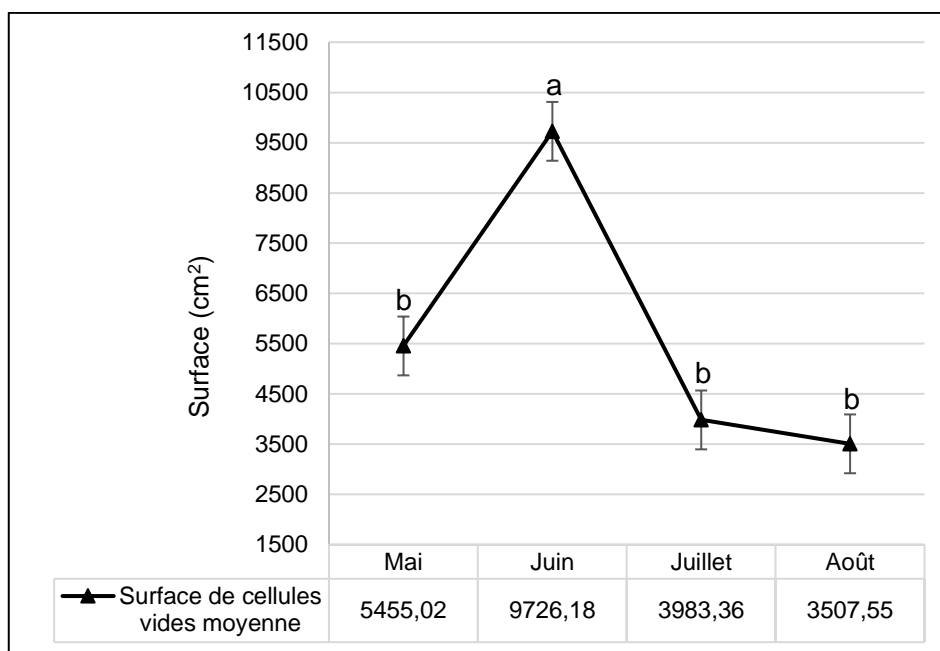
Sur l'ensemble de la période, la surface vide moyenne était plus élevée chez les colonies noires (effet race,  $p < 0,05$ ) de  $1193,65 \pm 586,13 \text{ cm}^2$  (Figure 58).

**Figure 58 : Surface de cellules vides moyenne par groupe d'étude sur la période (Mai à Août 2022)**



La surface moyenne de cellules vides dans l'ensemble des colonies sur la période (Figure 59), étudiée sans distinction de groupe, était significativement plus élevée en Juin qu'aux mois de Mai, de Juillet et d'Août ( $p < 0,0001$ ).

**Figure 59 : Evolution mensuelle de la surface de cellules vides moyenne toutes colonies confondues : effet date  $p < 0,0001$**

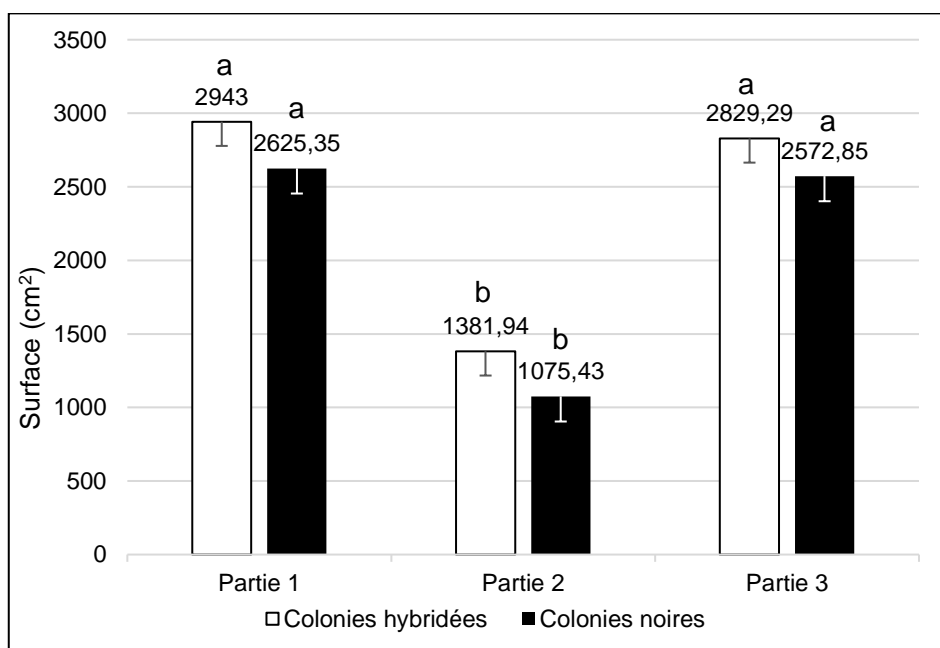


## 6. Structuration spatiale des ruches

### a. Répartition du miel operculé

Les réserves de miel n'étaient pas réparties de manière uniforme dans la ruche chez les deux groupes (effet partie,  $p < 0,0001$ ). Les parties 1 et 3 contenaient plus de miel operculé que la partie 2 ( $p < 0,0001$ , Figure 60) pour les deux groupes. Pour une partie donnée, aucune différence significative n'a été observée entre les deux groupes.

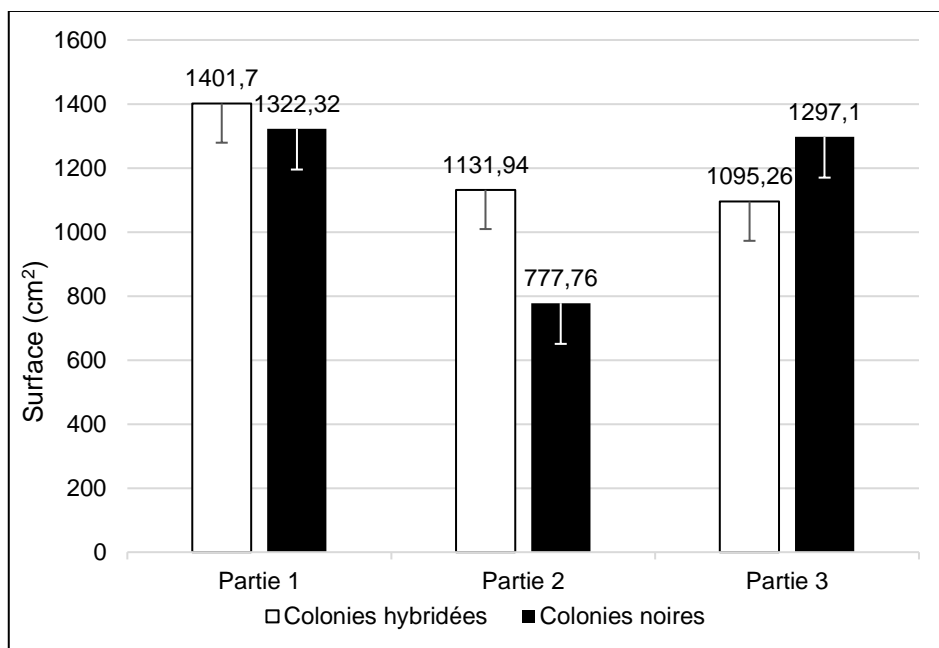
**Figure 60 : Répartition moyenne du miel operculé sur la période (Mai à Août 2022)**



*b. Répartition du nectar*

Les réserves de nectar étaient réparties de manière uniforme dans la ruche chez les deux groupes. Pour une partie donnée, aucune différence significative n'a été observée entre les deux groupes (Figure 61).

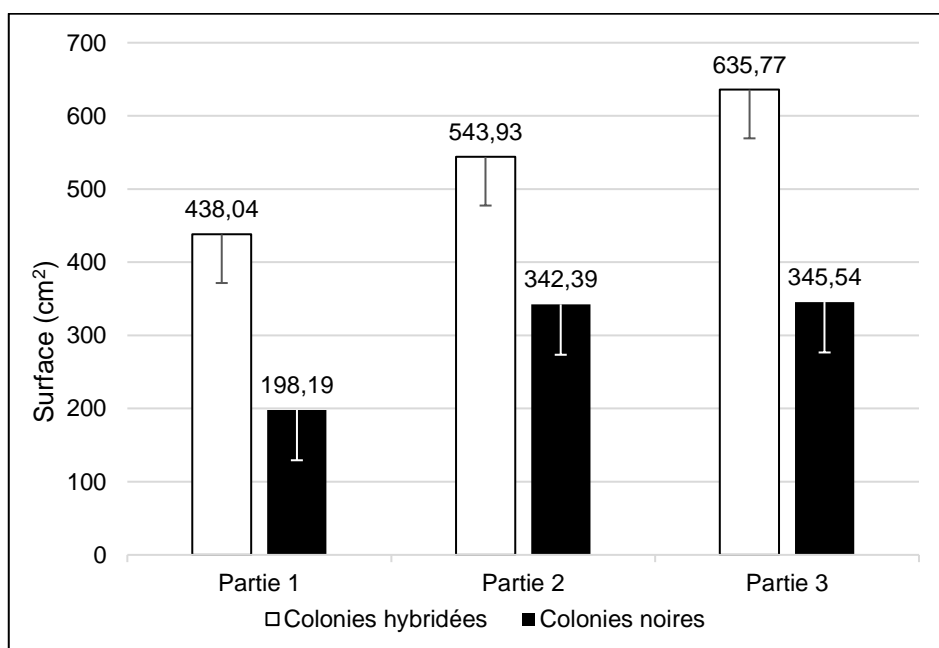
**Figure 61 : Répartition moyenne du nectar sur la période (Mai à Août 2022)**



*c. Répartition du pollen*

Les réserves de pollen étaient réparties de manière uniforme dans la ruche chez les deux groupes. Pour une partie donnée, aucune différence significative n'a été observée entre les deux groupes (Figure 62).

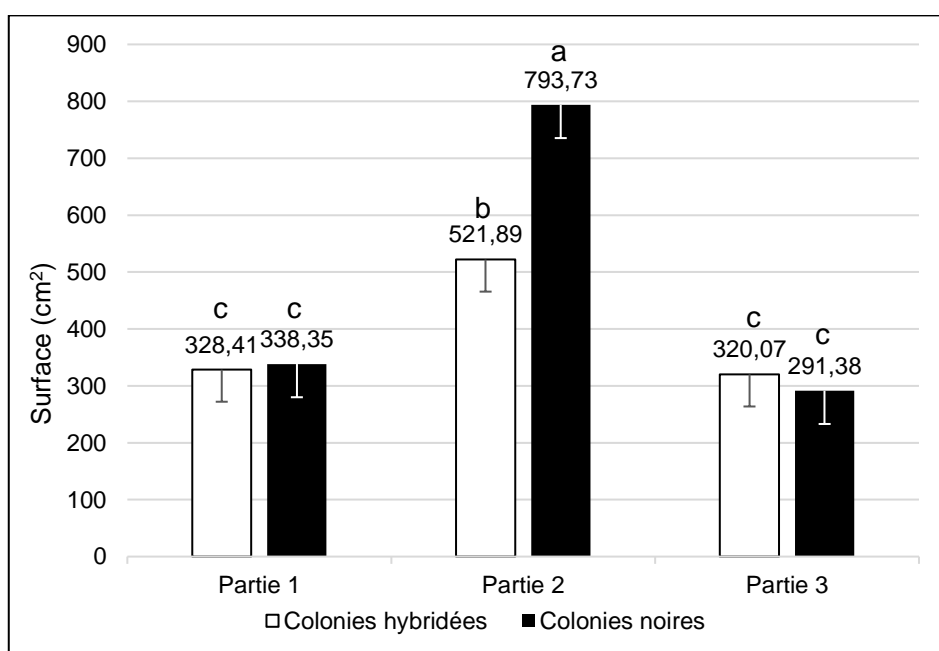
**Figure 62 : Répartition moyenne du pollen sur la période (Mai à Août 2022)**



*d. Répartition du couvain ouvert d'ouvrières*

Le couvain ouvert d'ouvrières n'était pas réparti de manière uniforme dans la ruche chez les deux groupes (effet partie,  $p < 0,0001$ ). Chez les colonies hybridées, la partie 2 contenait plus de couvain ouvert d'ouvrières que les parties 1 et 3 ( $p < 0,0001$ , Figure 63). Une telle observation a été retrouvée chez les colonies noires ( $p < 0,0001$ ). De plus, la partie 2 contenait plus de couvain ouvert d'ouvrières chez les colonies noires que chez les colonies hybridées ( $p < 0,1$ , tendance significative).

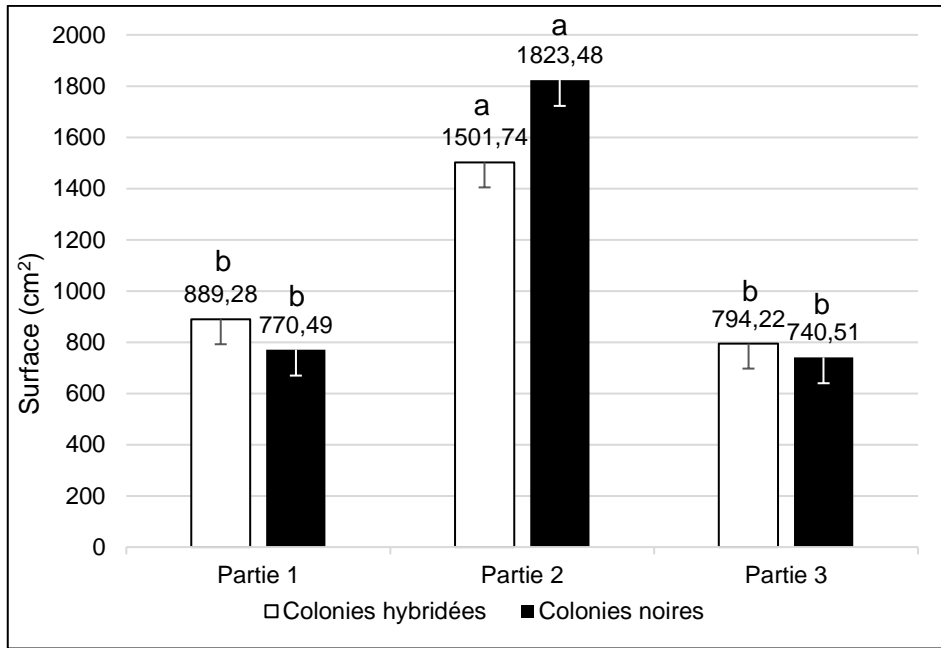
**Figure 63 : Répartition moyenne de couvain ouvert d'ouvrières sur la période (Mai à Août 2022)**



*e. Répartition du couvain fermé d'ouvrières*

Le couvain fermé d'ouvrières n'était pas réparti de manière uniforme dans la ruche chez les deux groupes (effet partie,  $p < 0,0001$ ). Chez les colonies hybridées, la partie 2 contenait plus de couvain fermé d'ouvrières que les parties 1 et 3 ( $p < 0,01$  et  $p < 0,0001$  respectivement, Figure 64). Une telle observation a été retrouvée chez les colonies noires ( $p < 0,0001$ ). Pour une partie donnée, aucune différence significative n'a été observée entre les deux groupes.

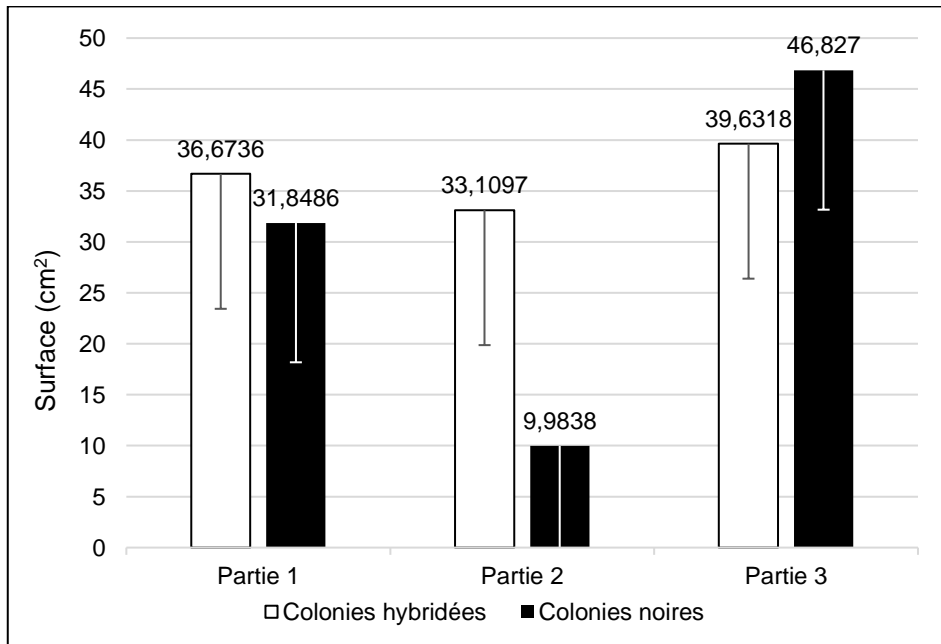
**Figure 64 : Répartition moyenne de couvain fermé d'ouvrières sur la période (Mai à Août 2022)**



*f. Répartition du couvain ouvert de mâles*

Le couvain ouvert de mâles était réparti de manière uniforme dans la ruche chez les deux groupes. Pour une partie donnée, aucune différence significative n'a été observée entre les deux groupes (Figure 65).

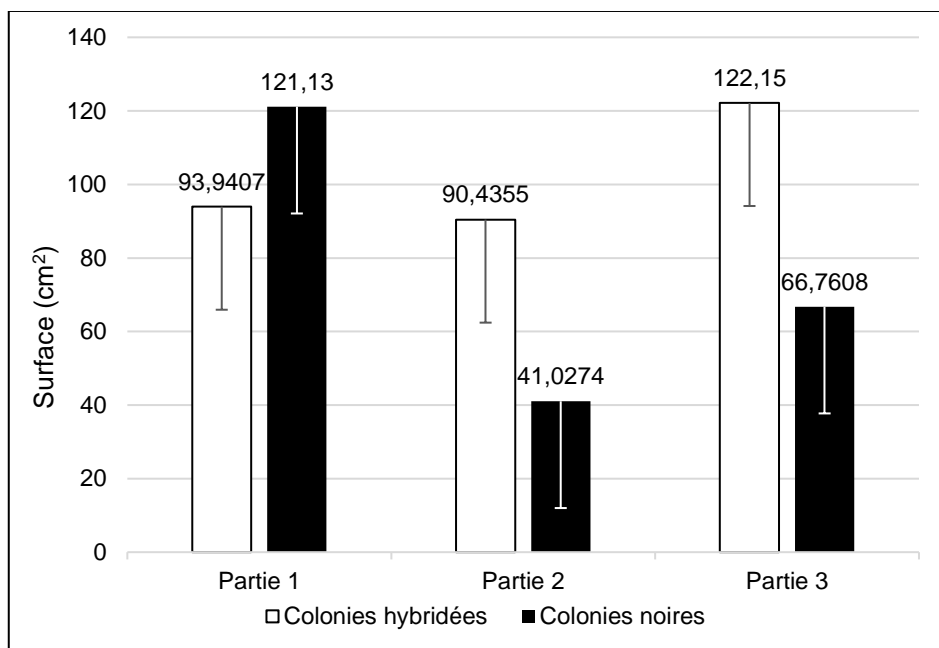
**Figure 65 : Répartition moyenne de couvain ouvert de mâles sur la période (Mai à Août 2022)**



*g. Répartition du couvain fermé de mâles*

Le couvain fermé de mâles était réparti de manière uniforme dans la ruche chez les deux groupes. Pour une partie donnée, aucune différence significative n'a été observée entre les deux groupes (Figure 66).

**Figure 66 : Répartition moyenne de couvain fermé de mâles sur la période (Mai à Août 2022)**

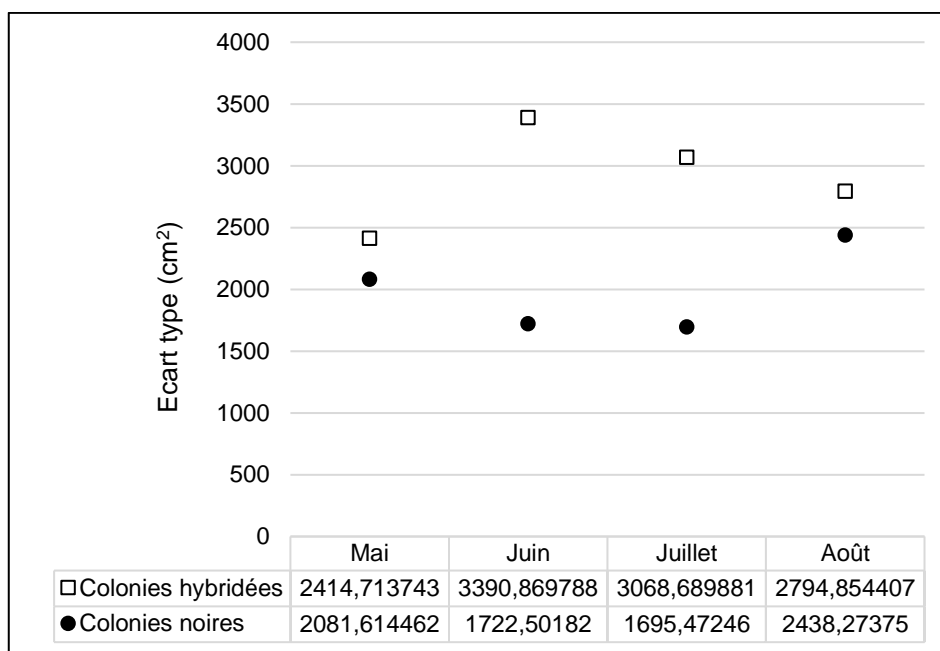


## 7. Variabilité intra-groupe

*a. Miel operculé*

Concernant la quantité de miel operculé, l'écart type moyen mensuel était plus élevé chez les colonies hybridées durant toute la période d'étude (Figure 67). Les écarts les plus importants ont été observés en Juin et en Juillet.

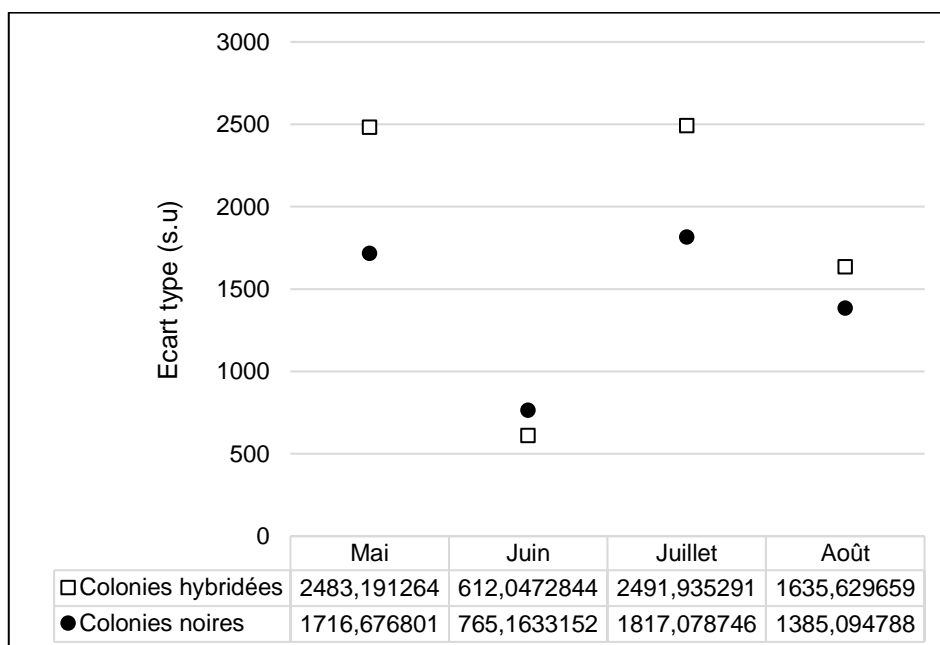
**Figure 67 : Ecart-type mensuels moyens de la quantité de miel operculé par groupe d'étude**



*b. Nectar*

Concernant la quantité de nectar, les écarts-types moyens mensuels des deux groupes étaient très proches en Juin et en Août (Figure 68). Ils étaient plus élevés chez les colonies hybridées en Mai et en Juillet.

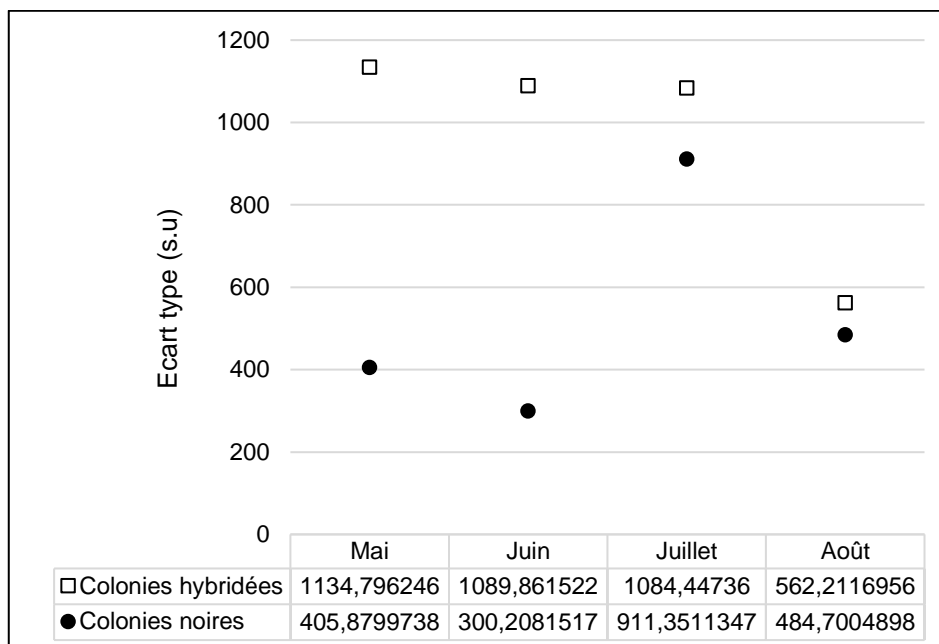
**Figure 68 : Ecart-type mensuels moyens de la quantité de nectar par groupe d'étude**



c. Pollen

Concernant la quantité de pollen, l'écart type moyen mensuel était plus élevé chez les colonies hybridées durant toute la période d'étude (Figure 69). Les écarts les plus importants ont été observés en Mai et en Juin.

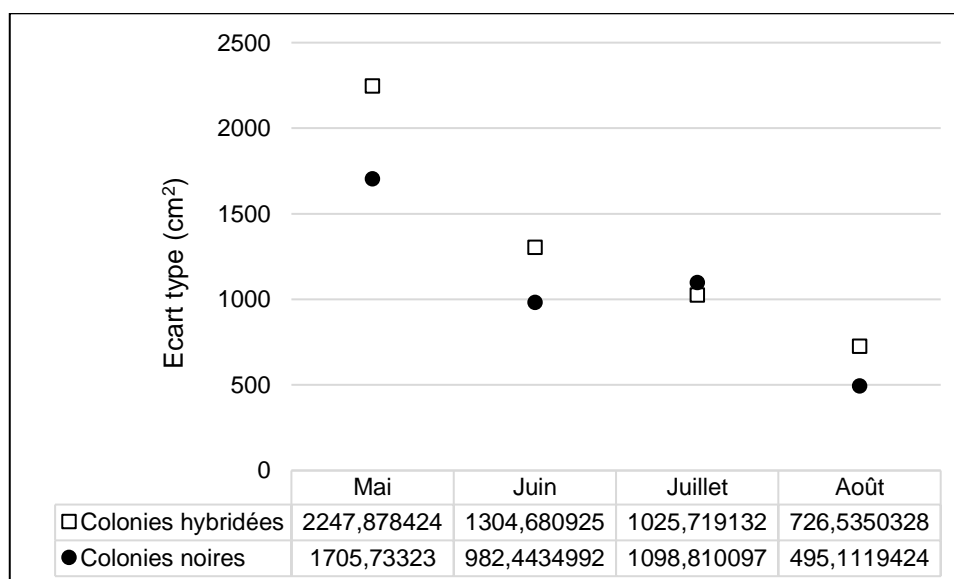
**Figure 69 : Ecarts-type mensuels moyens de la quantité de pollen stocké par groupe d'étude**



d. Couvain fermé d'ouvrières

Les écarts-types concernant le couvain fermé d'ouvrières étaient semblables entre les deux groupes en fin de période d'étude (mois de Juillet et Août, Figure 70). Ils étaient plus élevés chez les colonies hybridées en Mai et en Juin.

**Figure 70 : Ecarts-type mensuels moyens de la quantité de couvain fermé d'ouvrières par groupe d'étude**

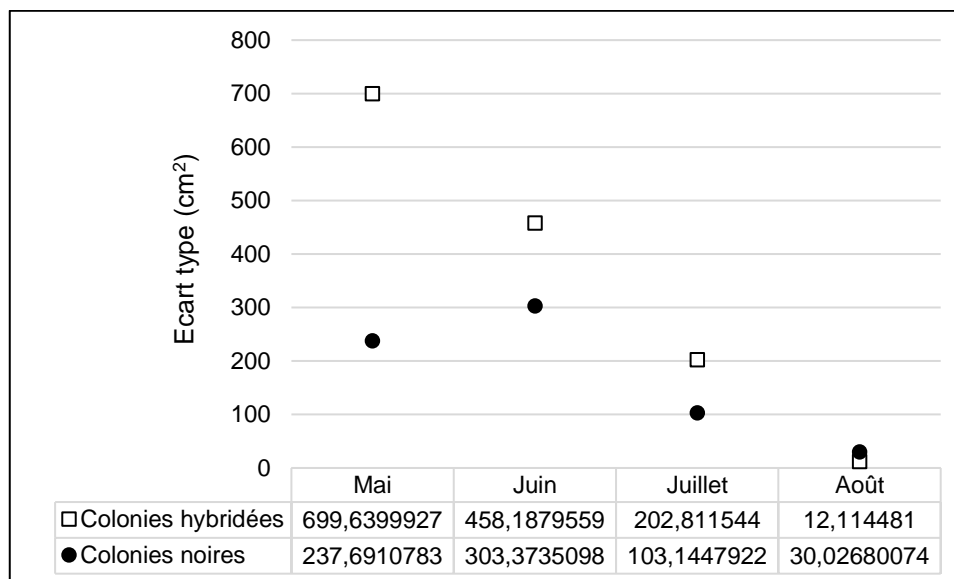




### e. Couvain fermé de mâles

Les écarts-types concernant le couvain fermé de mâles étaient plus élevés chez les colonies hybridées durant toute la période d'étude, sauf en Août (Figure 71). L'écart le plus important était observé en début de saison, puis s'estompait par la suite.

**Figure 71 : Ecart-type mensuels moyens de la quantité de couvain fermé de mâles par groupe d'étude**

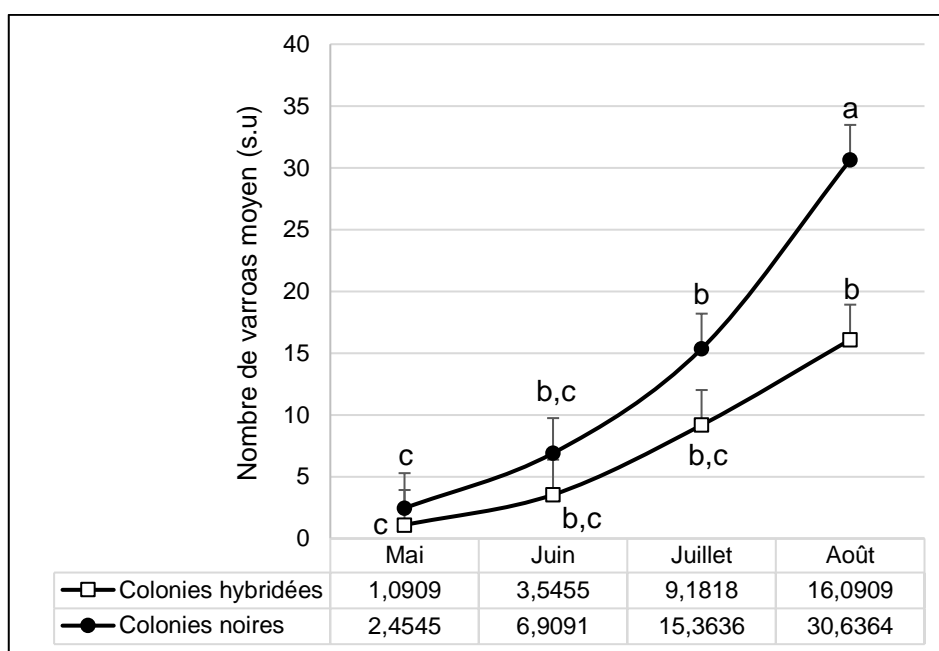


## E. Résultats du suivi de l'infestation en varroa

### 1. Taux d'infestation

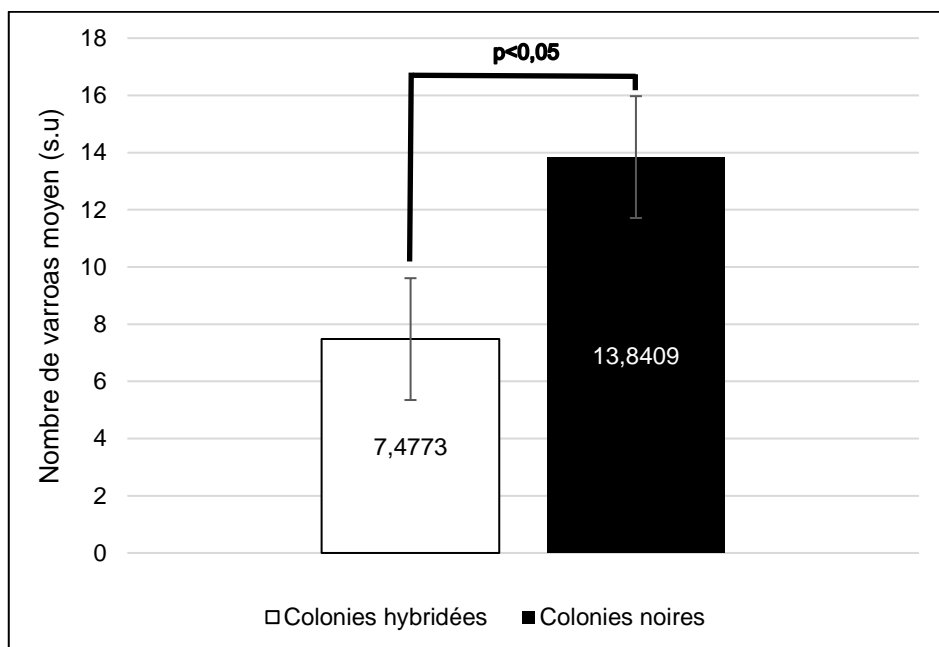
Dans les conditions de l'étude, le nombre de varroas moyen pour 300 ouvrières augmentait entre Mai et Août pour les deux groupes (effet date,  $p < 0,0001$ ). Il augmentait plus rapidement chez les colonies noires que chez les colonies hybridées (effet race\*date,  $p < 0,05$ , Figure 72).

**Figure 72 : Evolution mensuelle du nombre de varroas moyen pour 300 ouvrières par groupe d'étude : effet race\*date  $p<0,05$  et effet date  $p<0,0001$**



De plus, le nombre de varroas moyen pour 300 ouvrières était plus élevé chez les colonies noires sur l'ensemble de la période ( $p<0,05$ , Figure 73).

**Figure 73 : Nombre de varroas moyen pour 300 ouvrières par groupe d'étude sur la période (Mai à Août 2022)**



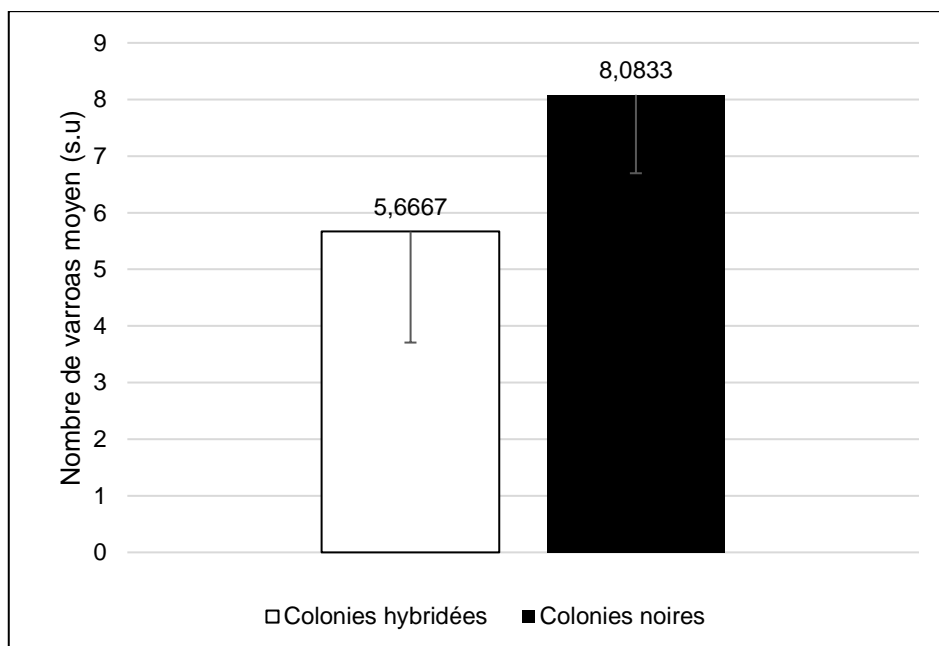
Pour les colonies hybridées, le taux d'infestation moyen restait inférieur à 5% (soit moins de 15 varroas pour 300 abeilles) jusqu'en Juillet, seuil définissant une colonie peu parasitée ne nécessitant pas de traitement immédiat (Vidal-Naquet, 2011 ; Vidal-Naquet, 2015). Pour les colonies noires, ce seuil était dépassé entre Juin et Juillet.

Au mois d’Août, les colonies hybridées montraient un taux d’infestation moyen compris entre 5 et 10%, elles étaient donc considérées comme moyennement infestées et un traitement devait être planifié assez rapidement. Les colonies noires quant à elles, avaient un taux d’infestation moyen de 10,21% et nécessitaient un traitement immédiat (Vidal-Naquet, 2011 ; Vidal-Naquet, 2015).

Une analyse statistique complémentaire a été réalisée en n’incluant que les colonies dont le nombre de varroas initial était nul : 6 colonies hybridées et 6 colonies noires ont ainsi pu être comparées (Figures 74 et 75). Aucun effet race n’a alors été observé, ce qui signifie que la charge parasitaire des colonies noires était équivalente à celle des colonies hybridées (Figure 74). L’effet date est conservé sur l’ensemble de la période ( $p < 0,0001$ ). De plus, la dynamique d’infestation chez les colonies noires devenait statistiquement équivalente à celle des colonies hybridées entre Mai et Juillet dans les nouvelles conditions de comparaison (Figure 75).

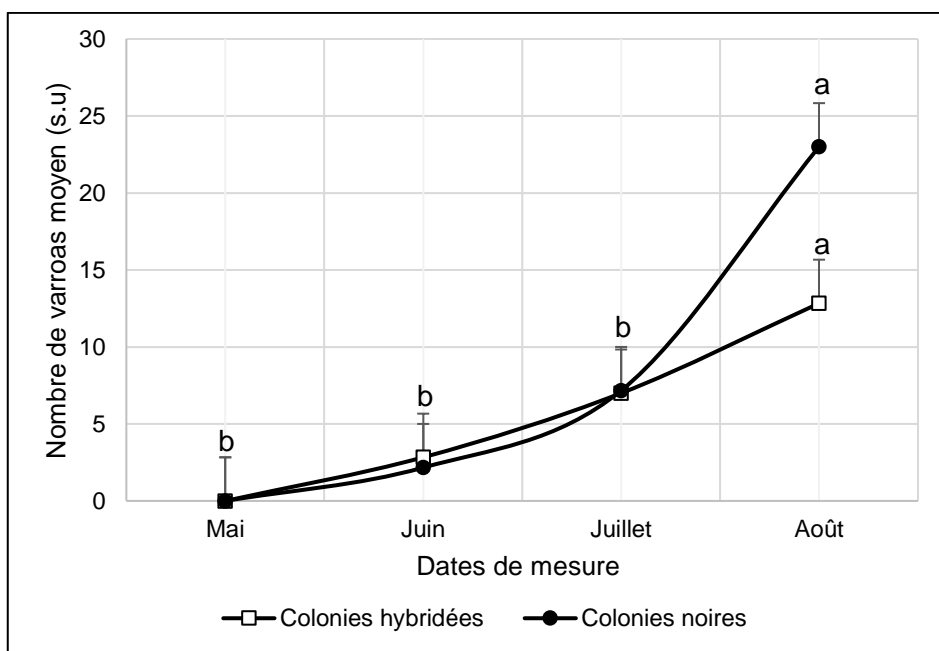
Cependant, il est à noter que le nombre de varroas moyen sur la période d’étude restait plus élevé chez les colonies noires, même si la différence observée n’était pas significative d’un point de vue statistique (Figure 75).

**Figure 74 : Nombre de varroas moyen pour 300 ouvrières par groupe d’étude à charge initiale identique sur la période (Mai à Août 2022)**



La Figure 75 montre que les deux groupes admettaient alors une dynamique d’infestation similaire entre Mai et Juillet. En fin de saison cependant, la dynamique d’infestation était exponentielle chez le groupe des colonies noires, tandis qu’elle demeurait linéaire chez le groupe des colonies hybridées. Il est intéressant de noter que, dans des conditions d’infestation initiales identiques, les colonies noires dépassaient le seuil d’alerte de 5% d’infestation (soit 15 varroas pour 300 abeilles) entre Juillet et Août, tandis que les colonies hybridées ne dépassaient jamais ce seuil. Les deux groupes montraient donc des dynamiques d’infestation bien distinctes en fin de saison, bien que ces différences n’étaient pas significatives d’un point de vue statistique.

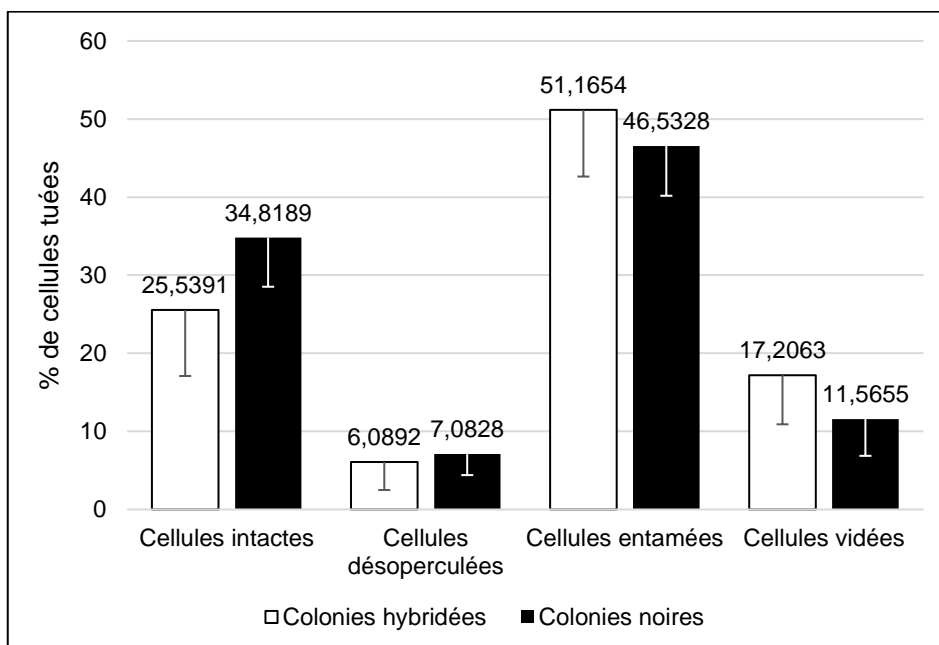
**Figure 75 : Evolution du nombre de varroas moyen pour 300 ouvrières par groupe d'étude à charge initiale identique : effet date  $p < 0,0001$**



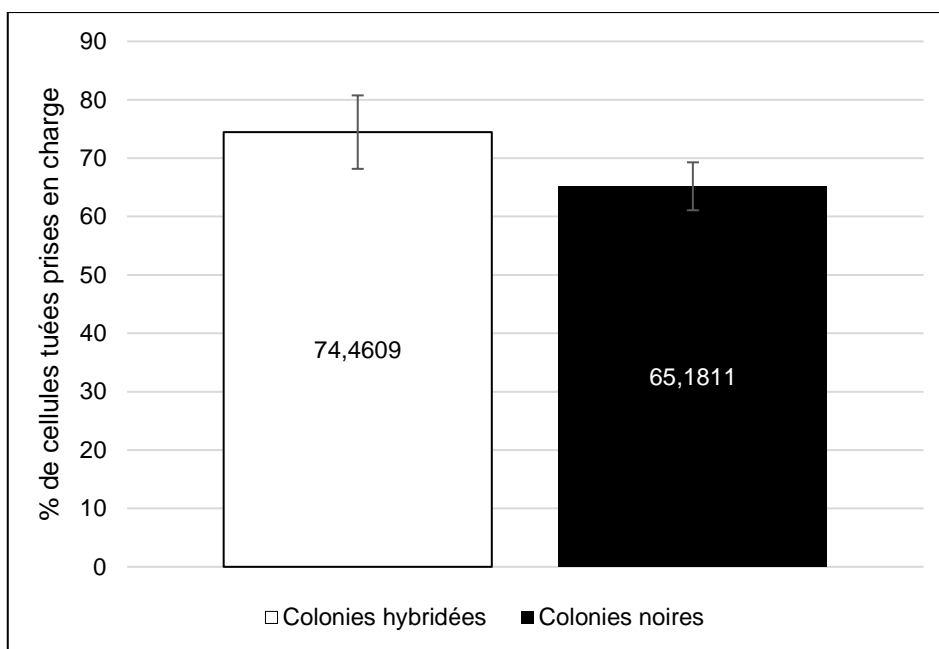
## 2. Comportement hygiénique

Aucune différence significative n'a été observée entre les colonies des deux groupes pour chaque catégorie de cellules (Figure 76). Le nombre de larves tuées prises en charge n'était pas statistiquement différent entre les deux groupes (Figure 77).

**Figure 76 : Comportement hygiénique des groupes d'étude**



**Figure 77 : Pourcentage de cellules tuées prises en charge par groupe d'étude**

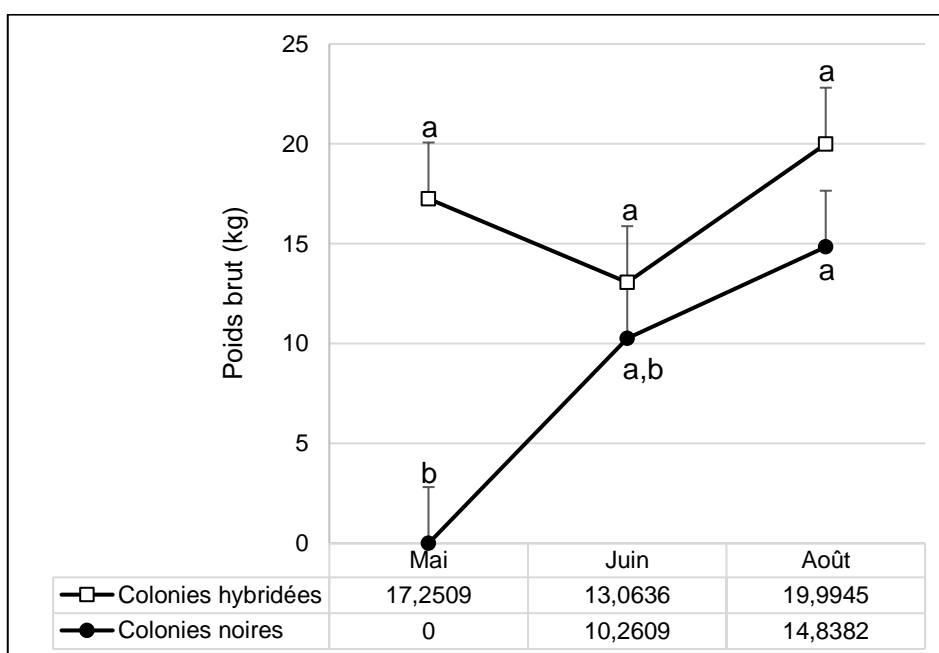


## F. Résultats du suivi du poids des colonies

### 1. Récoltes de miel

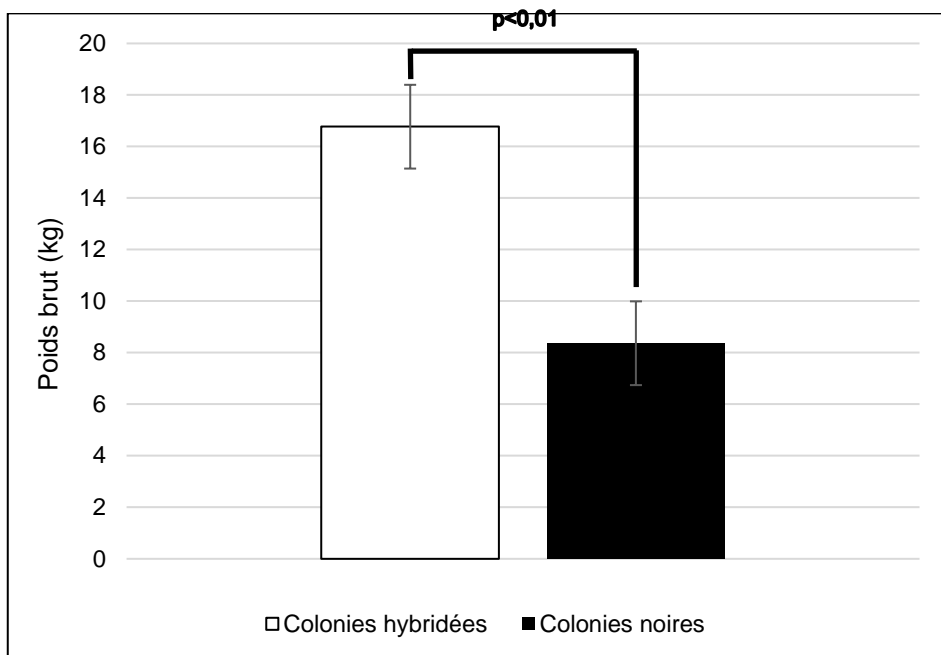
En Mai, la récolte de miel était plus élevée chez les colonies hybridées que chez les colonies noires ( $p < 0,01$ , Figure 78). Aucune différence significative n'a été observée pour les récoltes de Juin et d'Août entre les deux groupes. Chez les colonies noires, la récolte de miel était plus élevée en Août qu'au mois de Mai ( $p < 0,05$ ).

**Figure 78 : Récolte de miel par groupe d'étude**



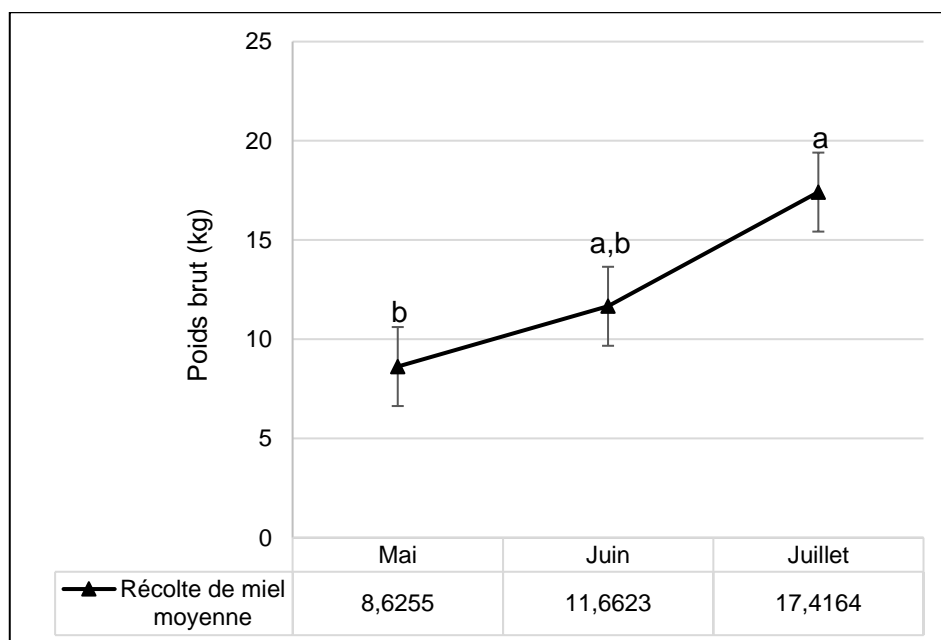
Sur l'ensemble de la période, la récolte de miel était plus élevée chez les colonies hybridées (effet race,  $p < 0,01$ , Figure 79) de  $8,4 \pm 2,3$  kg.

**Figure 79 : Récolte de miel par groupe d'étude sur la période (Mai à Août 2022)**



La récolte de miel de l'ensemble des colonies sur la période (Figure 80), étudiée sans distinction de groupe, était significativement plus élevée en Juillet qu'au mois de Mai ( $p < 0,1$ , tendance significative).

**Figure 80 : Récolte de miel moyenne toutes colonies confondues : effet date  $p < 0,01$**



## 2. Poids cumulé

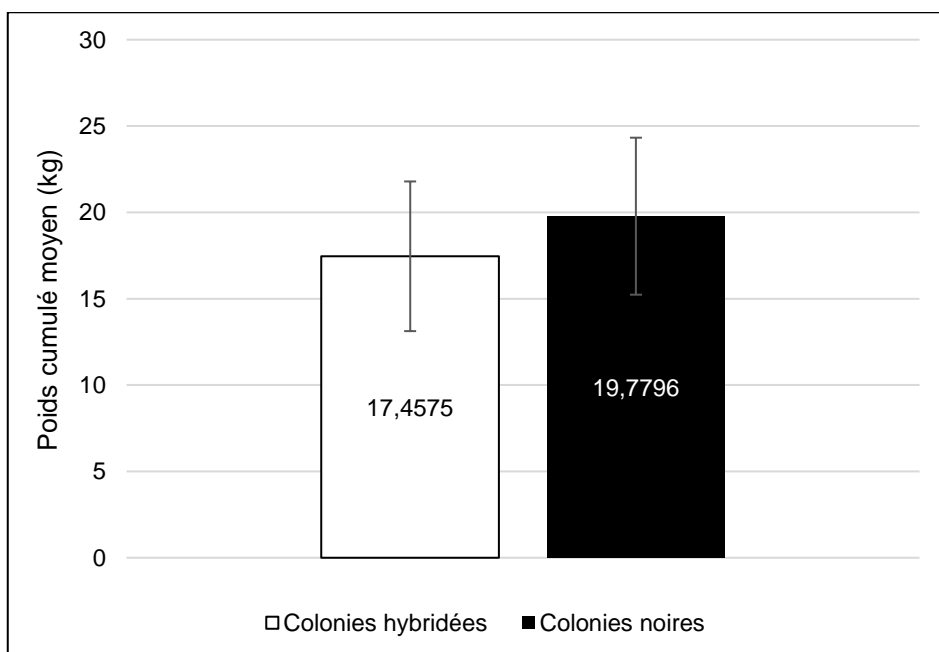
Aucune différence significative n'a été observée entre les deux groupes pour chacune des dates. (Figure 81).

**Figure 81 : Evolution hebdomadaire du poids cumulé par groupe d'étude**



Sur l'ensemble de la période d'étude, le poids cumulé moyen des deux groupes n'admettait pas de différence significative (Figure 82).

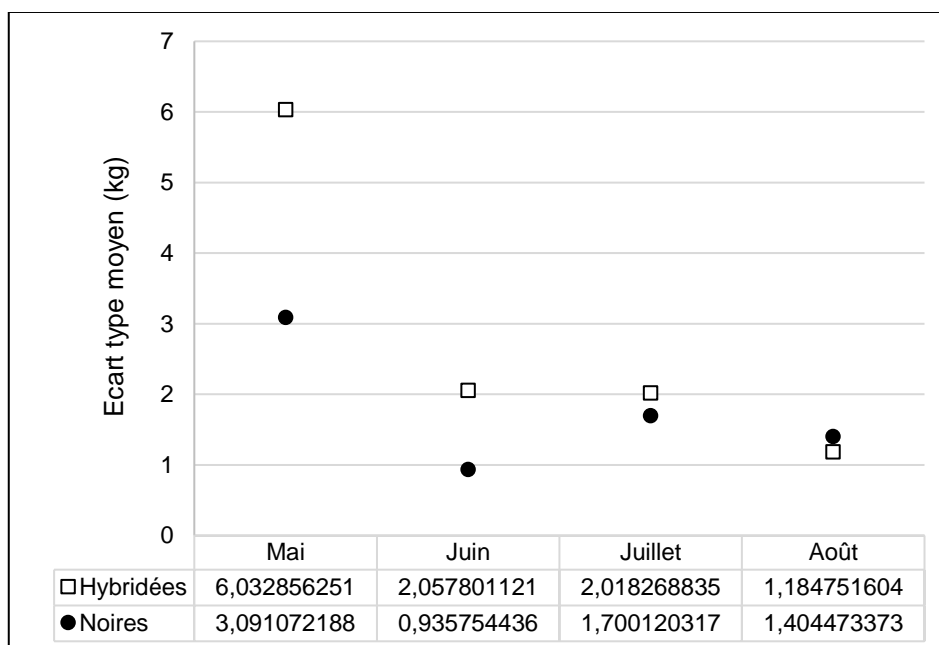
**Figure 82 : Poids cumulé moyen par groupe d'étude sur la période (Mai à Août 2022)**



### 3. Variabilité intra-groupe

L'écart type moyen du poids des colonies était plus élevé au mois de Mai chez les colonies hybridées (Figure 83). En Juin, l'écart se réduisait puis les écarts-types des deux groupes devenaient semblables en Juillet et en Août.

**Figure 83 : Ecarts-types mensuels moyens du poids cumulé des colonies par groupe d'étude**



### 4. Variation du poids cumulé lors de conditions climatiques dégradées

Durant la période d'étude, 4 épisodes de conditions climatiques dégradées ont été identifiées, caractérisées par la présence d'une humidité relative élevée, de vent et/ou de précipitations. Le Tableau 13 présente les caractéristiques de ces périodes de mauvais temps.

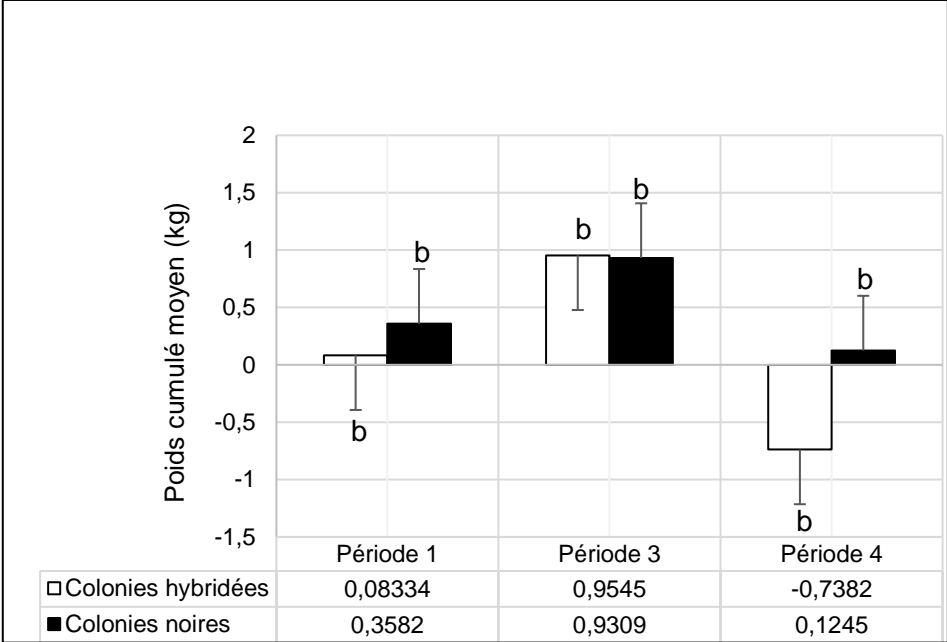
**Tableau 13 : Caractérisation des périodes de conditions climatiques dégradées**

Période	Dates	Humidité relative moyenne, % (nombre de jours)	Vitesse du vent moyenne, km.h <sup>-1</sup> (nombre de jours)	Précipitations cumulées, mm (nombre de jours)
1	20/06/2022-25/06/2022	82,33 (n=5)	42 (n=5)	6 (n=5)
2	20/07/2022-30/07/2022	66,66 (n=10)	39,8 (=10)	2 (n=10)
3	15/08/2022-22/08/2022	69,75 (n=7)	34 (n=7)	4 (n=7)
4	29/08/2022-14/09/2022	72,37 (n=15)	39,87 (n=15)	6 (n=15)

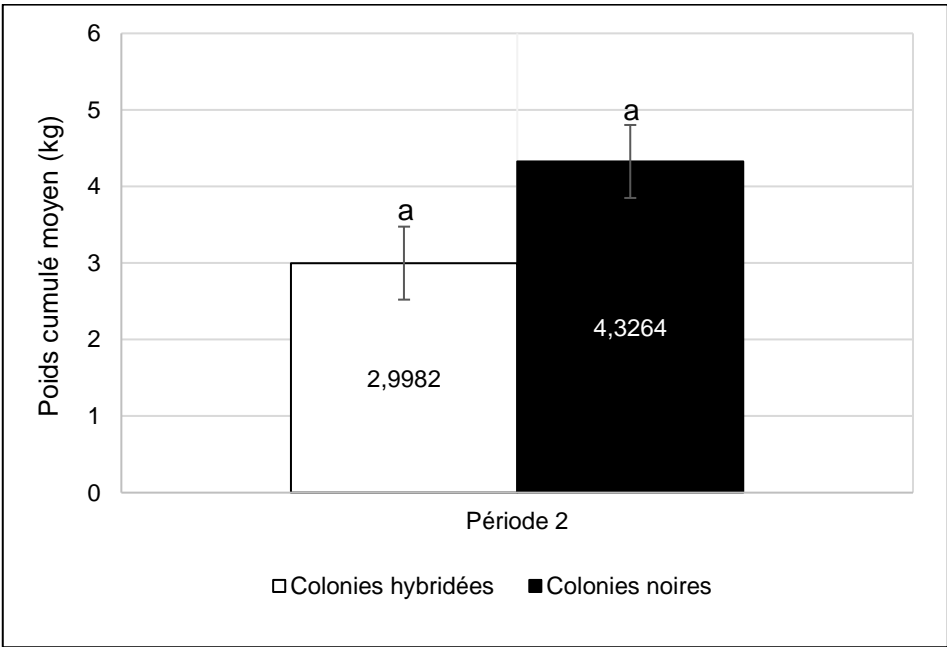


Pour chaque période de mauvais temps, le poids cumulé des colonies des deux groupes ne montrait pas de différence significative (Figures 84 et 85). Le poids cumulé moyen des deux groupes en période 2 a été représenté séparément dans un souci d'échelle.

**Figure 84 : Poids cumulé moyen des deux groupes durant les périodes de mauvais temps des mois de Mai, Juillet et Août**

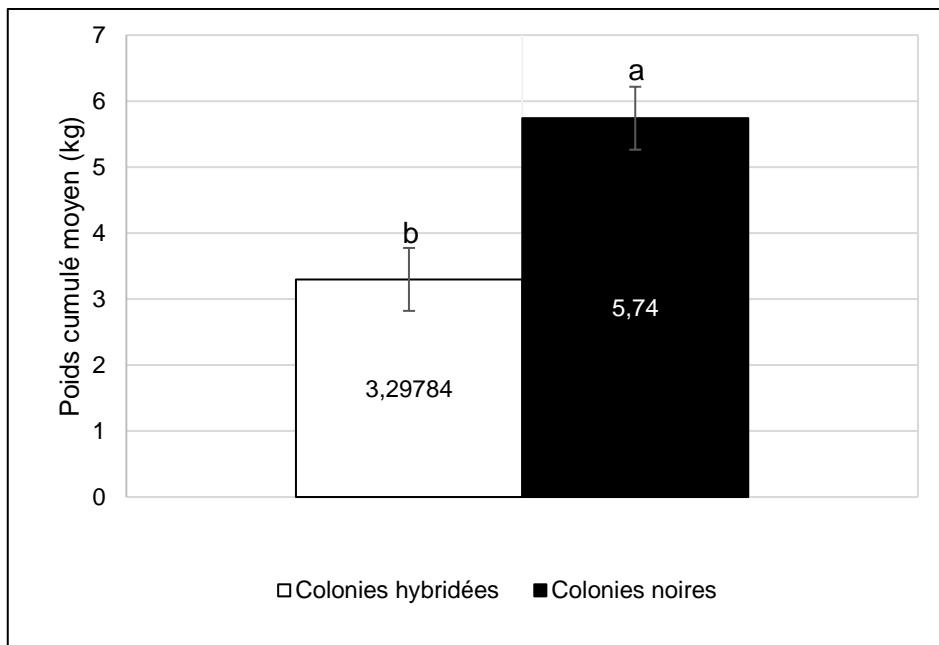


**Figure 85 : Poids cumulé moyen des deux groupes durant la période de mauvais temps du mois de Juillet**



Durant l'ensemble des périodes de mauvais temps, le poids cumulé moyen des colonies noires était plus élevé que celui des colonies hybridées ( $p < 0,1$ , tendance significative) de  $2,44 \pm 0,4768$  kg (Figure 86).

**Figure 86 : Poids cumulé moyen des deux groupes durant l'ensemble des périodes de mauvais de temps**



## V. Discussion

### A. Matériels et méthodes : limites techniques

#### 1. Recrutement des colonies

Les colonies recrutées étaient d'origine variée, aussi bien sur le plan géographique que génétique. Cela signifie que, dans le groupe des colonies noires notamment, des adaptations locales présentées par certaines colonies pouvaient créer une hétérogénéité. Les contraintes de temps imposées à l'étude, et le manque de disponibilité d'essaims d'abeilles noires à la vente, nous ont contraints à recruter des colonies d'origines géographiques françaises différentes.

Par ailleurs, les colonies recrutées n'avaient pas subi les mêmes conditions d'hivernage, car les colonies noires avaient hiverné dans leurs régions d'origine, tandis que les colonies hybridées avaient hiverné dans le rucher expérimental.

Toutes les colonies hybridées et une partie des colonies noires avaient reçu le même traitement varroa l'année précédente (APIVAR ND), mais 3 colonies noires avaient reçu des mesures zootechniques (encagement de reine et suppression de couvain) pour tout traitement, car elles avaient été achetées à un apiculteur BIO.

#### 2. Evaluation de la population d'ouvrières adultes

La méthode d'évaluation, basée sur le nombre d'intercadres occupés par les abeilles, permettait une estimation peu précise des populations. En effet, l'essaim d'abeilles occupe un espace en trois

dimensions à l'intérieur de la ruche, tandis que le dénombrement des intercadres occupés n'évalue qu'un espace à deux dimensions.

Dans certaines situations, la méthode appliquée pouvait donc conduire à une surestimation de la population car elle n'apportait pas la certitude que les abeilles occupaient les rayons jusqu'à leur base. Inversement, si l'essaim occupait la base des rayons au moment de l'évaluation, la population était sous-estimée car les abeilles n'étaient pas visibles au niveau de la tête des cadres.

Bien que plus chronophages, d'autres méthodes auraient pu être appliquées, telles que l'estimation de la population par la surface occupée par les abeilles sur les rayons ou par la pesée des abeilles (Imdorf *et al.*, 2010, Delaplane *et al.*, 2013). Les deux groupes ayant été évalués par la même méthode, leur comparabilité n'est cependant pas remise en cause.

Il est à noter que les populations des deux groupes ont été évaluées aléatoirement au cours de la journée. Certains auteurs recommandent d'effectuer les mesures tôt le matin, avant l'envol des butineuses (Imdorf *et al.*, 2010 ; Keith *et al.*, 2013) afin de ne pas sous-estimer la population. Le moment d'inspection ayant été réparti au hasard entre les colonies des deux groupes, leur comparabilité n'est cependant pas remise en cause.

### **3. Méthode ColEval©**

Le principal biais identifié concernant le protocole appliqué concernait la mesure de la surface de couvain ouvert. En effet, les premiers stades larvaires (œufs et jeunes larves) peuvent se confondre avec certaines couleurs de cire ou demeurer invisibles en fonction de leur localisation sur le cadre. En effet, les cellules de corps ne sont pas horizontales mais orientées, et forment un angle de 7 à 8° vers le haut (Karihaloo *et al.*, 2013). Ces biais ont pu conduire à une sous-estimation du couvain ouvert d'ouvrières et de mâles. Cependant, appliqués aléatoirement et de manière identique aux colonies des deux groupes d'étude, ils ne remettent pas en cause la comparabilité des résultats.

Dans le cadre de l'étude, le protocole prévoyait une évaluation mensuelle de la dynamique des colonies. Ce délai aurait pu être réduit à un intervalle de 3 semaines correspondant à la durée de développement d'une ouvrière, afin de mieux s'harmoniser avec les cycles de couvain (Imdorf *et al.*, 2010).

### **4. Comptage des varroas**

La méthode de comptage des varroas par roulement au sucre glace permet un taux de séparation compris entre 92 et 95% (Colin, 2022, communication écrite), ce qui a pu conduire à une discrète sous-estimation du taux d'infestation dans le cadre de l'étude. Cependant, une étude interne du laboratoire Vêto-pharma (Collin, 2022, communication écrite) a montré un taux de séparation identique pour les méthodes du lavage à l'alcool et de l'injection de CO<sub>2</sub>, confirmé par d'autres auteurs (Bak, 2009 ; Wilde, 2009), qui justifiait le choix de la méthode employée dans le cadre de l'étude. Elle est en effet la seule permettant de conserver l'échantillon d'ouvrières en vie tout en étant simple à mettre en œuvre.

Par ailleurs, la sensibilité de la méthode de comptage est aussi impactée par les variations du taux d'hygrométrie, car l'humidité entraîne l'agglomération du sucre glace et donc une baisse de l'efficacité de la séparation des varroas. Le taux de séparation des varroas a donc pu varier en fonction des conditions climatiques rencontrées sur le rucher expérimental.

## B. Analyse des résultats génétiques

### 1. Diversité mitochondriale (lignée maternelle des colonies de l'étude)

#### a. Taille de la région intergénique COI-COII

La détermination de la taille de la région intergénique ne présentait pas de réel apport dans le cadre de la comparaison des deux groupes. Elle a cependant permis de différencier certains haplotypes. C'est le cas des haplotypes M4 et M4' de la lignée M qui ont le même profil de migration sur gel acrylamide. Seule la taille de la région intergénique permet de les différencier (PQQ pour M4 et PQQQ pour M4').

#### b. Diversité des haplotypes

- Diversité des haplotypes de la lignée C

Les haplotypes de la lignée C sont d'origine importée et non locale. Le rucher expérimental montrait un taux d'introgression mitochondrial par les haplotypes de la lignée C de 27%.

L'haplotype C1 était représenté à hauteur de 23% de l'ensemble des haplotypes (Figure 17). Dans sa lignée d'origine, cet haplotype occupe une aire de répartition assez vaste puis qu'il est observé depuis le Nord de l'Italie jusqu'au Caucase (Garnery, 2017). Il pouvait donc correspondre à des importations d'*Apis m. carnica*, d'*Apis m. cecropia* ou encore d'*Apis m. caucasia* dans le rucher expérimental, à l'origine de l'introgression génétique du groupe des colonies hybridées.

L'haplotype C2 était représenté à hauteur de 4% de l'ensemble des haplotypes. Il est uniquement observé en Italie (Garnery, 2017), ce qui montre une origine italienne d'une partie des importations ayant eu lieu dans le rucher expérimental.

Il est à noter que l'haplotype C3, assez caractéristique de la lignée synthétique Buckfast (Garnery, 2017), n'a pas été retrouvé dans le rucher.

- Diversité des haplotypes de la lignée A

Les haplotypes A sont également d'origine importée. Le rucher expérimental montrait un taux d'introgression mitochondrial par un haplotype de la lignée A de 5%. Il s'agissait de l'haplotype A4 représentant 4% de l'ensemble des haplotypes.

L'haplotype A4 est originellement réparti depuis l'Afrique centrale jusqu'en Afrique du Sud. Sa présence dans le rucher expérimental ne s'explique vraisemblablement pas par l'importation de sous-espèces africaines, mais plutôt par le fait que certains éleveurs de la race Buckfast ont récemment modifié la base maternelle de la lignée (haplotype C3) et sont repartis d'une base africaine pour constituer ce qui pourrait correspondre à une « nouvelle Buckfast ». Rarement observé jusqu'en 2007, l'haplotype A4 est aujourd'hui présent en France suite à des importations avec des fréquences relativement importantes en fonction des régions (Garnery, 2017).

- Diversité des haplotypes de la lignée M

Au sein de la lignée M, l'haplotype le plus fréquent était M4 (80% des haplotypes M, Figure 18). Cette observation est en accord avec les données acquises (Garnery, 2017), puisque qu'il est établi que l'haplotype M4 est le plus commun observé en France, suivi des haplotypes M4' (qui représentait 13% des haplotypes du rucher expérimental) et M6 (non observé dans le cadre de

l'étude). L'haplotype M28 était également présent à une fréquence de 7% parmi les colonies échantillonnées.

Les haplotypes M4, M4' et M28 peuvent correspondre à des haplotypes locaux :

- Les haplotypes M4 et M4' sont les plus répandus en France, en particulier sur la façade Ouest du pays. Leur présence dans le rucher expérimental est donc cohérente avec les origines des colonies noires recrutées (Bretagne et Normandie)
- L'haplotype M28 est originellement réparti à l'Ouest de la région Ile-de-France, ce qui correspond à la localisation du rucher expérimental.

Dans le rucher expérimental, on observait que certaines colonies hybridées étaient d'origine maternelle locale (lignée M). Cela montre une hybridation progressive de certaines colonies à partir de souches locales. La colonie 11 par exemple était d'haplotype M4 mais présentait un taux d'hybridation de 44% (Tableau 6). La colonie 10, pourtant d'haplotype local M28, présentait un taux d'hybridation de 46%. Ainsi, le fait que l'origine maternelle de la colonie provienne de la lignée M n'est pas suffisant pour la rattacher au groupe des colonies noires, car les mâles peuvent introduire des allèles d'autres lignées et ainsi augmenter le taux d'introgression.

## **2. Diversité nucléaire (lignée paternelle des colonies de l'étude)**

### *a. Place des colonies échantillonnées dans l'arbre de proximité génétique*

L'étude de l'arbre de proximité génétique montre que le rucher expérimental était constitué de deux groupes bien distincts :

- Un groupe de colonies hybridées se répartissant à la base des lignées C et O
- Un groupe de colonies noires peu séparé des populations de référence de la lignée M avec lesquelles elles formaient un groupe cohérent, bien distinct des autres lignées.

Pour les colonies du rucher expérimental, les lignées A et M étaient séparées des lignées C et O par une valeur de Bootstrap de 75%. La lignée M était bien différenciée car elle était séparée des 3 autres lignées évolutives par une valeur de Bootstrap de 82% (Figure 19).

### *b. Taux d'introgression*

Pour être incluse dans le groupe des colonies noires, une colonie devait présenter un taux d'introgression inférieur à 20%. Ce critère a été choisi car c'est la valeur limite généralement observée lorsque les ouvrières d'une colonie sont toutes regroupées à l'intérieur des contours des populations de référence de la lignée M en ACP (Garnery, 2022, communication orale).

La colonie 18, qui présentait un taux d'introgression de 23% (Tableau 6), a pourtant été rattachée au groupe des colonies noires pour 3 raisons :

- Son taux d'introgression était éloigné du taux d'introgression le plus faible observé chez les colonies hybridées (35% pour la colonie 7), ce qui confirmait l'existence de deux groupes bien distincts (Tableau 6)
- L'arbre de proximité génétique la classait parmi le groupe des colonies noires et la rapprochait de la colonie 21 qui présentait un taux d'hybridation de 15% (Figure 19)
- L'ACP de la colonie 18 montre que la majorité des ouvrières était incluse dans les contours des populations de référence de la lignée M (Figure 23).

La reine, représentée en jaune, présentait un taux d'introgression de 21%. La reine ainsi que 66,7% des ouvrières (16/24) étaient incluses dans les populations de référence de la lignée M, justifiant le rattachement de la colonie 18 au groupe des colonies noires.

Au sein du rucher expérimental, de forts taux d'introgression ont été observés (60% pour la colonie 1 ou encore 71% pour la colonie 8). Ces taux d'introgression sont bien supérieurs à la moyenne française comprise entre 30 et 35% d'hybridation (Garnery, 2022, communication orale). Ils sont symptomatiques de souches importées récemment, qui ont été fécondées par des mâles eux-mêmes hybridés.

Chez les colonies noires, un taux d'introgression inférieur à 5% a été observé pour la colonie 21 (4% d'introgression) et la colonie 22 (2% d'introgression). Cette situation peut traduire un risque de consanguinité à l'échelle de la colonie (Garnery, 2022, communication orale) qui pourrait diminuer la durée de vie des abeilles issues des colonies concernées. En effet, la dégénérescence consanguine entraînerait des déficiences physiologiques qui raccourciraient la durée de vie (Kepeña, 1977 ; Brückner, 1979). Cependant, la part de la variabilité de durée de vie chez les colonies d'abeilles liée au patrimoine génétique est nettement plus faible que celle provenant de l'environnement. En 1983, Rinderer *et al.* observent une héritabilité de 32% de la caractéristique « durée de vie », qui demeure la plus élevée obtenue jusqu'alors (Kulincevic et Rothenbuhler, 1982 ; Milne, 1980). Ces résultats permettent de minimiser l'impact de la consanguinité observée pour les colonies 21 et 22.

### *c. Analyses en coordonnées principales*

Les analyses en coordonnées principales confirmaient les résultats des taux d'introgression et la constitution de deux groupes distincts. En effet, la majorité des ouvrières des colonies noires ainsi que leur reine étaient contenues dans les contours des populations de référence de la lignée M (Annexe 9). Les ouvrières des colonies hybridées se répartissaient dans les contours des populations de référence de la lignée M, mais aussi dans ceux des autres lignées, de manière hétérogène.

Enfin, une analyse en coordonnées principales réalisée en considérant chaque colonie comme un individu a apporté une dernière preuve que deux groupes bien distincts génétiquement apparaissaient dans les colonies recrutées (Figure 24).

### **C. Analyse des résultats morphométriques et bilan sur l'échantillon d'étude**

Sur la base des critères morphométriques, le taux d'introgression moyen des colonies noires était de 12% (n=11) et celui des colonies hybridées de 51%. Les résultats étaient concordants avec ceux des analyses génétiques (Figures 82 et 83).

Les analyses génétiques et morphométriques ont donc permis, par leurs résultats concordants, d'attribuer clairement les colonies échantillonnées aux deux groupes d'étude (Figures 82 et 83). Les taux d'introgression calculés par les deux méthodes sont très similaires, ce qui s'accorde avec les conclusions d'autres auteurs qui ont montré une corrélation très significative entre les résultats obtenus à l'aide des microsatellites et ceux obtenus grâce à la morphométrie (Oleksa et Tofilski, 2015).

Ces résultats montrent que la morphométrie peut être utilisée afin d'identifier les sous-espèces de manière fiable. Cette méthode, plus accessible et moins onéreuse, pourrait donc être utilisée par les apiculteurs afin de détecter les colonies hybridées et d'améliorer leur sélection de l'abeille noire.

### **D. Commentaire des résultats des analyses de pathogènes**

Les tests de détection des agents de loques étaient négatifs pour l'ensemble des colonies des deux groupes aux deux dates de prélèvement. En revanche, la présence d'agents viraux et de nosémose n'a pu être écartée en raison d'un problème de caractérisation du témoin positif.

Le diagnostic de bonne santé des colonies incluses dans l'étude reposait donc essentiellement sur la constatation de l'absence de signes cliniques, qui était cependant conjuguée à l'évaluation d'autres variables telles que définies par l'outil d'évaluation de santé des abeilles HEALTHY-B. En effet, plusieurs indicateurs doivent être considérés conjointement pour statuer sur l'état de santé d'une colonie d'abeilles (EFSA Panel On Animal Health And Welfare, 2016). Ces variables, évaluées mensuellement en parallèle de la présence de signes cliniques, étaient :

- La présence de la reine, vérifiée visuellement ou attestée par la présence d'une ponte fraîche (œufs de moins de 3 jours)
- La démographie de la colonie : présence de couvain ouvert et fermé, présence d'ouvrières et de mâles en période de reproduction
- La physiologie de la colonie : présence de réserves glucidiques (miel operculé et nectar) et protéiques (pollen)

L'évaluation mensuelle de ces 3 variables et l'absence de signes cliniques permettait de conclure que l'ensemble des colonies des deux groupes était en bonne santé pendant la période d'étude.

### **E. Commentaire des résultats des analyses chimiques et organoleptiques du miel**

Dans le cadre de l'étude, une analyse pollinique microscopique qualitative a été utilisée pour attester de l'origine florale des miels. En effet, les grains de pollens retrouvés dans les miels sont indicatifs de leur origine florale (Barth, 1989 ; Vit *et al.*, 2018). Les pollens présents dans les miels des deux groupes étaient compatibles avec les dates de récolte (printemps et été) et l'origine géographique (Annexe 1).

De plus, les gammes de valeur de pH et les taux d'humidité attestaient d'une possibilité de conservation des miels satisfaisante pour les deux groupes d'étude (Uran *et al.*, 2017). Les taux d'hydroxyméthylfurfural et d'activité amylase montraient que les miels n'avaient pas subi de détérioration d'origine thermique et présentaient un état de fraîcheur correct (Bogdanov, 2007).

Pour les deux groupes, les valeurs de conductivité mesurée montraient que les échantillons étaient des miels issus de nectars. La plus forte conductivité des miels d'été s'explique par la proportion importante de châtaignier (Thibault Menjou, 2022, communication écrite).

Concernant l'analyse des sucres, les faibles taux de saccharose mesurés montraient l'absence d'adultération glucidique des échantillons de miel (Machado De-Melo *et al.*, 2018). L'analyse du taux de glucose est intéressante car elle peut être utilisée pour confirmer l'origine florale des miels (Ruoff *et al.*, 2006). Ainsi, les taux élevés de glucose mesurés au printemps attestaient de la présence de colza dans les miels des deux groupes (Isopescu *et al.*, 2014).

L'ensemble des colonies noires, étudiées sans distinction d'origine géographique, comptait un nombre plus élevé d'origines florales différentes par échantillon de miel. Les colonies noires pourraient donc exploiter des ressources florales plus diversifiées que les colonies hybridées. Cependant, il faut noter que le nombre moyen d'origines florales différentes par colonie était similaire entre les deux groupes (Tableau 13). Le nombre élevé d'origines florales différentes observé dans le groupe des colonies noires pourrait donc s'expliquer par les origines géographiques diversifiées des colonies de ce groupe. Ces colonies auraient additionné une diversité de comportements de butinage résultant de leurs adaptations locales, ce qui aurait conduit à la plus grande diversité pollinique observée dans le groupe des colonies noires.

La diversité florale était plus importante dans les miels d'été pour les deux groupes. Cela peut s'expliquer par le comportement de butinage des ouvrières au printemps, qui privilégient les sources de nectar les plus abondantes pour une période donnée. Ainsi, en Avril et en Mai, l'exploitation de la miellée de colza est prioritaire ce qui conduit à une sous-exploitation des autres ressources florales. Le pollen de colza était en effet majoritaire à plus de 45% dans les échantillons récoltés au printemps.

L'étude de la couleur des miels est intéressante, car elle est corrélée positivement à leur teneur en minéraux (González-Miret *et al.*, 2005) et peut permettre de confirmer leur origine florale (Kaczmarek, 2019). La couleur des miels était plus foncée en été pour les deux groupes, ce qui est une nouvelle preuve de l'origine florale plus diversifiée du miel d'été et d'une proportion importante de nectar de châtaignier (Thibault Menjou, 2022, communication écrite). Au printemps, les miels étaient clairs car composés majoritairement de colza et peu riches en minéraux.

Il est intéressant de remarquer que les colonies originaires du Morbihan ont produit au printemps un miel plus foncé. La forte conductivité et le faible taux de glucose mesurés dans ce miel attestaient d'une origine florale plus diversifiée et d'une concentration élevée en minéraux. Il est donc possible que la composition des miels ne dépende pas seulement de l'environnement de butinage des ouvrières, mais aussi de leur génétique. Certaines souches d'abeilles noires pourraient donc produire, dans un environnement donné, un miel aux propriétés singulières.

Concluons en rappelant que l'analyse des résultats de composition des miels est ici purement descriptive. Dans le cadre de futures études, une analyse statistique appliquée aux données d'un plus grand nombre d'échantillons par groupe d'étude serait appropriée.



## F. Analyse des résultats de la méthode ColEval®

### 1. Conditions environnementales et dynamisme des colonies

Au début de l'étude, les colonies noires accusaient un retard de développement. En effet, celles-ci ont été introduites au rucher expérimental sur 6 cadres construits seulement, tandis que les colonies hybridées ont hiverné sur 10 cadres construits. Dans chaque colonie noire, 4 cadres de cire gaufrée ont été immédiatement introduits. Le début de saison était donc un temps d'expansion pour les colonies noires qui ont dû bâtir ces cadres introduits. L'interprétation des données doit donc tenir compte du retard de leur retard de développement en début de saison, dû à leur livraison en ruchettes sur 6 cadres construits.

Durant la période d'étude, les colonies ont été soumises à des conditions environnementales avec un déficit hydrique marqué (Figure 28) qui se sont pourtant montrées favorables à des périodes de miellée (Annexe 1).

### 2. Populations d'ouvrières adultes

Au sein des deux groupes, la population était croissante au cours de la période d'étude, bien que les différences entre les dates n'étaient pas significatives d'un point de vue statistique (Figure 29). La tendance des courbes montre que la population était en augmentation continue jusqu'au mois d'Août chez les colonies hybridées. Une telle dynamique n'avait pas été observée par d'autres auteurs qui décrivent une population maximale atteinte entre mi-Juin et début Juillet dans des conditions environnementales et climatiques similaires, avec une chute rapide de 30 à 70% de la population dans les 3 semaines suivantes (Wille, 1981 ; Wille, 1985). La dynamique observée dans le cadre de l'étude pouvait s'expliquer par une miellée d'été puissante et prolongée ayant soutenu un élevage tardif de couvain.

Chez les colonies noires, un creux de population a été observé au mois de Juin. Une interprétation possible s'appuie sur l'hypothèse d'une réduction de la durée de vie des ouvrières chez ce groupe, en raison des soins intensifs apportés au couvain au mois de Mai. L'élevage est en effet identifié comme principal facteur de diminution de durée de vie (Wille *et al.*, 1985). La durée de vie moyenne d'une abeille d'été, entre 13 et 38 jours (Imdorf *et al.*, 2010), et la baisse de durée de vie jusqu'aux deux tiers évoquée par certains auteurs (Westerhoff, 1994), explique que la baisse de population des colonies noires soit mesurable dès le mois de Juin. Ainsi, les ouvrières des colonies noires, qui ont élevé en Mai une quantité de couvain ouvert importante afin de rattraper leur retard de développement, ont pu présenter une baisse de durée de vie qui a impacté la population d'abeilles adultes en Juin.

Enfin, les mesures ont montré que les populations d'ouvrières adultes des deux groupes étaient équivalentes sur la période d'étude (Figure 30). Ces observations sont cohérentes avec les conclusions d'autres auteurs qui n'avaient pas observé de différences significatives en comparant le nombre d'abeilles entre différentes sous-espèces (Gerig et Wille, 1975, Imdorf *et al.*, 2010).

### 3. Réserves

#### a. Miel operculé

Chez les deux groupes, les réserves de miel operculé dans le corps de ruche étaient stables entre Mai et Juillet (Figure 32), période pendant laquelle deux récoltes de miel sont pourtant réalisées. Entre Mai et Juillet, les colonies stockaient donc dans les hausses tandis que la quantité de miel

operculé dans le corps était maintenue constante. Une hypothèse explicative possible est que le miel formé dans le corps est alors immédiatement consommé afin de subvenir aux besoins d'élevage. En effet, cette période coïncide avec le pic d'élevage de couvain d'ouvrières et de mâles (Figures 42 et 48). Il est donc possible qu'entre Mai et Juillet, les besoins glucidiques liés à l'élevage et leur propension à stocker les hausses sont tels que les réserves de miel operculé dans le corps sont constantes malgré des périodes de forte miellée.

Par la suite, les réserves de miel operculé étaient significativement plus élevées en Août comparativement aux mois de Mai ( $p < 0,0001$ ), Juin et Juillet ( $p < 0,01$ ) pour les deux groupes (Figure 32). Cette observation pourrait s'expliquer par deux facteurs :

- La miellée de fin de saison était très forte en 2022, permettant aux colonies de stocker à la fois dans les hausses et dans les corps
- Parallèlement, les besoins glucidiques liés à l'élevage diminuaient. En effet, cette période correspondait également à un ralentissement de la dynamique d'élevage puisque chez les colonies hybridées, la surface de couvain ouvert d'ouvrières était significativement plus faible au mois d'Août qu'au mois de Juillet ( $p < 0,01$ , Figure 42), et qu'une observation similaire a été faite chez les colonies noires ( $p < 0,05$ ).

Dans le contexte environnemental du rucher expérimental, c'est donc à partir du mois d'Août seulement que les dynamiques d'élevage et de miellée ont permis la constitution des réserves hivernales chez les deux groupes.

Par ailleurs, il est remarquable de noter que malgré leur retard initial de développement, les colonies noires avaient déjà des réserves de miel operculé équivalentes à celles des colonies hybridées dès le mois de Mai (Figure 32).

#### *b. Nectar*

A l'échelle du rucher, l'étude de la dynamique de récolte de nectar, basée sur la quantité de nectar présente dans le corps (Figure 35), met en évidence une période de trou de miellée au mois de Juin. En effet, la quantité de nectar stockée était plus faible en Juin qu'aux mois de Mai, Juillet et Août ( $p < 0,0001$ ). La moyenne des conditions d'humidité relative et de vitesse du vent n'étant pas plus élevées en Juin que durant le reste de la période d'étude, il est donc peu probable que la baisse de récolte de nectar soit due au mauvais temps. Cependant, les conditions météorologiques étaient les plus variables au mois de Juin, ce qui a pu perturber les butineuses (Figures 26, 27 et 28). L'hypothèse la plus probable pour expliquer la baisse de récolte de nectar en Juin reste cependant une faible disponibilité en ressources environnementales à cette époque.

Chez les colonies noires, la baisse de récolte de nectar entre Mai et Juin était moins marquée que chez les colonies hybridées à population équivalente (Figure 35). Cela pourrait montrer une meilleure exploitation de la miellée de printemps par les colonies noires. Ces résultats confirment les observations de Ruttner *et al.* (1976) qui avaient démontré la supériorité de l'abeille noire pour l'exploitation de faibles miellées entrecoupées de conditions environnementales perturbées, comme ce fut le cas au mois de Juin.

Une autre particularité des colonies noires était l'absence de différence significative entre la quantité de nectar stockée en Juin et celle stockée en Août (Figure 35). La récolte de nectar était donc très faible en Août pour les colonies noires car équivalente à celle du trou de miellée du mois de Juin. Cette observation ne peut s'expliquer par une carence environnementale en nectar puisqu'à l'échelle du rucher, la récolte de nectar est plus élevée en Août qu'au mois de Juin ( $p < 0,0001$ ). En revanche,

les colonies noires pourraient operculer le nectar récolté en Août plus rapidement que les colonies hybridées. Afin d'évaluer une potentielle différence de vitesse d'operculation entre les deux groupes, une analyse statistique complémentaire a été effectuée visant à comparer la proportion de nectar parmi les réserves glucidiques totales (miel operculé + nectar, Figure 38).

La proportion de nectar était plus faible chez les colonies noires (effet race,  $p < 0,001$ ) de  $20,27 \pm 4,60\%$ . Les colonies noires pourraient donc operculer plus rapidement le nectar stocké en fin de saison, probablement dans le but de constituer rapidement des réserves hivernales importantes. De plus, cette vitesse d'operculation plus élevée ne s'accompagnait pas d'une détérioration de la qualité du miel stocké, puisque les taux d'humidité, d'hydroxyméthylfurfural et le pH des miels d'été étaient équivalents entre les deux groupes (Tableau 8).

Enfin, chez ce groupe, la surface de couvain ouvert d'ouvrières était significativement plus faible en Août qu'au mois de Juillet ( $p < 0,05$ , Figure 42). Cela montre que les colonies noires ont adapté la quantité de couvain élevé à leur stratégie de constitution des réserves hivernales, diminuant l'élevage d'ouvrières et par là même la consommation de ressources glucidiques.

### c. Pollen

Chez les deux groupes, la dynamique de récolte de pollen suivait sensiblement celle de nectar (Figures 35 et 39). Cependant, à la différence de la récolte de nectar, aucune différence significative n'a été observée entre les dates. Cela montre que la récolte de pollen varie dans le même sens que la récolte de nectar, mais de manière plus atténuée au cours du temps. La chute des réserves de pollen en Juin n'était pas due à de mauvaises conditions météorologiques empêchant la récolte, mais pouvait s'expliquer par une carence en fleurs pollinifères dans l'environnement à cette époque. Par la suite, la floraison des châtaigniers a permis la reconstitution des réserves de pollen à un niveau équivalent à celui du début de saison (Figure 39).

L'étude de la quantité de pollen stocké en Août est intéressante car le nourrissage protéique des jeunes larves élevées à cette période, qui forment en Septembre les futures abeilles d'hiver, est directement corrélé à leur durée de vie (Maurizio, 1961). En Août, les colonies des deux groupes stockaient des quantités de pollen semblables, ce qui laisse supposer une durée de vie équivalente pour leurs abeilles d'hiver. Cette dernière étant également influencée par la consommation protéique lors de l'émergence des jeunes abeilles (Soudek, 1927 ; Kratky *et al.*, 1931 ; Maurizio, 1950), une mesure de la quantité de pollen au mois de Septembre aurait pu être envisagée afin de renforcer notre hypothèse.

Sur l'ensemble de la période d'étude, les colonies hybridées ont récolté plus de pollen que les colonies noires ( $p < 0,001$ , Figure 40). Or, cela ne s'explique pas par des besoins d'élevage plus importants puisque la quantité de couvain total ne montre pas de différence significative entre les deux groupes (Figure 55). De plus, les populations étaient équivalentes sur l'ensemble de la période d'étude, ce qui laisse supposer un nombre équivalent de butineuses entre les deux groupes. Ces butineuses étaient par ailleurs soumises aux mêmes conditions météorologiques. Par conséquent, la différence observée devrait être liée à la race, les colonies hybridées présentant un meilleur rendement en récolte de pollen. Certains auteurs ont confirmé que le comportement de récolte de pollen était spécifique (Büchler, 1998), ce qui justifie les différences observées dans le cadre de l'étude.

Même si certains auteurs ont démontré que le comportement de récolte du pollen était généraliste et ne montrait pas de différences entre sous-espèces d'abeilles (Köppler *et al.*, 2007), il pourrait être

intéressant, pour des études ultérieures, d'effectuer une analyse qualitative des pollens retrouvés dans les pains d'abeille des deux groupes.

#### 4. Couvain

##### a. Couvain d'ouvrières

- Couvain ouvert

Chez les deux groupes, la quantité de couvain ouvert d'ouvrières ne variait pas significativement entre Mai et Juillet, aucune différence significative n'ayant été observée entre les dates (Figure 42).

Durant la période de carence pollinique et nectarifère du mois de Juin, des dynamiques d'élevage bien distinctes ont été observées entre les deux groupes, même si les différences n'étaient pas significatives d'un point de vue statistique. En effet, les colonies noires ont diminué l'élevage pendant la période de carence, tandis que la quantité de couvain ouvert d'ouvrières augmentait chez les colonies hybridées. Cela montre une régulation chez les colonies noires en fonction des ressources polliniques et nectarifères de l'environnement. Ce comportement, qui n'a pas été observé chez les colonies hybridées dans le cadre de l'étude, avait déjà été observé (Ruttner, 1988 ; Schmickl et Crailsheim, 2001). Il n'est pas basé sur une chute de ponte des reines noires, mais sur la destruction des œufs et jeunes larves par les ouvrières qui adaptent ainsi la quantité de couvain élevé aux ressources disponibles (Schmickl et Crailsheim, 2001). Chez les colonies noires, la baisse de la quantité de couvain ouvert en Juin se répercute sur la quantité de couvain fermé d'ouvrières présent en Juillet qui est plus faible que celle mesurée en Mai, avant la période de carence (Figure 45).

L'étude de la quantité de couvain ouvert d'ouvrières en Août est intéressante, car elle est directement proportionnelle au nombre d'abeilles d'hiver dont la majorité naît en Septembre (Merz *et al.*, 1979). Celle-ci ne montrait pas de différence significative entre les deux groupes à cette période, ce qui laisse supposer un nombre équivalent d'abeilles d'hiver nées en Septembre et donc une force équivalente des colonies mises à l'hivernage. Afin de confirmer cette hypothèse, une mesure de la population d'abeilles et de la quantité de couvain fermé d'ouvrières au mois de Septembre aurait pu être envisagée.

Sur l'ensemble de la période d'étude, les colonies noires présentaient une quantité plus élevée de couvain ouvert d'ouvrières ( $p < 0,1$ , tendance significative). Cette observation s'explique en grande partie par le rattrapage du retard de développement au mois de Mai : les colonies noires étaient alors en phase d'expansion et devaient produire une grande quantité de couvain ouvert. Cette phase d'expansion a été permise par la miellée de colza qui a apporté les ressources nectarifères et polliniques nécessaires au développement des colonies.

L'étude de la quantité de couvain ouvert à l'échelle du rucher montre un pic au mois de Juin permis par la stimulation de la miellée de châtaignier. L'activité de ponte des reines diminuait à partir du mois de Juillet, cette dynamique étant cohérente avec d'autres observations obtenues dans des environnements similaires (Wille *et al.*, 1985 ; Imdorf *et al.*, 2010).

- Couvain fermé

Chez les colonies noires, la surface de couvain fermé d'ouvrières était significativement plus faible en Août qu'aux mois de Mai ( $p < 0,05$ , Figure 45) et de Juin ( $p < 0,05$ ). Chez les colonies hybridées, aucune différence significative n'a été observée.

La tendance des courbes montre que la surface de couvain fermé d'ouvrières augmentait chez les colonies hybridées entre Juin et Juillet, ce qui pourrait témoigner d'une meilleure réponse à la miellée de châtaignier en termes de dynamique de couvain. Cette observation a été confirmée par l'étude de la surface du couvain total qui était également plus élevée chez les hybridées sur la période, bien que la différence ne soit pas significative d'un point de vue statistique (Figure 55). L'étude du poids cumulé montrait également cette meilleure exploitation de la miellée de châtaignier par les colonies hybridées qui rattrapaient leur retard sur les colonies noires pendant les semaines 9, 10 et 11 de l'étude (Figure 81). En revanche, la récolte était semblable entre les deux groupes. Nous pouvons donc conclure que, chez les colonies hybridées, la meilleure exploitation de la miellée de châtaignier impacte le développement de la colonie (développement du couvain et poids cumulé du corps) mais n'impacte pas la quantité de miel récolté.

#### *b. Couvain de mâles*

- Couvain ouvert

La surface de couvain ouvert de mâles ne variait pas significativement entre les dates de mesures pour les deux groupes. Cependant, la tendance des courbes montre une baisse marquée de la production de couvain ouvert de mâles chez les colonies noires pendant le trou de miellée du mois de Juin. Cette baisse était plus atténuée pour le groupe des colonies hybridées. Il est plausible que la baisse de production observée chez les colonies noires soit bien de nature adaptative, puisque la quantité de couvain ouvert de mâles augmentait ensuite en Juillet (Figure 48). Chez les colonies hybridées, la baisse était linéaire sur la période, ce qui montre que la dynamique n'a pas été modifiée par le manque de ressources au mois de Juin. Dans ce dernier groupe, il est donc difficile de conclure en faveur d'un comportement adaptatif de limitation de l'élevage.

Afin de vérifier s'il pouvait s'agir d'une adaptation chez les colonies noires, une analyse statistique complémentaire a été effectuée afin de comparer la proportion de couvain ouvert de mâles chez les colonies noires entre Mai et Juin.

Pendant la période de carence du mois de Juin, la proportion de couvain ouvert de mâles était plus faible qu'en Mai chez les colonies noires (effet date,  $p < 0,001$ ) de  $14,92 \pm 1,498\%$ . Elles pourraient donc s'adapter aux périodes de carence en limitant l'élevage des mâles. Le mécanisme de cette adaptation pourrait résider dans un comportement de cannibalisme du jeune couvain mâle par les ouvrières en condition de carence pollinique (Weiss, 1984 ; Weiss, 1985).

Cette dernière observation permet de conclure sur les capacités adaptatives des deux groupes concernant l'élevage en fonction des ressources environnementales disponibles :

- Chez les deux groupes, la période de carence du mois de Juin a entraîné une baisse de la quantité de couvain ouvert de mâles qui était cependant plus marquée chez les colonies noires
- Seul le groupe des colonies noires a montré une adaptation de la quantité de couvain ouvert d'ouvrières pendant cette période, confirmée par une baisse de la quantité de couvain fermé d'ouvrières au mois de Juillet.

- Couvain fermé

Chez les colonies noires, aucune différence significative entre les différentes dates de mesure n'a été observée concernant le couvain fermé de mâles, ce qui montre une production à niveau constant tout au long de la saison apicole. Chez les colonies hybridées, la surface de couvain fermé de mâles

était plus élevée en Mai qu'en Juillet ( $p < 0,1$ , tendance significative) et qu'en Août ( $p < 0,01$ ). En tenant compte du délai de maturation sexuelle des mâles naissants (environ 12 jours), cela montre que chez ce dernier groupe, le pic de production de mâles fécondants a lieu en Mai. Chez les colonies noires, la tendance des courbes montre que le pic de production est décalé temporellement et se situe en Juin. La production de mâles fécondants pourrait donc être plus tardive chez les colonies noires et à niveau constant au cours de la saison apicole.

Chez les deux groupes, une production de mâles assez tardive a été observée en comparaison des résultats obtenus par d'autres auteurs qui ont montré qu'elle cessait dès la fin du mois de Juillet (Imdorf *et al.*, 2010).

### c. *Couvain total*

Chez les colonies hybridées, il a été observé que la surface de couvain total diminuait plus rapidement entre Juillet et Août que chez les colonies noires (Figure 54). De plus, le pic de couvain total se situait en Juin pour les colonies noires, tandis qu'il était décalé au mois de Juillet chez les colonies hybridées en raison de la quantité importante de couvain fermé d'ouvrières (Figure 54). En tenant compte du délai de 22 jours pour former une butineuse à partir d'une ouvrière naissante, une conséquence possible est que les colonies hybridées disposaient de plus de butineuses en Août. Cette observation pourrait expliquer que les colonies hybridées tirent un meilleur parti de la miellée d'été car leur pic de couvain total est plus tardif.

L'étude de la quantité de couvain total sur l'ensemble de la période d'étude a montré l'absence de différence significative entre les colonies noires et les colonies hybridées, ce qui s'oppose aux résultats de certains auteurs qui ont conclu que la quantité de couvain chez les colonies noires était inférieure à celle des autres races (Ruttner *et al.*, 1988). D'autres auteurs concluent à l'absence de différence significative d'un point de vue statistique dans le développement du couvain de lignées différentes, mais leur protocole n'incluait pas l'étude de colonies d'abeilles noires (Gerig et Wille, 1975).

Par ailleurs, la quantité de couvain total étant semblable entre les deux groupes sur l'ensemble de la période, il est probable que les durées de vie des ouvrières soient similaires, puisque l'intensité des soins au couvain a été identifiée comme principal facteur de raccourcissement de la durée de vie (Wille *et al.*, 1985), dans des proportions pouvant atteindre jusqu'à deux tiers de diminution (Westerhoff et Büchler, 1994).

La baisse du couvain total observée au mois de Juillet correspondait aux dynamiques d'élevage habituellement décrites avec un pic de production entre fin Juillet et début Août dans des conditions environnementales et climatiques similaires (Ruttner *et al.*, 1988 ; Wille, 1985b ; Wille, 1985c).

## 5. Cellules vides

Sur l'ensemble de la période, la surface vide était plus élevée chez les colonies noires (effet race,  $p < 0,05$ , Figure 58). Cette observation s'explique en grande partie par la situation en début d'étude : les 4 cadres de cire gaufrée ajoutés en Avril ont été rapidement bâtis mais n'étaient encore que partiellement occupés au mois de Mai, expliquant le nombre élevé de cellules vides chez les colonies noires.

Cette situation a offert aux reines noires une grande surface libre pour leur ponte au début de saison, tandis que les reines hybridées étaient déjà confrontées à une compétition entre le stockage des réserves et la ponte, cette dernière pouvant en être limitée. Cette hypothèse pourrait expliquer que

les colonies noires aient présenté une plus grande quantité de couvain ouvert (Figure 43). Il aurait été intéressant de répéter les mesures l'année suivante afin de déterminer si la plus grande quantité de couvain ouvert chez les colonies noires était uniquement dû à leur rattrapage de développement initial.

Dès le mois de Juin, la surface vide était semblable entre les deux groupes, ce qui montre que les colonies noires ont rapidement comblé leur retard de développement.

Chez les colonies hybridées, la surface de cellules vides était plus élevée en Juin qu'aux mois de Mai ( $p < 0,05$ , Figure 57), de Juillet ( $p < 0,01$ ) et d'Août ( $p < 0,01$ ). La baisse de surface des réserves (nectar et pollen) et de couvain ouvert explique la hausse du nombre de cellules vides au mois de Juin. Cela confirme les conséquences du trou de miellée sur la dynamique des colonies. Chez les colonies noires, la surface vide en Juin était plus élevée qu'aux mois de Juillet et d'Août ( $p < 0,05$ ), confirmant le comblement du retard de développement sur le reste de la saison.

## 6. Structuration spatiale des ruches

### a. Répartition du miel operculé

Chez les deux groupes, le miel operculé était majoritairement stocké sur les cadres de rive (effet partie,  $p < 0,0001$ , Figure 60). En effet, la partie centrale est celle où la température est la plus élevée et contient donc le couvain qui nécessite beaucoup de chaleur pour son développement. Les réserves de miel sont donc stockées sur les cadres de rive car leur mise en réserve ne nécessite pas des températures élevées.

### b. Répartition du nectar

La répartition du nectar était équivalente entre les parties et entre les deux groupes (Figure 61). Cette observation montre que les colonies stockent indifféremment du nectar dans la partie centrale et dans les parties latérales de la ruche. Ce nectar est vraisemblablement utilisé pour la préparation de la bouillie larvaire destinée à la nutrition des larves, d'où son stockage proche du nid à couvain. Contrairement aux conclusions d'autres auteurs (Ruttner *et al.*, 1988), ces observations montrent que le stockage du nectar chez les colonies noires n'est pas toujours compacté autour des rayons centraux.

### c. Répartition du pollen

La répartition du pollen était équivalente entre les parties et entre les deux groupes. Cela montre que les colonies des deux groupes stockent du pollen à proximité du nid à couvain afin de subvenir aux besoins protéiques des larves. Ce résultat remet en cause les conclusions d'autres auteurs qui attribuaient aux colonies noires la particularité de stocker de grandes quantités de pollen près du nid à couvain (Ruttner *et al.*, 1988). Les résultats obtenus permettent de conclure que ce comportement est également observable chez les colonies hybridées, puisque les deux groupes stockaient une quantité équivalente de pollen dans les rayons centraux (Figure 62).

### d. Répartition du couvain ouvert d'ouvrières

Le couvain ouvert d'ouvrières n'était pas réparti de manière uniforme chez les deux groupes (effet partie,  $p < 0,0001$ ). Chez les deux groupes, la partie 2 contenait plus de couvain ouvert d'ouvrières que les parties 1 et 3 ( $p < 0,0001$ , Figure 63), ce qui signifie que les colonies élevaient

préférentiellement les larves sur les cadres centraux qui sont les parties les plus chaudes de la ruche.

Chez les colonies noires, il a été observé que les cadres centraux contenaient en moyenne  $478,865 \pm 82,4744 \text{ cm}^2$  de couvain ouvert d'ouvrières en plus que les cadres de rive. Pour les colonies hybridées, l'écart moyen n'était que de  $372,745 \pm 82,4744 \text{ cm}^2$ . Une plus faible quantité de couvain ouvert d'ouvrières chez les colonies noires pourrait expliquer un écart plus prononcé car la majorité du couvain ouvert serait alors concentré sur les cadres centraux. Or, les colonies noires avaient plus de couvain ouvert sur l'ensemble de la période d'étude, ce qui réfute cette possibilité. On peut donc en conclure que les colonies noires présentaient un élevage de couvain plus resserré sur les cadres centraux du corps de ruche. Les colonies hybridées répartissaient davantage leurs larves sur l'ensemble des cadres. Ce comportement pourrait résulter de l'adaptation des colonies noires aux conditions froides et humides. En effet, un couvain plus resserré spatialement est plus facile à réchauffer, ce qui limite les pertes par refroidissement lors de mauvaises conditions climatiques.

#### *e. Répartition du couvain fermé d'ouvrières*

La répartition du couvain fermé d'ouvrières confirmait les observations sur le couvain ouvert. Pour les deux groupes, la partie centrale de la ruche contenait plus de couvain fermé d'ouvrières, avec une différence plus marquée chez les colonies noires que chez les colonies hybrides (Figure 64).

#### *f. Répartition du couvain ouvert et fermé de mâles*

Contrairement au couvain d'ouvrières, la répartition du couvain de mâles était équivalente entre les parties et entre les deux groupes (Figures 65 et 66).

Afin de compléter l'étude, une analyse statistique multivariée évaluant l'effet *race\*partie\*date* a été réalisée dans l'objectif de caractériser l'évolution spatio-temporelle de la structure des ruches. Pour chacune des composantes de la ruche, aucune différence significative n'a été observée, ce qui montre que la répartition des réserves de nourriture et du couvain était équivalente au cours de la saison apicole.

## **7. Variabilité intra-groupe**

### *a. Miel operculé*

L'écart type des colonies hybridées était systématiquement plus élevé, ce qui signifie que les colonies de ce groupe étaient moins homogènes concernant leurs réserves de miel operculé (Figure 67). L'écart le plus important a été observé pendant la période de carence du mois de Juin. Cela montre que les colonies hybridées répondent de manière inégale au trou de miellée, certaines colonies maintenant leur niveau de réserves, tandis que d'autres en consomment une partie. Pour l'apiculteur travaillant avec des colonies hybridées, cela implique de redoubler de vigilance en période de carence, évaluant les réserves des colonies au cas par cas afin d'identifier celles nécessitant éventuellement un nourrissage.

### *b. Nectar*

L'étude des écarts-types concernant la quantité de nectar stocké dégageait deux constats :

- Durant les périodes de faible miellée (le trou de miellée au mois de Juin et le mois d'Août), les écarts-types des deux groupes étaient semblables (Figure 68)



- Durant les périodes de miellée (miellée de printemps au mois de Mai et miellée de châtaignier au mois de Juillet), les écarts-types étaient nettement plus élevés chez les colonies hybridées.

Cela montre que l'homogénéité des deux groupes concernant la récolte de nectar était équivalente durant les périodes de faible miellée. En revanche, en période de forte miellée, les colonies noires formaient un groupe plus homogène que les colonies hybridées. Ainsi, pour l'apiculteur travaillant avec des colonies hybridées, cela implique une gestion des hausses plus contraignante car la récolte de nectar sera très hétérogène entre les différentes colonies.

#### *c. Pollen*

L'écart type des colonies hybridées était systématiquement plus élevé et la différence était la plus marquée en début de saison (Figure 69). Ainsi, le rendement de récolte de pollen supérieur chez les colonies hybridées cache une hétérogénéité importante au sein de ce groupe, certaines colonies étant bien meilleures productrices que d'autres. Les colonies noires récoltent donc moins de pollen mais de manière plus homogène entre les colonies.

Durant la période de carence du mois de Juin, l'écart type reste plus élevé en faveur des colonies hybridées, confirmant la réponse hétérogène des différentes colonies du groupe. Les colonies noires répondent donc de manière plus homogène à cette contrainte environnementale.

#### *d. Couvain fermé d'ouvrières*

Les écarts-types concernant le couvain fermé d'ouvrières étaient semblables entre les deux groupes en Juillet et en Août mais étaient plus élevés chez les colonies hybridées en Mai et en Juin (Figure 70). Cela montre que pour ce dernier groupe, la quantité de couvain fermé d'ouvrières en début de saison plus hétérogène que chez les colonies noires. Pour l'apiculteur travaillant avec des colonies hybridées, cela implique une gestion de l'élevage plus contraignante car les colonies seront peu homogènes au moment des opérations de division ou d'agrandissement du nid à couvain.

#### *e. Couvain fermé de mâles*

Les écarts-types concernant le couvain fermé de mâles étaient semblables en Août mais plus élevés chez les colonies hybridées pour le reste de la période d'étude, les écarts les plus importants étant observés en début de saison (Figure 71). L'hétérogénéité importante de ce groupe concernant la production de couvain mâle implique donc une gestion plus contraignante des ruches à mâles par exemple, qui sont destinées à la production de faux-bourçons. De plus, le suivi de l'infestation en varroas devrait être plus personnalisé entre les ruches, car cette forte hétérogénéité pourrait entraîner des niveaux d'infestation très divers.

### **G. Analyse des résultats du suivi de l'infestation en varroa**

Au sein des deux groupes, le nombre de varroas moyen pour 300 ouvrières augmentait au cours du temps (effet date,  $p < 0,001$ ). Ces résultats sont corrélés aux dynamiques d'infestation habituellement décrites dans les colonies d'abeilles européennes (Vidal-Naquet, 2015).

Au début de l'étude, le nombre de varroas moyen pour 300 ouvrières était équivalent entre les deux groupes ( $p = 1,0000$ ). Cependant, les colonies noires présentaient initialement en moyenne  $1,3636 \pm 4,0076$  varroas pour 300 ouvrières de plus que les colonies hybridées, ce qui était dû à des différences de traitement antiparasitaire reçu lors de la saison précédente. En effet, toutes les

colonies hybridées avaient été traitées à l'Amitraz (APIVAR ND), tandis qu'une partie des colonies noires avaient été traitées par des mesures préventives seulement (retrait de couvain et encagement de reine). Cette différence de charge parasitaire initiale incite à la prudence quant à l'interprétation de la dynamique des courbes d'infestation. En effet, l'augmentation plus rapide du nombre de varroas moyen chez les colonies noires pourrait s'expliquer en partie par un nombre de varroas initial plus élevé.

L'analyse statistique complémentaire réalisée en n'incluant que les colonies dont le nombre de varroas initial était nul permettait de conclure que les différences observées entre colonies noires et hybridées provenaient de la charge parasitaire initiale qui était plus élevée chez les colonies noires. Ces résultats confirmaient ceux d'autres auteurs qui ont montré que la sous-espèce d'abeille n'influçait pas la population de varroas (Bak, 2013).

Cependant, il est à noter que le nombre de varroas moyen sur la période d'étude restait plus élevé chez les colonies noires, même si la différence observée n'était pas significative d'un point de vue statistique. Une hypothèse possible est que la disposition plus resserrée du nid à couvain chez les colonies noires créait des conditions de températures plus favorables au cycle de reproduction du parasite.

Les différences de dynamique observées en fin de saison montrent que le nombre de varroas au printemps est déterminant pour la dynamique d'infestation des colonies, notamment en fin de saison. Une différence moyenne de moins de 2 varroas par colonie a en effet entraîné un dépassement prématuré du seuil d'alerte chez les colonies noires, qui n'a jamais été observé chez les colonies hybridées. L'étude de colonies comparables sur le plan de la charge parasitaire initiale a confirmé cette observation puisque le seuil d'alerte était également dépassé plus précocement chez les colonies noires.

Il aurait été intéressant de comparer les mortalités hivernales des deux groupes, afin d'observer si la différence de dynamique d'infestation en fin de saison influçait le taux de survie des colonies tel que démontré par d'autres auteurs (Dainat, 2008).

Concernant l'évaluation du comportement hygiénique, aucune différence significative n'a été observée entre les colonies des deux groupes pour chaque catégorie de critères mesurés. En outre, aucune colonie testée n'avait nettoyé plus de 70% de cellules tuées après 6 heures, ce qui montre qu'elles ne présentaient pas de comportement hygiénique (Imdorf *et al.*, 2010). Certains auteurs avaient observé un comportement hygiénique peu développé chez les colonies noires en comparaison à celui d'autres lignées (Spivak et Gilliam, 1998). Cette différence de comportement ne s'est pas vérifiée dans le cadre de l'étude.

Il est à noter que pour des raisons pratiques, les résultats ont été mesurés seulement 6 heures après le sacrifice des cellules de couvain. Le délai habituellement appliqué dans d'autres protocoles est de deux jours et le critère retenu pour considérer une colonie hygiénique est de 95 à 100% de cellules nettoyées (Spivak et Downey, 1998 ; Spivak et Reuter, 2001).

De plus, il faut signaler que le comportement hygiénique testé dans le cadre de l'étude n'est pas spécifique à *Varroa destructor*, car les ouvrières désoperculent aussi des larves infectées par la loque européenne et d'autres pathogènes du couvain (Spivak et Gilliam, 1998).

## **H. Analyse des résultats du suivi de l'évolution du poids des colonies**

### **1. Récoltes de miel**

Les colonies hybridées ont produit plus de miel pour la récolte de Mai ( $p < 0,01$ , Figure 78), ce qui s'explique par le retard de développement des colonies noires dont la taille de la population était trop faible en début de saison pour permettre une récolte. Les colonies noires ont ensuite produit une quantité de miel équivalente aux colonies hybridées pour les récoltes de Juin et d'Août, ce qui fournit une nouvelle preuve de leur développement très rapide en début de saison.

La tendance des courbes montre l'impact du trou de miellée du mois de Juin avec une baisse de production de miel par rapport au mois de Mai chez les colonies hybridées, la différence n'étant pas significative du point de vue statistique. Cette observation n'a pas été retrouvée chez les colonies noires, la quantité de miel produite au mois de Mai étant nulle.

La récolte de miel globale restait en moyenne plus élevée chez les colonies hybridées, mais l'écart observé pouvait être attribué au retard de développement des colonies noires en Mai (Figure 79).

### **2. Poids cumulé**

En début d'étude, le poids cumulé des colonies noires était supérieur à celui des colonies hybridées, bien que la différence ne soit pas significative d'un point de vue statistique. Pendant la période de carence du mois de Juin, le poids cumulé des deux groupes diminuait, de manière plus marquée chez les colonies hybridées (semaines 3 à 7, différence non significative, Figure 81). A la faveur de la miellée de châtaignier, les colonies hybridées ont par la suite rattrapé leur retard de poids cumulé (semaines 11 à 13).

La baisse de poids cumulé en fin de saison, qui pouvait s'apparenter à un début de consommation hivernale, débutait dès la semaine 17 chez les colonies hybridées, et un peu plus tardivement chez les colonies noires (semaine 19).

### **3. Variabilité intra-groupe**

Aux mois de Mai et Juin, les écarts-types moyens du poids étaient plus faibles chez les colonies noires que chez les colonies hybridées. Cela montre qu'en début de saison, le poids des colonies noires était plus élevé (différence non significative) et plus homogène que chez les colonies hybridées. En fin de saison, les colonies hybridées avaient rattrapé leur retard de poids cumulé à la faveur de la miellée de châtaignier et l'homogénéité intra-groupe était équivalente à celle des colonies noires.

### **4. Variation du poids cumulé lors de conditions climatiques dégradées**

Pour une période de mauvais temps donnée, aucune différence significative n'a été observée entre les deux groupes concernant le poids cumulé (Figures 84 et 85). Cependant, en considérant l'ensemble des périodes de mauvais temps, le poids cumulé moyen des colonies noires était plus élevé que celui des colonies hybridées ( $p < 0,1$ , tendance significative) de  $2,44 \pm 0,4768$  kg (Figure 86). Nos observations confirment les résultats de Ruttner et Ruttner (1976) qui ont montré que l'abeille noire était supérieure aux autres sous-espèces en cas de miellée modérée entrecoupée de périodes de mauvais temps. Dans notre étude, les écarts de poids cumulé moyen en faveur des colonies noires étaient en effet les plus importants durant les périodes 1 (correspondant au trou de miellée du mois de Juin) et 4 (correspondant à une faible miellée de lierre au mois de Septembre).

Chez les colonies hybridées, le plus faible poids cumulé pendant les périodes de mauvais temps pourrait s'expliquer par une baisse d'activité des butineuses plus marquée que chez les colonies noires. En effet, des conditions d'humidité relative supérieure à 45-50%, telles qu'observées dans notre étude, diminuent l'activité de vol des butineuses, tout comme le vent (Puškadija *et al.*, 2007). Une plus forte consommation de réserves est un deuxième mécanisme qui pourrait expliquer les écarts observés.

Afin de caractériser plus finement cette interaction, il aurait pu être intéressant d'appliquer la méthode ColEval© durant les périodes de mauvais temps, afin de déterminer à quelle composante de cadre les pertes ou gains de poids pouvaient être affectées. Du fait de la durée réduite des épisodes de mauvais temps (quelques jours), cela nécessiterait cependant une évaluation quasi-journalière de la surface de couvain et de réserves. Une mesure de l'activité des butineuses au trou de vol aurait également pu être envisagée (Puškadija *et al.*, 2007).

## **I. Propositions d'amélioration pour des études ultérieures et perspectives**

L'étude a été menée sur les principaux mois de la saison apicole. Il aurait été intéressant de répéter les mesures sur plusieurs saisons afin de comparer les caractéristiques des deux groupes dans des conditions climatiques et de miellées différentes.

Au sein d'un même groupe, les colonies étudiées étaient hétérogènes sur le plan génétique (pour les colonies noires et hybridées) et sur le plan de l'origine géographique (pour les colonies noires). Il pourra être envisagé, dans le cadre de futures études, de former deux groupes de colonies avec reines sœurs à l'origine maternelle identique. Il pourrait alors être envisagé d'inséminer artificiellement les reines vierges avec du sperme de mâle d'origine génétique connue afin de former les deux groupes d'étude.

Il pourrait être envisagé de faire hiverner les colonies sur le même rucher avant de débiter les mesures, ce qui n'était pas le cas dans notre étude, puisque les colonies noires ont été introduites en Avril dans le rucher expérimental.

Enfin, il pourrait être envisagé d'affecter le même traitement anti-varroa à toutes les colonies recrutées en amont d'une future étude.

## **J. Applications pratiques**

### **1. Conduite des colonies**

Pour l'ensemble des composantes (réserves et couvain), les écarts-types calculés étaient presque systématiquement plus élevés chez les colonies hybridées. Cela montre que l'hétérogénéité génétique constatée chez les colonies de ce groupe s'observe également au niveau de ses performances apicoles, en particulier du stockage des réserves.

Ainsi, l'apiculteur travaillant avec des colonies hybridées, moins homogènes, trouvera l'organisation de son travail compliquée par le fait qu'elles ne présenteront pas forcément la même force ni le même niveau de réserves au même moment. Autrement dit, certaines opérations comme la pose des hausses, la division ou encore le nourrissage glucidique et protéique ne pourront pas être effectuées de manière simultanée sur l'ensemble des colonies du fait de leur hétérogénéité.

### **2. Contrôle de la varroose**

Dans des conditions de charges parasitaires initiales identiques, le taux d'infestation des colonies noires dépassait plus précocement les seuils critiques à partir desquels doivent être mis en place des traitements anti-varroa d'urgence, ce qui débouche sur plusieurs applications pratiques pour les apiculteurs travaillant avec l'abeille noire :

- Le suivi du taux d'infestation semble être essentiel à mettre en œuvre dans le cadre des « Bonnes Pratiques Apicoles », par des moyens simples comme l'évaluation par la chute naturelle (Boecking et Drescher, 1991), en particulier au printemps afin d'identifier les colonies potentiellement à risque en fin de saison apicole
- Un traitement précoce doit être mis en place si nécessaire
- Dans le cas de récoltes de miel tardives, un traitement entre deux miellées peut être recommandé, à base d'acide formique ou oxalique, les hausses pouvant être remises en place entre 24 et 48 heures après la fin du traitement (Vidal-Naquet, 2011).

### 3. Intérêt des hybrides

L'étude montre que les colonies hybridées présentent des performances apicoles semblables à celles des colonies noires en termes de quantité de couvain produit et de récolte de miel. Seule la quantité de pollen récolté était plus élevée chez les colonies hybridées dans les conditions expérimentales.

Cela remet en cause l'intérêt des hybrides qui sont généralement introduits dans l'espoir d'améliorer le rendement en miel ou la quantité de couvain produit. Nos observations confirment les résultats de Cornuet *et al.* qui ont montré que l'effet d'hétérosis des hybrides de première génération, qui améliore les performances des colonies, est dilué au cours des générations et disparaît dès la génération F2 (Cornuet *et al.*, 1979). Fresnaye *et al.* avaient également observé un meilleur rendement en miel uniquement pour la génération F1, qui présentait par ailleurs une meilleure homogénéité de récolte (Fresnaye *et al.*, 1974).

Les colonies hybridées incluses dans l'étude étaient effectivement hybridées sur plusieurs générations, ce qui explique que leurs performances apicoles étaient équivalentes à celles des colonies noires.

Le Tableau 14 dresse un bilan des principales différences observées entre colonies noires et hybrides dans le cadre de l'étude :

**Tableau 14 : Principales différences observées entre colonies noires et hybrides**

	<b>Colonies noires</b>	<b>Colonies hybridées</b>
<b>Caractéristiques observées</b>	Capacité d'adaptation rapide à de nouvelles conditions environnementales  Traitement varroa précoce nécessaire en fin de saison apicole	Meilleur rendement en récolte de pollen  Hétérogénéité inter-colonies concernant le stockage des réserves  Baisse d'adaptation environnementale à des situations de carence et de conditions météorologiques dégradées  Nid à couvain moins resserré  Production d'un miel moins diversifié en termes d'origines florales

Ces résultats restaient à confirmer par des études incluant un plus grand nombre de colonies testées et se déroulant sur plusieurs saisons apicoles.



# Conclusion

---

Dans les conditions expérimentales et environnementales de l'étude, et dans le cas de colonies fortes et en bonne santé, l'hybridation de l'abeille noire ne modifiait pas significativement sa dynamique d'élevage de couvain et de stockage de réserves glucidiques. Les différences significatives observées en début de saison étaient dues au retard de développement initial des colonies noires. Ces observations remettent en cause l'intérêt des hybrides, généralement plébiscités dans l'espoir d'améliorer la production de miel ou de couvain.

Ces résultats sont corrélés aux conclusions d'autres auteurs qui ont montré que l'impact de l'environnement sur les performances apicoles des colonies prédominait sur celui de leurs prédispositions génétiques (Imdorf *et al.*, 2010). En d'autres termes, l'influence de la génétique sur les performances apicoles est trop faible pour entraîner des différences significatives entre deux groupes de colonies placées dans le même environnement, pourtant clairement différenciées génétiquement.

Concernant la dynamique de stockage des réserves, il a cependant été observé que les colonies hybridées stockaient plus de pollen à quantité de couvain et population égales, ce qui pourrait montrer un meilleur rendement de récolte de pollen chez ce groupe.

Même si les différences n'étaient pas significatives d'un point de vue statistique, les colonies noires présentaient une adaptation plus fine aux ressources environnementales disponibles, notamment concernant l'élevage du couvain ouvert d'ouvrières et de mâles en période de carence. De plus, les colonies noires présentaient un gain de poids plus élevé en période de mauvais temps, ce qui pourrait montrer leur meilleure capacité d'exploitation des miellées en contexte météorologique dégradé. L'hybridation de l'abeille noire pourrait donc diluer ses adaptations physiologiques aux ressources environnementales, et affecter sa capacité d'exploitation des miellées par mauvais temps.

Le groupe des colonies noires était globalement plus homogène sur l'ensemble des critères étudiés, ce qui est d'autant plus remarquable que les colonies noires présentaient des origines géographiques différentes, contrairement aux colonies hybridées. L'hybridation de l'abeille noire introduit donc une hétérogénéité à la fois sur le plan génétique et sur celui des performances apicoles, ce qui complique la conduite des colonies.

L'étude a enfin démontré que les colonies noires, accusant pourtant un retard de développement en début de saison, ont très vite comblé les différences. Dès le mois de Mai, les forces moyennes des colonies des deux groupes s'étaient égalisées, à la fois en termes de réserves et de développement du couvain, et les colonies noires montraient une meilleure homogénéité globale que les colonies hybridées. Cela montre une capacité d'adaptation très rapide des colonies noires à un nouvel environnement.

*Je remercie à nouveau mes partenaires et sponsors (Annexe 13) qui m'ont permis de réaliser ce travail de recherche et de concrétiser mon idée.*







# Liste des références bibliographiques

---

- ADAM, K. (1980) *Ma Méthode d'apiculture*. Paris, Le Courrier du Livre.
- ADAM, K. (1983) *In Search of the Best Strains of Bees*. Mytholmroyd, Peacock Press.
- ALBURAKI, M., BERTRAND, B., LEGOUT, H., et al. (2013) A fifth major genetic group among honeybees revealed in Syria. *BMC genetics* vol. 14, p. 117. [<https://doi.org/10.1186/1471-2156-14-117>].
- ALBURAKI, M., MOULIN, S., LEGOUT, H., et al. (2011) Mitochondrial structure of Eastern honeybee populations from Syria, Lebanon and Iraq. *Apidologie* vol. 42, n° 5, p. 628-641. [<https://doi.org/10.1007/s13592-011-0062-4>].
- ARNOLD, G., QUENET, B., PAPIN, C., et al. (2002) Intra-Colonial Variability in the Dance Communication in Honeybees (*Apis mellifera*). *Ethology* vol. 108, n° 9, p. 751-761. [<https://doi.org/10.1046/j.1439-0310.2002.00809.x>].
- BAK, B., WILDE, J., SIUDA, M. (2013) Effect of the honey bee subspecies on *Varroa destructor* population growth and brood infestation. *Medycyna Weterynaryjna* vol. 69, n°12, p. 3.
- BAK, B., WILDE, J., M., S., et al. (2009) Comparison of two methods of monitoring honeybee infestation with *Varroa destructor* mite. *Annals of Warsaw University of Life Sciences - SGGW, Animal Science* vol. 46, p. 33-38. [<https://doi.org/10.3390/vetsci9070354>].
- BARTH, O. M. (1989) *O Pólen no Mel Brasileiro*. Rio de Janeiro, Instituto Oswaldo Cruz.
- BAUDE, M., KUNIN, W.E., BOATMAN, N.D., et al. (2016) Historical nectar assessment reveals the fall and rise of floral resources in Britain. *Nature* vol. 530, n° 7588, p. 85-88. [<https://doi.org/10.1038/nature16532>].
- BERTRAND, B., ALBURAKI, M., LEGOUT, H., et al. (2015) MtDNA COI-COII marker and drone congregation area: An efficient method to establish and monitor honeybee (*Apis mellifera* L.) conservation centres. *Molecular Ecology Resources* vol. 15, n° 3, p. 673-683. [<https://doi.org/10.1111/1755-0998.12339>].
- BOECKING, O., DRESCHER, W. (1991) Response of *Apis mellifera* L colonies infested with *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie* vol. 22, n° 3, p. 237-241.
- BOGDANOV, S., HALDIMANN, M., LUGINBÜHL, W., et al. (2007) Minerals in honey: Environmental, geographical and botanical aspects. *Journal of Apicultural Research and Bee World* vol. 46, p. 269-275. [<https://doi.org/10.3896/IBRA.1.46.4.11>].
- BONCRISTIANI, H.F., DI PRISCO, G., PETTIS, J.S., et al. (2009) Molecular approaches to the analysis of deformed wing virus replication and pathogenesis in the honey bee, *Apis mellifera*. *Virology Journal* vol. 6, n° 1, p. 221. [<https://doi.org/10.1186/1743-422X-6-221>].
- BOURSOT, P., BONHOMME, F. (1986) Génétique et évolution du génome mitochondrial des Métazoaires. *Génétique sélection évolution* vol. 18, n° 1, p. 73-98. [<https://doi.org/10.1186/1297-9686-18-1-73>].

- BRÜCKNER, D. (1979) Effects of Inbreeding on Worker Honeybees. *Bee World* vol. 60, n° 3, p. 137-140. [<https://doi.org/10.1080/0005772X.1979.11097746>].
- BÜCHLER, R. (1998) Vergleichende Untersuchung von Volkentwicklung, Flugaktivität und Pollensammelverhalten verschiedener *Apis mellifera carnica*- und *Apis mellifera mellifera* - Herkünfte. *Apidologie* vol. 29, n°5, p. 465-467.
- CAVALLI-SFORZA, L.L., EDWARDS, A.W. (1967) Phylogenetic analysis. Models and estimation procedures. *American Journal of Human Genetics* vol. 19, n° 3 Pt 1, p. 233-257. [<https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1967.tb03411.x>].
- CHAKRABORTY, R., JIN, L. (1993) A unified approach to study hypervariable polymorphisms: statistical considerations of determining relatedness and population distances. *EXS* vol. 67, p. 153-175. [[https://doi.org/10.1007/978-3-0348-8583-6\\_14](https://doi.org/10.1007/978-3-0348-8583-6_14)].
- CHALINE, N. RATNIEKS, F. L. W., Arnold G. et al. (2004) Patriline differences in emergency queen rearing in the honey bee, *Apis mellifera*. *Insectes sociaux*, vol 50. p. 234-236. [<https://doi.org/10.1007/s00040-003-0664-6>].
- CORNUET, J.M., FRESNAYE, J., BLANC, J., et al. (1979) Production de miel chez des hybrides interraciaux d'abeilles (*Apis mellifica* L.) lors de générations successives de rétro croisement sur la race locale. *Apidologie* vol. 10, n° 1, p. 3-15. [<https://doi.org/10.1051/apido:19790101>].
- CORNUET, J.M., GARNERY, L., SOLIGNAC, M. (1991) Putative origin and function of the intergenic region between COI and COII of *Apis mellifera* L. mitochondrial DNA. *Genetics* vol. 128, n° 2, p. 393-403. [<https://doi.org/10.1093/genetics/128.2.393>].
- CORNUET, J.M., PIRY, S. (2000) Logicieltreemaker (version 1.0.1) A windows program for making NJ dendrograms and assigning a bootstrap value between the nodes. Computer software distributed by the authors.
- COULET, F., DAMAN, R. (2011) Journée d'apprentissage à l'utilisation du logiciel APICLASS au Muséum national d'Histoire Naturelle de Paris [document interne]. Paris, Muséum national d'Histoire Naturelle.
- DAINAT B., KEN T., BERTHOUD H., NEUMANN P. (2008) The ectoparasitic mite *Tropilaelaps mercedesae* (Acari, Laelapidae) as a vector of honeybee viruses. *Insectes sociaux*, vol. 56, n°1. p.40-43. [<https://doi.org/10.1007/s00040-008-1030-5>].
- DANFORTH, B.N., FANG, J., SIPES, S. (2006a) Analysis of family-level relationships in bees (Hymenoptera: Apiformes) using 28S and two previously unexplored nuclear genes: CAD and RNA polymerase II. *Molecular Phylogenetics and Evolution* vol. 39, n° 2, p. 358-372. [<https://doi.org/10.1016/j.ympev.2005.09.022>].
- DANFORTH, B.N., SIPES, S., FANG, J., et al. (2006b) The history of early bee diversification based on five genes plus morphology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 103, n° 41, p. 15118-15123. [<https://doi.org/10.1073/pnas.0604033103>].
- DE GUZMAN, L.I., RINDERER, T.E., FRAKE, A.M. (2008) Comparative reproduction of *Varroa destructor* in different types of Russian and Italian honey bee combs. *Experimental & Applied Acarology* vol. 44, n° 3, p. 227-238. [<https://doi.org/10.1007/s10493-008-9142-1>].
- DELAPLANE, K.S., VAN DER STEEN, J., GUZMAN-NOVOA, E. (2013) Standard methods for estimating strength parameters of *Apis mellifera* colonies. *Journal of Apicultural Research* vol. 52, n° 1, p. 1-12. [<https://doi.org/10.3896/IBRA.1.52.1.03>].

- DIETEMANN, V., NAZZI, F., MARTIN, S.J., et al. (2013) Standard methods for varroa research. *Journal of Apicultural Research* vol. 52, n° 1, p. 1-54. [<https://doi.org/10.3896/IBRA.1.52.1.09>].
- DONKERSLEY, P., RHODES, G., PICKUP, R.W., et al. (2017) Nutritional composition of honey bee food stores vary with floral composition. *Oecologia* vol. 185, n° 4, p. 749-761. [<https://doi.org/10.1007/s00442-017-3968-3>].
- EFSA AHAW Panel (European Food Safety Agency, Panel on Animal Health and Welfare) (2016). Scientific opinion on assessing the health status of managed honeybee colonies (HEALTHY-B): a toolbox to facilitate harmonised data collection. *EFSA Journal* vol. 14, n°10. p. 241 [<https://doi:10.2903/j.efsa.2016.4578>].
- ESTOUP, A., GARNERY, L., SOLIGNAC, M., et al. (1995) Microsatellite variation in honey bee (*Apis mellifera* L.) populations: hierarchical genetic structure and test of the infinite allele and stepwise mutation models. *Genetics* vol. 140, n° 2, p. 679-695. [<https://doi.org/10.1093/genetics/140.2.679>].
- FRANCK, P., GARNERY, L., SOLIGNAC, M., et al. (1998) The origin of west european subspecies of honeybees (*apis mellifera*): new insights from microsatellite and mitochondrial data. *International Journal of Organic Evolution* vol. 52, n° 4, p. 1119-1134. [<https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1998.tb01839.x>].
- FRESNAYE, J., LAVIE, P., BOESIGER, E. (1974) La variabilité de la production du miel chez l'abeille de race noire (*apis mellifica* L.) et chez quelques hybrides interraciaux. *Apidologie* vol. 5, n° 1, p. 1-20. [<https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00890354/document>].
- GARNERY, L. (2017) Rapport d'expertise 2017, Analyses génétiques de la population des Belleville [document interne]. Chambéry, Parc National de la Vanoise, Département de la Savoie.
- GARNERY, L., CORNUET, J.M., SOLIGNAC, M. (1992) Evolutionary history of the honey bee *Apis mellifera* inferred from mitochondrial DNA analysis. *Molecular Ecology* vol. 1, n° 3, p. 145-154. [<https://doi.org/10.1111/j.1365-294x.1992.tb00170.x>].
- GARNERY, L., FRANCK, P., BAUDRY, E., et al. (1998a) Genetic diversity of the west European honey bee (*Apis mellifera mellifera* and *A. m. iberica*) I. Mitochondrial DNA. *Genetics Selection Evolution* vol. 30, n° Suppl, p. S31-S47. [<https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00894231/document>].
- GARNERY, L., FRANCK, P., BAUDRY, E., et al. (1998b) Genetic diversity of the west European honey bee (*Apis mellifera mellifera* and *A. m. iberica*) I. Mitochondrial DNA. *Genetics Selection Evolution* vol. 30, n° Suppl, p. S49-S74.
- GARNERY, L., MOSSHINE, E.H., OLDROYD, B.P., et al. (1995) Mitochondrial DNA variation in Moroccan and Spanish honey bee populations. *Molecular Ecology* vol. 4, n° 4, p. 465-472. [<https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.1995.tb00240.x>].
- GAUTHIER, C. (2018) Où en est-on avec l'abeille noire? *In Apiculture ici et ailleurs* [[https://www.apiservices.biz/documents/articles-fr/ou\\_en\\_est\\_on\\_avec\\_abeille\\_noire.pdf](https://www.apiservices.biz/documents/articles-fr/ou_en_est_on_avec_abeille_noire.pdf)] (consulté le 16/10/2022).
- GERIG, L., WILLE, H. (1975) Periodizität in der Eiablage der Bienenköniginnen (*Apis mellifica* L.). *Mitteilungen der Schweizerischen Entomologischen Gesellschaft* vol. 48 n°1-2, p. 91-97. [<https://doi.org/10.5169/SEALS-401759>].

- GONZÁLEZ-MIRET, M.L., TERRAB, A., HERNANZ, D., et al. (2005) Multivariate correlation between color and mineral composition of honeys and by their botanical origin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* vol. 53, n° 7, p. 2574-2580. [<https://doi.org/10.1021/jf048207p>].
- HALFON, T. (2019) Le projet de recherche Smartbees ouvre la voie de la sélection génétique. *La Semaine Vétérinaire* n° 1806 du 06/04/2019.
- HALL, H.G., SMITH, D.R. (1991) Distinguishing African and European honeybee matrilineages using amplified mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 88, n° 10, p. 4548-4552. [<https://doi.org/10.1073/pnas.88.10.4548>].
- IMDORF, A., MAQUELIN, C. (1993) Estimation printanière des colonies d'abeilles. *Journal Suisse d'apiculture* vol 90, p.433-437.
- IMDORF, A., RUOFF, K., FLURI, P., GALLMANN, P. (2010) Le développement des colonies chez l'abeille mellifère. *ALP Forum* n° 68, p. 1-67.
- ISOPESCU, R.D., JOSCEANU, A.M., MINCA, I., et al. (2014) Characterization of Romanian Honey Based on Physico-Chemical Properties and Multivariate Analysis. *Revista de chimie* n° 4, p. 5.
- JENSEN, A.B., PALMER, K.A., BOOMSMA, J. J., et al. (2005) Varying degrees of *Apis mellifera ligustica* introgression in protected populations of the black honeybee, *Apis mellifera mellifera*, in northwest Europe. *Molecular Ecology* vol. 14, n° 1, p. 93-106. [<https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2004.02399.x>].
- KACZMAREK, A., MUZOLF-PANEK, M., TOMASZEWSKA-GRAS, J., et al. (2019) Predicting the Botanical Origin of Honeys with Chemometric Analysis According to Their Antioxidant and Physicochemical Properties. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences* vol. 69, p. 191-201. [<https://doi.org/10.31883/pjfn/108526>].
- KARIHALOO, B.L., ZHANG, K., WANG, J. (2013) Honeybee combs: how the circular cells transform into rounded hexagons. *Journal of The Royal Society Interface* vol. 10, n° 86, p. 1020130299. [<https://doi.org/10.1098/rsif.2013.0299>].
- KEPENA, L. (1977) The length of bee life in dependence on various degrees of inbreeding. *Polnohospodarstvo* vol. 23 n°2, p. 196-201.
- KÖPPLER, K., VORWOHL, G., KOENIGER, N. (2007) Comparison of pollen spectra collected by four different subspecies of the honey bee *Apis mellifera*. *Apidologie* vol. 38, n° 4, p. 341-353. [<https://doi.org/10.1051/apido:2007020>].
- KRATKY, E., KRATKY, ERICH (1931) Morphologie und Physiologie der Drüsen in Kopf und Thorax der Honigbiene (*Apis mellifica* L.). *Zeitschrift für wissenschaftliche Zoologie* vol. 139 n° 1, 119-200.
- KULINCEVIC J.M., ROTHENBUHLER, W.C., RINDERER, T.E. (1983) Disappearing disease. II. Effects of certain protein sources on brood rearing and length of life in the honey bee under laboratory conditions, *The American Bee Journal* vol.123, n°1, p. 50-53.
- LANGELLA (2001) Programme NUJES (version 0.8).
- LANGELLA (1999) Logiciel POPULATIONS (version 1.2.21).
- LIEBIG, G. (1997) Volksentwicklung auf Naturwabenbau. *Deutsches Bienen Journal* vol. 5, n°5-6, p. 12-13/16.

- LITTELL, R.C., HENRY, P.R., AMMERMAN, C.B. (1998) Statistical analysis of repeated measures data using SAS procedures. *Journal of Animal Science* vol. 76, n° 4, p. 1216-1231. [<https://doi.org/10.2527/1998.7641216x>].
- MACHADO DE-MELO, A.A., BICUDO DE ALMEIDA-MURADIAN, L., SANCHO, M.T. et al. (2018) Composition and properties of *Apis mellifera* honey: A review. *Journal of apicultural research* vol. 57, n° 1, p. 5-37. [<https://doi.org/10.1080/00218839.2017.1338444>].
- MAISONNASSE, A., HERNANDEZ, J., LE QUINTEC, C., et al. (2016) Evaluation de la structure des colonies d'abeilles, création et utilisation de la méthode ColEval (Colony Evaluation). *Innovations Agronomiques* vol. 53, p. 27-37. [<https://doi.org/10.15454/1.51358572217001E12>].
- MAURIZIO, A. (1950) Untersuchungen über den Einfluss der Pollennahrung und Brutpflege auf die Lebensdauer und den physiologischen Zustand der Bienen. *Schweizerische Bienen-Zeitung* vol. 73 n°2, p. 58-64.
- MAURIZIO, A. (1961) Lebensdauer und Altern bei der Honigbiene (*Apis mellifica* L.). *Gerontology* vol. 5, n° 2, p. 110-128. [<https://doi.org/10.1159/000211048>].
- MC LELLAN, A.R. (1977) Honeybee Colony Weight as an Index of Honey Production and Nectar Flow: A Critical Evaluation. *Journal of Applied Ecology* vol. 14, n° 2, p. 401-408. [<https://doi.org/10.2307/2402553>].
- MEIKLE, W. G., HOLST N. (2015) Application of continuous monitoring of honeybee colonies. *Apidologie* vol. 46, p. 10–22 [<https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-01284423/document>].
- MEIKLE, W. G., WEISS, M., STILWELL, A. R. (2016) Monitoring colony phenology using within-day variability in continuous weight and temperature of honey bee hives. *Apidologie* vol 47. p.1-14. [<https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-01316008/document>].
- MEIKLE, W.G., HOLST, N., MERCADIER, G., et al. (2006) Using balances linked to dataloggers to monitor honey bee colonies. *Journal of Apicultural Research* vol. 45, n° 1, p. 39-41. [<https://doi.org/10.1080/00218839.2006.11101311>].
- MERZ, R., GERIG, L., WILLE, H., et al. (1979) Problem der Kurz- und Langlebigkeit bei der Ein- und Auswinterung im Bienenvolk (*Apis mellifica* L.): eine Verhaltensstudie. *Revue suisse de zoologie* vol. 86, n° 3, p. 663-671. [<https://doi.org/10.5962/bhl.part.82329>].
- MILNE, C.P.-J. (1980) Laboratory measurement of honey production in the honey bee *apis mellifera* 1. a model for hoarding behavior by caged workers. *Journal of Apicultural Research* vol. 19, n° 3, p. 172-175.
- MORITZ, R., CORNUET, J., KRYGER, P., et al. (1994) Mitochondrial DNA variability in South African honeybees (*Apis mellifera* L.). *Apidologie* vol. 25, n° 2, p. 169-178.
- MORITZ, R.F.A., HAWKINS, C.F., CROZIER, R.H., et al. (1986) A mitochondrial DNA polymorphism in honeybees (*Apis mellifera* L.). *Experientia* vol. 42, n° 3, p. 322-324. [<https://doi.org/10.1007/BF01942522>].
- MULLIN, C.A., FRAZIER, M., FRAZIER, J.L., et al. (2010) High Levels of Miticides and Agrochemicals in North American Apiaries: Implications for Honey Bee Health. *PLoS ONE* vol. 5, n° 3, p. e9754. [<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009754>].

- NADERI, S., REZAEI, H.-R., TABERLET, P., et al. (2007) Large-Scale Mitochondrial DNA Analysis of the Domestic Goat Reveals Six Haplogroups with High Diversity. *PLoS ONE* vol. 2, n° 10, p. e1012. [https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001012].
- OLEKSA, A., TOFILSKI, A. (2015) Wing geometric morphometrics and microsatellite analysis provide similar discrimination of honey bee subspecies. *Apidologie* vol. 46, n° 1, p. 49-60. [https://doi.org/10.1007/s13592-014-0300-7].
- ORLANDO, L., LEONARD, J.A., THENOT, A., et al. (2003) Ancient DNA analysis reveals woolly rhino evolutionary relationships. *Molecular Phylogenetics and Evolution* vol. 28, n° 3, p. 485-499. [https://doi.org/10.1016/s1055-7903(03)00023-x].
- PAMILO, P., VARVIO-AHO, S.-L., PEKKARINEN, A. (1978) Low enzyme gene variability in Hymenoptera as a consequence of haplodiploidy. *Hereditas* vol. 88, n° 1, p. 93-99. [https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1978.tb01607.x].
- PERRIER, C., STRANGE, J., LANGELLA, O., et al. (2003) Diversité génétique, introgressions mitochondriales et nucléaire dans une population d'abeilles des Landes de Gascogne. *Les Actes du bureau des ressources génétiques (BRG)* vol. 4, p. 79-100.
- PIRY, S., ALAPETITE, A., CORNUET, J.-M., PAETKAU, D., BAUDOUIN, L., ESTOUP, A. (2004) GENECLASS2: a software for genetic assignment and first-generation migrant detection. *Journal of Heredity* vol. 95, n° 6, p. 536-539. [https://doi.org/10.1093/jhered/esh074].
- PUŠKADIJA, Z., ŠTEFANIĆ, E., MIJIĆ, A., ZDUNIĆ, Z., PARADŽIKOVIĆ, N., FLORIJAČIĆ, T., OPAČAK, A. (2007) Influence of weather conditions on honey bee visits (*Apis mellifera carnica*) during sunflower (*Helianthus annuus* L.) blooming period. *Agriculture Scientific and Professional Review* vol.13, n°1, p. 230-233.
- RUOFF, K., LUGINBÜHL, W., KÜNZLI, R., IGLESIAS, M.T. (2006) Authentication of the Botanical and Geographical Origin of Honey by Mid-Infrared Spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol.54, n°18, p. 6873-6880. [https://doi.org/10.1021/jf060838r].
- RUTTNER, F. (1988) Biogeography and Taxonomy of Honeybees. Heidelberg, Springer Verlag. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-72649-1].
- RUTTNER, F. ; RUTTNER, H. (1976) Die Spätsommerbrut bei Völkern verschiedener Abstammung und ihre Abhängigkeit von Umweltbedingungen. *Allgemeine Deutsche Imkerzeitung* vol. 10, p. 417-421.
- SAITOU, N., NEI, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* vol. 4, n° 4, p. 406-425. [https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454].
- SCHMICKL, T., CRAILSHEIM, K. (2001) Cannibalism and early capping: strategy of honeybee colonies in times of experimental pollen shortages. *Journal of Comparative Physiology A* vol. 187, n° 7, p. 541-547. [https://doi.org/10.1007/s003590100226].
- SHEN, M., YANG, X., COX-FOSTER, D., et al. (2005) The role of varroa mites in infections of Kashmir bee virus (KBV) and deformed wing virus (DWV) in honey bees. *Virology* vol. 342, n° 1, p. 141-149. [https://doi.org/10.1016/j.virol.2005.07.012].
- SHEPPARD, W., MEIXNER, M. (2003) *Apis mellifera pomonella*, a new honey bee subspecies from Central Asia. *Apidologie* vol. 34, n° 4, p. 367-375. [https://doi.org/10.1051/apido:2003037].

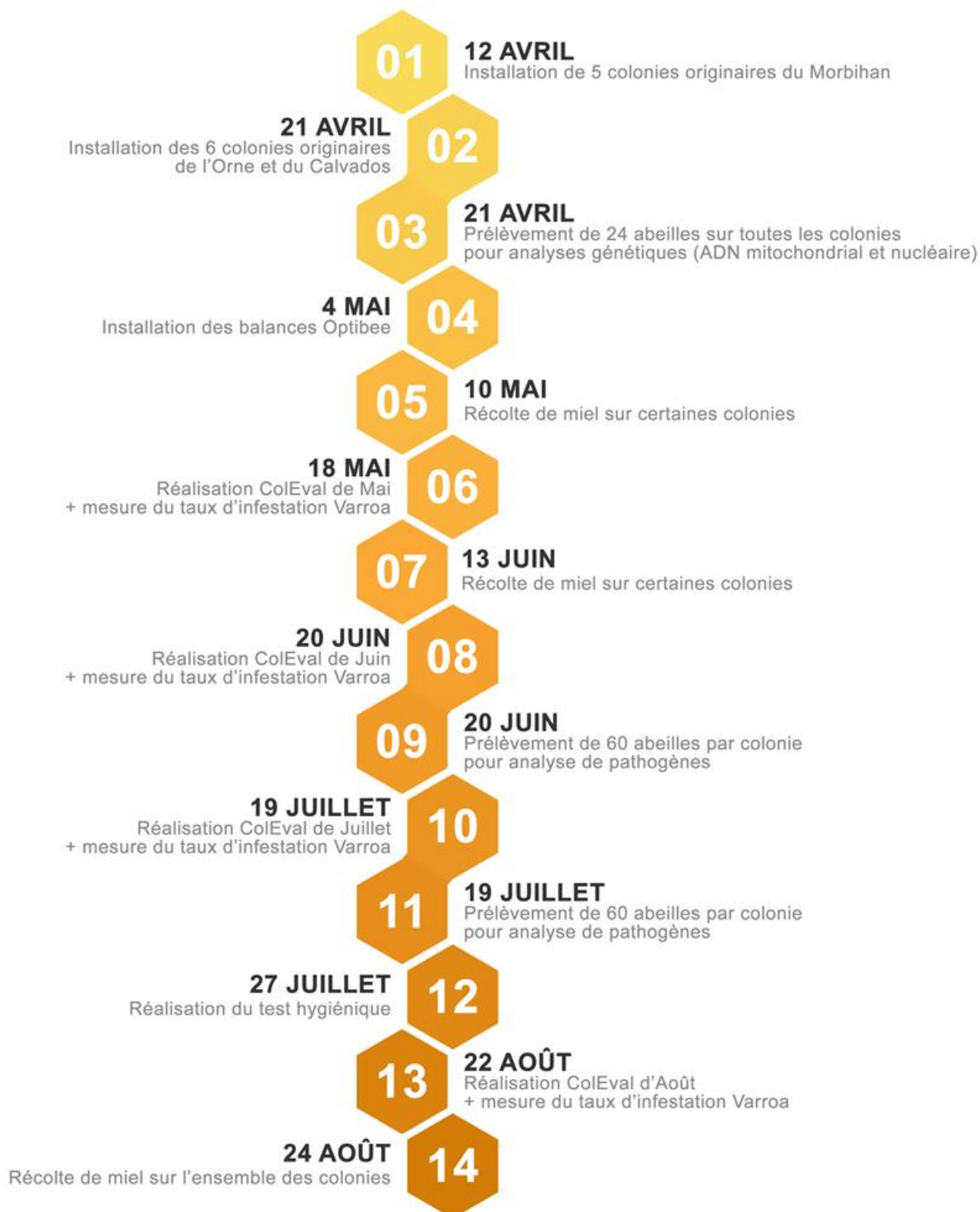


- SHEPPARD, W.S., ARIAS, M.C., GRECH, A., et al. (1997) *Apis mellifera ruttneri*, a new honey bee subspecies from Malta. *Apidologie* vol. 28, n° 5, p. 287-293. [<https://doi.org/10.1051/apido:19970505>].
- SHEPPARD, W.S., BERLOCHER, S.H. (1989) Allozyme variation and differentiation among four *Apis* species. *Apidologie* vol. 20, n° 5, p. 419-431. [<https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00890797/document>].
- SMITH, D. (1991) Mitochondrial DNA and Honey Bee Biogeography. Diversity in the Genus *Apis*. Boca Raton, Chemical Rubber Company Press. [<https://doi.org/10.1201/9780429045868-8>].
- SMITH, D. R., BROWN, W.M. (1990) Restriction Endonuclease Cleavage Site and Length Polymorphisms in Mitochondrial DNA of *Apis mellifera mellifera* and *A. m. carnica* (Hymenoptera: Apidae). *Annals of the Entomological Society of America* vol. 83, n°1, p. 81-83. [<https://doi.org/10.1093/aesa/83.1.81>].
- SMITH, D.R., CRESPI, B.J., BOOKSTEIN, F.L. (1997) Fluctuating asymmetry in the honey bee, *Apis mellifera*: effects of ploidy and hybridization. *Journal of Evolutionary Biology* vol. 10, n° 4, p. 551-574. [<https://doi.org/10.1046/j.1420-9101.1997.10040551.x>].
- SOLIGNAC, M., VAUTRIN, D., LOISEAU, A., et al. (2003) Five hundred and fifty microsatellite markers for the study of the honeybee (*Apis mellifera* L.) genome. *Molecular Ecology Notes* vol. 3, n° 2, p. 307-311. [<https://doi.org/10.1046/j.1471-8286.2003.00436.x>].
- SOUDEK, S. (1927) The pharyngeal glands of the honeybee (*Apis mellifera* L.), *Bulletin de l'école supérieure d'agronomie Brno* n°10, p. 52-61.
- SPIVAK, M., DOWNEY, D.L. (1998) Field Assays for Hygienic Behavior in Honey Bees (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Economic Entomology* vol. 91, n° 1, p. 64-70. [<https://doi.org/10.1093/jee/91.1.64>].
- SPIVAK, M., GILLIAM, M. (1998) Hygienic behaviour of honey bees and its application for control of brood diseases and varroa. *Bee World* vol. 79, n° 4, p. 169-186. [<https://doi.org/10.1080/0005772X.1998.11099408>].
- SPIVAK, M., REUTER, G.S. (2001) Resistance to American foulbrood disease by honey bee colonies *Apis mellifera* bred for hygienic behavior. *Apidologie* vol. 32, n° 6, p. 555-565. [<https://doi.org/10.1051/apido:2001103>].
- TAKEZAKI, N., NEI, M. (1996) Genetic distances and reconstruction of phylogenetic trees from microsatellite DNA. *Genetics* vol. 144, n° 1, p. 389-399. [<https://doi.org/10.1093/genetics/144.1.389>].
- TROUILLET, D. (2021) Nouvelle Loi de Santé Animale. *Abeilles72*. [<https://www.abeilles72.org/nouvelle-loi-de-sante-animale/>]. (consulté le 22/10/2022).
- URAN, H., YILMAZ AKSU, F., DULGER, D. (2017) A research on the chemical and microbiological qualities of honeys sold in Istanbul. *Food Science and Technology* vol. 37, p. 30-33. [<https://doi.org/10.1590/1678-457x.32016>].
- VANENGELSDORP, D., MEIXNER, M.D. (2010) A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. *Journal of Invertebrate Pathology* vol. 103, p. 80-95. [<https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.06.011>].
- VIDAL-NAQUET, N. (2011) La santé de l'abeille domestique et le vétérinaire. *La Dépêche Technique*, n° 139.

- VIDAL-NAQUET, N. (2015) Honeybee Veterinary Medicine: Apis Mellifera L. Sheffield, United Kingdom, 5M Books Ltd.
- VILÀ, C., MALDONADO, J.E., WAYNE, R.K. (1999) Phylogenetic relationships, evolution, and genetic diversity of the domestic dog. *The Journal of Heredity* vol. 90, n° 1, p. 71-77. [<https://doi.org/10.1093/jhered/90.1.71>].
- VILLEMANT, C., BARBET-MASSIN, M., PERRARD, A., et al. (2011) Predicting the invasion risk by the alien bee-hawking Yellow-legged hornet *Vespa velutina nigrithorax* across Europe and other continents with niche models. *Biological Conservation* vol. 144, n° 9, p. 2142-2150. [<https://doi.org/10.1016/j.biocon.2011.04.009>].
- VIT, P., PEDRO, S.R.M., ROUBIK, D.W. (2018) Pot-Pollen in Stingless Bee Melittology. New York, Springer.
- WEISS, K. (1984) Regulierung des Proteinhaushaltes im. *Apidologie* vol. 15, n° 3, p. 339-354. [<https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00890632/document>].
- WEISS, K. (1985) Zum Brutfrass der Bienen. *Imkerfreund* vol 1, p. 6-7.
- WESTERHOFF, A. ; BÜCHLER, R. (1994) Zusammenhänge zwischen Volksstärke, Brutpflege, Lebenserwartung und Honigleistung, *Allgemeine Deutsche Imkerzeitung*, n°10, p. 30-34.
- WHITFIELD, C.W., BEHURA, S.K., BERLOCHER, S.H., et al. (2006) Thrice out of Africa: ancient and recent expansions of the honey bee, *Apis mellifera*. *Science (New York)* vol. 314, n° 5799, p. 642-645. [<https://doi.org/10.1126/science.1132772>].
- WILDE, J. (2009) Comparison of two methods of monitoring honeybee infestation with *Varroa destructor* mite. *Annals of Warsaw University of Life Sciences*, vol 46. p. 33-38. [<https://doi.org/10.3390/vetsci9070354>].
- WILLE, H. (1981) Ein- und Auswinterung, Gereimtes und Ungereimtes, *Nordwestdeutsche Imkerzeitung* vol. 33, n°7-8, p. 186-190.
- WILLE, H. (1985a) In welchem Mass beeinflusst Rassen-«Reinheit» den Brutrhythmus der Bienenvölker. Schweiz. *Bienen-Zeitung* vol. 108, n°8, p. 379-395.
- WILLE, H. (1985b) Überlebensstrategien des Bienenvolkes, *Bienenwelt* vol. 27, p. 169-182.
- WILLE, H. (1985c) Weitere Ergebnisse über den Brutrhythmus von Bienenvölkern, Schweiz. *Bienen-Zeitung* vol. 108, n°7, p. 327-343.
- WILLE, H., IMDORF, A., BUHLMANN, G., et al. (1985) Beziehung zwischen Polleneintrag, Brutaufzucht und mittlerer Lebenserwartung der Arbeiterinnen in Bienen völkern (*Apis mellifica* L.). *Mitteilungen der Schweizerischen Entomologischen Gesellschaft*, vol. 58 n°1-2, p. 205-214. [<https://doi.org/10.5169/SEALS-402155>].
- WINSTON, M.L. (1991) The Biology of the Honey Bee. Cambridge. Harvard University Press.


# Annexe 1 : Déroulement général de l'étude

---



# Annexe 2 : Identification des principaux virus par PCR

---

	INSTRUCTION DE TRAVAIL _ <i>LABORATOIRE DE SOPHIA ANTIPOLIS</i>		
	<i>Mode opératoire d'analyse : MOA</i>		
	1-ABE		
	<b>Recherche de plusieurs virus de l'abeille par PCR conventionnelle (ABPV, IAPV, KBV, DWV, SBV, BQCV, CBPV)</b>		
	<i>Codification : ANA-II.MOA.29.</i>	<i>révision : 03</i>	Page 1 / 6


## Historique des modifications

### Diffusion du document

<b>Destinataires</b>
<b>Chargé de Projet Scientifique-Responsable de Thématique</b>
<b>Personnel Technique</b>

Date de mise en application : 01/12/2015


*Document ne pouvant être reproduit sans l'accord de l'Anses laboratoire de Sophia Antipolis*  
*Tél. : 04-92-94-37-00 Fax. : 04-92-94-37-01*  
Seules les versions informatiques sous Ennov et papier détenue par le Responsable Qualité font foi

	INSTRUCTION DE TRAVAIL _ <i>LABORATOIRE DE SOPHIA ANTIPOLIS</i>		
	<i>Mode opératoire d'analyse : MOA</i>		
	1-ABE		
	<b>Recherche de plusieurs virus de l'abeille par PCR conventionnelle (ABPV, IAPV, KBV, DWV, SBV, BQCV, CBPV)</b>		
	<i>Codification : ANA-II.MOA.29.</i>	<i>révision : 03</i>	Page 2 / 6

## Sommaire

1	OBJET ET DOMAINE D'APPLICATION .....	3
2	RESPONSABILITE .....	3
3	CONTENU .....	3
3.1	Principe .....	3
3.2	Introduction.....	3
3.3	Amplification par PCR et détection des produits PCR.....	3
3.3.1	Points spécifiques .....	4
3.3.2	Programme de PCR : PCR55MV .....	5
3.4	Interprétation et validation des résultats .....	5

<p><i>Document ne pouvant être reproduit sans l'accord de l'Anses laboratoire de Sophia Antipolis</i>  <i>Tél : 04-92-94-37-00 Fax : 04-92-94-37-01</i>  <b>Seules les versions informatiques sous Ennov et papier détenue par le Responsable Qualité font foi</b></p>
--

	INSTRUCTION DE TRAVAIL _ <i>LABORATOIRE DE SOPHIA ANTIPOLIS</i>	
	<i>Mode opératoire d'analyse : MOA</i>	
	1-ABE	
	<b>Recherche de plusieurs virus de l'abeille par PCR conventionnelle (ABPV, IAPV, KBV, DWV, SBV, BQCV, CBPV)</b>	
	<b>Codification : ANA-II.MOA.29.</b>	<b>révision : 03</b>
		Page 3 / 6

## 1 OBJET ET DOMAINE D'APPLICATION

Cette instruction vise à décrire la détection de plusieurs virus de l'abeille (ABPV Acute bee paralysis virus, IAPV Israeli acute paralysis virus, KBV Kashmir bee virus, DWV Deformed wing virus, SBV Sacbrood virus, BQCV Black queen cell virus et CBPV Chronic Bee Paralysis Virus) par PCR suite à l'étape de reverse transcription de l'ARN viral dans des échantillons d'abeilles (broyat).

## 2 RESPONSABILITE

Cette instruction est destinée aux personnes habilitées de l'Unité Pathologie de l'Abeille.

## 3 CONTENU

### 3.1 Principe

La technique utilisée est basée sur les différents protocoles de PCR décrits dans la littérature (ABPV, Bakonyi et al., 2002 ; IAPV, Cox Foster et al., 2007 ; KBV, Carletto et al., 2010 ; DWV, Blanchard et al., 2007 ; SBV, Grabensteiner et al., 2001 ; BQCV, Blanchard et al., 2007 ; CBPV, Blanchard *et al.*, 2008).

### 3.2 Introduction

La détection des différents virus de l'abeille à partir des échantillons d'abeilles se décompose en 5 étapes :


1. Préparation des broyats d'abeilles selon le protocole « [ANA-II.MOP.01](#) »
2. Extraction des ARN à partir des broyats d'abeilles selon le protocole « [ANA-II.MOP.02](#) ». Un témoin d'extraction positif est à ajouter à chaque essai, selon le virus recherché. Dans certains cas, un seul témoin suffit pour la détection de plusieurs virus (exemple : ABPV, IAPV et DWV ou SBV et BQCV).
3. Etape de Reverse-Transcription sur les ARN viraux selon le protocole « [ANA-II.MOP-03](#) »
4. Amplification de l'ADN cible et analyse des produits de PCR selon le protocole « [ANA-II.MOP.07](#) »
5. Interprétation et validation des résultats.

### 3.3 Amplification par PCR et détection des produits PCR

Les PCR décrites dans cette procédure sont des PCR Monoplex, pour chaque échantillon il est effectué autant de PCR que de virus recherché. Prévoir le nombre de tubes de MIX-PCR nécessaire pour chaque virus (cf. feuille de travail « Feuille d'enregistrement de la PCR multi virus » [ANA-E1.FSA.14](#)). Pour la réalisation des PCR suivre la procédure [ANA-II.MOP.07](#). « Etape d'amplification en chaine, PCR pour la détection et/ ou l'identification des pathogènes de l'abeille et analyse des produits PCR ».

<p style="text-align: center;"><i>Document ne pouvant être reproduit sans l'accord de l'Anses laboratoire de Sophia Antipolis</i> Tél. : 04-92-94-37-00 Fax. : 04-92-94-37-01 Seules les versions informatiques sous Ennov et papier détenue par le Responsable Qualité font foi</p>
--



	INSTRUCTION DE TRAVAIL _ <i>LABORATOIRE DE SOPHIA ANTIPOLIS</i>		
	<i>Mode opératoire d'analyse : MOA</i>		
	1-ABE		
	<b>Recherche de plusieurs virus de l'abeille par PCR conventionnelle (ABPV, IAPV, KBV, DWV, SBV, BQCV, CBPV)</b>		
	<i>Codification : ANA-IL.MOA.29.</i>	<i>révision : 03</i>	Page 4 / 6

### 3.3.1 Points spécifiques


Amorces spécifiques pour chaque virus ciblé

Virus	Amorce	Séquence
ABPV	ABPV 3	5'-CATATTGGCGAGCCACTATG-3'
	ABPV 4	5'-CCACTTCCACACAACACTATCG-3'
IAPV	IAPV 3	5'-CGATGAACAACGGAAGGTTT-3'
	IAPV 4	5'-ATCGGCTAAGGGGTTTGTTT-3'
KBV	KBV 6f	5'-TATGCTGAACAACGCAAAGA-3'
	KBV 6r	5'-ACAACACGATGTCTGGGTTT-3'
DWV	DWV 3	5'-GGTCCGCGGCTAAGATTGTA-3'
	DWV 4	5'-CGGCTGTTTGATGGAAGAAGTT-3'
SBV	SBV 1	5'-ACCAACCGATTCTCAGTAG-3'
	SBV 2	5'-CCTTGGAACCTGCTGTGTA-3'
BQCV	BQCV 3	5'-GGTGCAAGTCTTCTCCTAG-3'
	BQCV 4	5'-AATAACCTGAAAGCCAAGAG-3'
CBPV	CBPV1-1	5'-TCAGACACCGAATCTGATTATTG-3'
	CBPV1-2	5'-ACTACTAGAAACTCGTCGCTTCG-3'

- Préparer la fiche de travail « Feuille d'enregistrement de la PCR multi virus » [ANA-E1.FSA.14](#). Indiquer le nombre de virus ciblés (1 à 6) ainsi que le nombre d'échantillons à traiter.
- Ajouter un témoin positif PCR pour chaque virus ciblé (contrôle plasmidique, cf tableau ci-dessous) et un témoin négatif PCR (en remplaçant l'échantillon par de l'eau qualité BM).

Virus	Clone / Dilution
ABPV	B2 / LD <sub>PCR</sub> x 10
IAPV	A5 / LD <sub>PCR</sub> x 10
DWV	C1 / LD <sub>PCR</sub> x 10
SBV	D1 / LD <sub>PCR</sub> x 10
BQCV	E1 / LD <sub>PCR</sub> x 10
KBV	N2 / LD <sub>PCR</sub> x 10
CBPV	F1 / LOD <sub>PCR</sub> x 10

*Document ne pouvant être reproduit sans l'accord de l'Anses laboratoire de Sophia Antipolis*  
Tél : 04-92-94-37-00 Fax : 04-92-94-37-01  
Seules les versions informatiques sous Ennov et papier détenue par le Responsable Qualité font foi

	INSTRUCTION DE TRAVAIL _ LABORATOIRE DE SOPHIA ANTIPOLIS		
	Mode opératoire d'analyse : MOA		
	1-ABE		
	<b>Recherche de plusieurs virus de l'abeille par PCR conventionnelle (ABPV, IAPV, KBV, DWV, SBV, BQCV, CBPV)</b>		
	Codification : ANA-IL.MOA.29.	révision : 03	Page 5 / 6

Le volume d'échantillon utilisé est de 2,5 µl d'ADNc, cf. fiche de travail spécifique « Feuille d'enregistrement de la PCR multi virus » [ANA-E1.FSA.14](#).

- Le programme de PCR adapté est le programme PCR55MV.

### 3.3.2 Programme de PCR : PCR55MV

Les spécificités de ce programme sont soulignées :

- Dénaturation de l'ADN (94°C pendant 2 minutes)
- 30 cycles comprenant :
  - Dénaturation 94°C pendant 30 secondes
  - Hybridation des amorces à 55°C pendant 30 secondes
  - Elongation à 72°C pendant 30 à 45 secondes (selon les virus ciblés)
- Dans le cas de cibles différentes, choisir le temps maximum.
- Elongation finale à 72°C pendant 5 minutes.
- Conservation des échantillons à 10°C.

### 3.4 Interprétation et validation des résultats

Dans le cadre de cette PCR multi-virus, l'interprétation des résultats est basée sur la présence ou l'absence du produit amplifié.


Virus	Taille du produit amplifié
ABPV	398 pb
IAPV	767 pb
DWV	420 pb
SBV	469 pb
BQCV	606 pb
KBV	659 pb
CBPV	570 pb

Un résultat de PCR n'est considéré comme valide que si :

- Les témoins positifs d'extraction et de PCR sont bien positifs,
- Les témoins négatifs d'extraction et de PCR sont bien négatifs.

De plus, en cas de résultat négatif pour l'ensemble des virus recherché sur un même échantillon, il est nécessaire de s'assurer de l'absence d'inhibiteur de PCR dans l'extrait qui pourrait conduire à un résultat « faussement négatif ». Une PCR β-Actine est réalisée afin de mettre en évidence la présence du gène de la β-Actine spécifique de l'espèce *Apis mellifera*, correspondant à un témoin positif endogène non cible (cf.



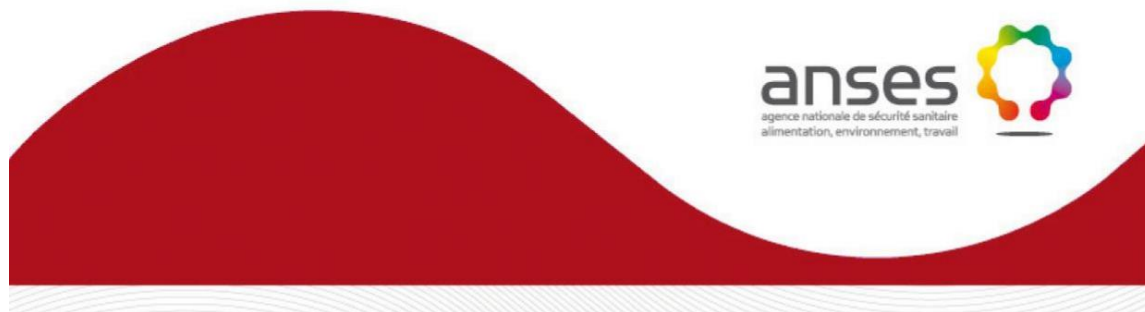
	INSTRUCTION DE TRAVAIL _ <i>LABORATOIRE DE SOPHIA ANTIPOLIS</i>		
	<i>Mode opératoire d'analyse : MOA</i>		
	1-ABE		
	<b>Recherche de plusieurs virus de l'abeille par PCR conventionnelle (ABPV, IAPV, KBV, DWV, SBV, BQCV, CBPV)</b>		
	<b>Codification : ANA-IL.MOA.29.</b>	<b>révision : 03</b>	Page 6 / 6

protocole « Contrôle de la présence du gène de la  $\beta$  actine sur des échantillons d'abeille par PCR, [ANA-IL.MOA.30](#)). Si la présence du gène de la  $\beta$ -Actine est confirmée, le résultat négatif de l'échantillon analysé est confirmé. Dans le cas contraire, il faut refaire l'extraction pour l'échantillon en question.

Pour chaque échantillon et chaque virus, le résultat final est ensuite retranscrit sur la fiche d'enregistrement « [ANA-E1.FDP.28](#) ».

# Annexe 3 : Identification de *Nosema* par PCR

---



Méthode d'analyse en santé animale

RÉFÉRENCE : ANSES/SOP/ANA-I1.MOA.11 - Version 3

Août 2016

## Identification de l'espèce de *Nosema* par PCR

**Laboratoire de Sophia Antipolis**  
Laboratoire national de référence - Santé des abeilles  
Laboratoire européen de référence - Santé de l'Abeille



Le présent document est, sous sa forme électronique, mis à la disposition des utilisateurs en tant que méthode d'analyse. Ce document est la propriété de l'Anses. Toute reproduction, qu'elle soit totale ou partielle, n'est autorisée qu'à la condition expresse que la source soit citée, par exemple en faisant mention de sa référence (incluant sa version et année) et de son titre.

ANSES/PR3/01-04 [version c]



### Historique de la méthode

Une méthode peut être mise à jour afin de prendre en compte des modifications.

*Une modification est considérée comme majeure* dès lors qu'elle concerne des parties clés ou le fond même de la méthode, dont la prise en compte est susceptible d'améliorer significativement la portée ou le résultat de la méthode d'analyse. Une modification majeure induit en général des adaptations importantes. La méthode ainsi modifiée a fait l'objet d'une nouvelle validation.

*Une modification est considérée comme mineure* si elle apporte des précisions utiles ou pratiques, reformule les propos pour les rendre plus clairs ou plus précis, rectifie des erreurs bénignes. Les caractéristiques de performance de la méthode ainsi améliorée ne sont pas modifiées; elle n'a pas fait l'objet d'une nouvelle validation.

Le tableau ci-dessous récapitule l'historique des versions de la présente méthode.

Version	Nature des modifications	Date	Principales modifications
V 2	Révisions mineures	03/05/2016	Modifications de forme : application du modèle de l'Anses à la méthode ANA-I1.MOA.11 - révision 2 du LNR Santé des abeilles.
V 3	Révisions mineures	08/07/2016	Corrections des concentrations finales § 9.3.2 (PCR $\beta$ -actine).



## Avant-propos

La présente méthode a été développée par :

**Anses - Laboratoire de Sophia - Antipolis**

Laboratoire national de référence sur la santé des abeilles

Laboratoire de référence de l'Union Européenne pour la santé de l'Abeille

Adresse : Les Templiers, 105, route des Chappes, CS 20111 06902 Sophia-Antipolis cedex

Contact : [lnr.abeille@anses.fr](mailto:lnr.abeille@anses.fr)



## Sommaire

Avant-propos.....	3
Introduction .....	5
Avertissements et précautions de sécurité .....	6
1     Objet et domaine d'application .....	7
2     Documents de référence.....	7
3     Termes, sigles et définitions .....	7
4     Principe de la méthode .....	7
5     Réactifs .....	8
5.1   Eau .....	8
5.2   Tampon phosphate.....	8
5.3   10X TAE Buffer.....	8
5.4   Kit d'amplification pour PCR conventionnelle .....	8
5.5   Témoin positif de processus .....	9
5.6   Témoin négatif de processus .....	9
5.7   Témoin positif de PCR .....	9
5.8   Témoin négatif de PCR .....	9
6     Appareillage et matériels .....	9
6.1   Petit équipement de laboratoire .....	9
6.2   Thermocycleurs pour PCR conventionnelles.....	10
6.3   Matériel de laboratoire (stériles, exempts de nucléase).....	10
7     Échantillons.....	10
7.1   Conditions d'acceptation des échantillons .....	10
7.2   Conservation des échantillons avant analyse.....	10
8     Mode opératoire .....	10
8.1   Préparation des échantillons pour analyse .....	10
8.2   Extraction de l'ADN génomique du parasite.....	10
8.3   Amplification de l'ADN cible et analyse des produits de PCR.....	11
8.3.1. Préparation et distribution du mélange réactionnel PCR (Mix PCR) .....	11
8.3.2. Préparation des mélanges réactionnels.....	11
8.3.3. Visualisation des fragments PCR générés .....	12
9     Résultats.....	12
9.1   Contrôle de la validité des résultats .....	12
9.2   Cas des résultats négatifs .....	12
9.3   Contrôle de l'inhibition de la réaction par la réalisation d'une « PCR $\beta$ - actine ».....	13
9.3.1 Amorces utilisées .....	13
9.3.2 Préparation et distribution du mélange réactionnel PCR (Mix PCR) .....	13
9.3.3 Préparation des mélanges réactionnels.....	13
9.4   Expression des résultats .....	14
9.4.1 Conclusion analytique et interprétation de la PCR .....	14
9.4.2 Conclusion analytique et interprétation de la recherche de la nosérose .....	14
10    Caractéristiques de performance de la méthode .....	15
Annexe .....	16
Bibliographie.....	17



## Introduction

La nosérose est une pathologie des abeilles adultes entraînant des diarrhées et des affaiblissements de colonies parfois importants. Elle est causée par des parasites de la famille des microsporidés (*Microsporidae*) : *Nosema*. Il existe deux espèces de *Nosema* à l'origine de troubles chez l'Abeille : *Nosema apis* Zander et *Nosema ceranae*.

*N. apis* est un parasite de l'abeille européenne, *Apis mellifera* ; *N. ceranae* est un parasite de l'abeille asiatique, *Apis cerana*, et d'*A. mellifera*. *N. apis* est ubiquiste. *Nosema ceranae* a été détecté dans différentes populations géographiquement séparées d'*Apis mellifera* en Europe, en Amérique du sud et du Nord et en Asie.

La nosérose à *N. apis* est classée comme danger sanitaire de première catégorie dans la réglementation française. Cette maladie occasionne un affaiblissement de la colonie et une dépopulation hivernale ou printanière plus ou moins sévère, associée parfois à des signes cliniques peu spécifiques : abeilles mortes, abeilles trainantes marchant au sol, traces de diarrhées. Le diagnostic de la maladie pourra être porté au vu des signes cliniques constatés, les abeilles pouvant supporter des taux d'infection élevés sans troubles apparents.

Les effets pathogènes de *N. ceranae* sur les colonies d'*Apis mellifera* ne sont pas pleinement connus. *N. ceranae* serait impliqué dans des phénomènes d'affaiblissement de colonies d'abeilles, en présence d'autres facteurs de stress.

La méthode de recherche des spores de *Nosema* spp. par examen microscopique (cf. Méthode « Recherche de la nosérose : mise en évidence et quantification de *Nosema* spp. par examen microscopique », ANSES/SOP/ANA-I1.MOA.09) appliquée pour le diagnostic de cette maladie ne permet pas l'identification de l'espèce de *Nosema*. Il est donc nécessaire de compléter l'analyse en effectuant le typage par PCR des spores détectées en microscopie.





### **Avertissements et précautions de sécurité**

**Il convient que l'utilisateur de la présente méthode connaisse bien les pratiques courantes de laboratoire. Il incombe à l'utilisateur d'établir des pratiques appropriées en matière d'hygiène et de sécurité, et de s'assurer de la conformité à la réglementation nationale en vigueur.**

**Il est essentiel que les manipulations conduites conformément à la présente méthode soient exécutés par du personnel ayant reçu une formation appropriée.**

**Manipulation et élimination des matériels susceptibles d'être contaminants : le laboratoire doit mettre en œuvre des mesures prenant en compte ces risques pour garantir la non- dissémination de *Nosema* spp. dans l'environnement.**



## 1 Objet et domaine d'application

Cette instruction vise à identifier l'espèce de *Nosema* spp. (*Nosema apis* ou *Nosema ceranae*), suite au diagnostic réalisé par microscopie optique. Ce protocole est basé sur la détection d'une séquence de l'ARNr 16S du parasite, spécifique d'espèces, soit à partir des échantillons préparés selon la méthode OIE, soit directement à partir de broyats d'abeilles.

## 2 Documents de référence

[1] AFNOR, NF EN ISO/CEI 17025. Septembre 2005. Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais.

[2] AFNOR, NF U 47-600 parties 1 et 2. Février 2015. Méthode d'analyse en santé animale – PCR (réaction de polymérisation en chaîne)

## 3 Termes, sigles et définitions

Les termes, sigles et définitions décrits dans la norme française NF U 47-600 partie 1 (AFNOR, 2015) s'appliquent au présent document.

## 4 Principe de la méthode

La technique utilisée est basée sur une PCR duplex décrite par Martin-Hernandez *et al.*, (2007), et reprise dans le manuel OIE (*Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animal, édition 2008. Office International des Epizooties - 12, rue de Prony - 75017 PARIS – France, pp 410 – 414*).

Cependant, des problèmes de mise en évidence de *N. apis* en cas de forte présence de *N. ceranae* ayant été mis en évidence par le LNR Santé des abeilles, la technique est utilisée sous forme de deux PCR monoplexes afin d'éviter la non détection de l'agent *N. apis* dans le cas de co-infection.

Deux couples d'amorces sont utilisés, chaque couple étant spécifique de l'espèce ciblée.

La technique d'identification de l'espèce de *Nosema* par amplification se décompose en 4 étapes :

1. Préparation des échantillons d'abeilles.
2. Extraction de l'ADN génomique du parasite (*Nosema* spp.)
3. Amplification de l'ADN cible et analyse des produits de PCR
4. Interprétation et validation des résultats





## 5 Réactifs

**Avertissement :** Des appellations commerciales ou fournisseurs peuvent être mentionnés dans le descriptif des produits nécessaires à la mise en œuvre de la présente méthode. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs de la méthode et ne signifie nullement que l'Anses recommande l'emploi exclusif de ces produits. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

### 5.1 Eau

Eau de qualité biologie moléculaire exempte de nucléase.

### 5.2 Tampon phosphate

Tampon phosphate 0,01 M pH 7,0.

### 5.3 10X TAE Buffer

Kit de purification des ADN.

Cette méthode a été caractérisée et validée avec le kit High Pure PCR template preparation (Roche Diagnostics).

### 5.4 Kit d'amplification pour PCR conventionnelle

Cette méthode a été caractérisée et validée avec la Taq polymérase Platinum (Invitrogen), ainsi que les dNTP et MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen).

10X PCR Buffer, Minus Mg (200mM Tris-HCL pH 8.4, 500 mM KCL)	Invitrogen
MgCl <sub>2</sub> , 50mM	Invitrogen
dNTP 10mM mix	Invitrogen
Platinum Taq DNA Polymerase 5u/μl	Invitrogen

Les amorces spécifiques pour le typage de *N. apis* et *N. ceranae*, en solution de travail à 20 μM, sont conservées à environ -18°C. Les séquences des amorces sont décrites dans le tableau ci-dessous :

Amorce	Séquence <sup>a</sup>	Taille Produit de PCR (pb)	Spécificité
218 MITOC FOR	5'- <u>CGGCGACGATGTGATATGAAAATATTAA</u> -3'	218–219 <sup>b</sup>	<i>N. ceranae</i>
218 MITOC REV	5'- <u>CCCGGTCATTCTCAAACAAAAACCG</u> -3'		
321 APIS FOR	5'- <u>GGGGGCATGCTTTGACGTACTATGTA</u> -3'	321	<i>N. apis</i>
321 APIS REV	5'- <u>GGGGGGCGTTTAAAAATGTGAAACA</u> ACTATG-3'		

Selon les références Martin-Hernandez *et al.*, (2007), et Manuel OIE 2008 :

(a) les bases CG ajoutées aux primers sont soulignées.

(b) Il y a une paire de base de différence entre les taille des produits PCR qui dépend des séquences de *N. ceranae* disponible sur la banque de données GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).



### 5.5 Témoin positif de processus

Le témoin positif de processus permet de contrôler l'efficacité de l'extraction et de la PCR. Deux témoins d'extraction positifs sont nécessaires :

- Une suspension de spores de *N. ceranae* obtenue à partir de broyats d'abdomens ajustée à la limite de détection de la méthode multipliée par 10 (10x LD<sub>méthode</sub>). La dilution d'ajustement est réalisée dans un broyat d'abeilles indemnes de *Nosema*.
- Une suspension de spores de *N. apis* obtenue à partir de broyats d'abdomens ajustée à la limite de détection de la méthode multipliée par 10 (10x LD<sub>méthode</sub>). La dilution d'ajustement est réalisée dans un broyat d'abeilles indemnes de *Nosema*.

### 5.6 Témoin négatif de processus

Le tampon d'éluion du kit d'extraction est utilisé comme témoin négatif de processus.

### 5.7 Témoin positif de PCR

Il est nécessaire d'ajouter un témoin positif pour chaque PCR Monoplex :

- PCR *N. apis* : contrôle positif plasmidique *N. apis* dilué à la concentration de la Limite de Détection PCR (LD<sub>PCR</sub>) multipliée par 10.
- PCR *N. ceranae* contrôle positif plasmidique *N. ceranae* dilué à la concentration de la Limite de Détection PCR (LD<sub>PCR</sub>) multipliée par 10.

### 5.8 Témoin négatif de PCR

De l'eau de qualité biomoléculaire est utilisée comme témoin négatif de PCR.

## 6 Appareillage et matériels

**Avertissement :** Des appellations commerciales ou fournisseurs peuvent être mentionnés dans le descriptif des appareils et matériels nécessaires à la mise en œuvre de la présente méthode. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs de la méthode et ne signifie nullement que l'Anses recommande l'emploi exclusif de ces matériels. Des matériels équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

### 6.1 Petit équipement de laboratoire

Micropipettes (0.5-10 µl, 2-20 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl), agitateur de paillasse, centrifugeuse de microtubes, bain sec chauffant.



## 6.2 Thermocycleurs pour PCR conventionnelles

Par exemple : C1000 (Biorad), Nexus (Eppendorf).

## 6.3 Matériel de laboratoire (stériles, exempts de nucléase)

Microtubes de 1,5 et 2 ml et pointes à filtre, microtubes 0,2 ml pour PCR.

## 7 Échantillons

### 7.1 Conditions d'acceptation des échantillons

L'identification des espèces *N. apis* et *N. ceranae* est réalisée sur des échantillons positifs issus du diagnostic réalisé par microscopie optique. Ces échantillons sont constitués de broyats d'abdomen d'abeilles, filtrés et centrifugés. Le culot contenant les spores est remis en suspension et les spores sont dénombrées.

Si le résultat est positif en microscopie, l'échantillon sera transféré pour typage.

### 7.2 Conservation des échantillons avant analyse

Le tube contenant la suspension de spores à typer est conservé :

- En réfrigération à environ + 4 °C si l'analyse est réalisée dans la journée suivant la préparation de la suspension ;
- En congélation à environ – 20 °C si l'analyse est différée.

## 8 Mode opératoire

### 8.1 Préparation des échantillons pour analyse

Les échantillons positifs issus du diagnostic de la nosérose réalisé par microscopie optique sont conservés à la température adéquate (voir § 7.2) en attendant son traitement pour la détermination de l'espèce de *Nosema* par PCR. L'échantillon est donc une suspension d'abdomens de 10 abeilles broyées et filtrée. Cette suspension est à la concentration d'1 abeille / 1 ml.

Après une centrifugation de 6 minutes à 800g, le surnageant est éliminé et le culot est repris avec 1,5 ml d'eau de qualité biologie moléculaire (DNase/RNase free).

### 8.2 Extraction de l'ADN génomique du parasite

La préparation des réactifs du kit et la purification des ADN sont réalisées sous hotte filtrante selon les instructions du fabricant (Kit High Pure PCR template preparation - Version Décembre 2008).

Brièvement, 80µl de suspension à analyser sont utilisés. A l'étape finale, les ADN sont élués avec 200 µl de tampon d'éluion. Les témoins d'extraction positifs et négatifs sont traités de la même manière en parallèle.



### 8.3 Amplification de l'ADN cible et analyse des produits de PCR

#### 8.3.1.Préparation et distribution du mélange réactionnel PCR (Mix PCR)

Deux mix réactionnels (*N. apis* et *N. ceranae*) doivent être préparés en parallèle selon les indications du tableau ci-dessous :

Réactifs	Concentration finale	Volume par réaction Mix <i>N. apis</i> (Volume final : 25 µL)	Volume par réaction Mix <i>N. ceranae</i> (Volume final : 25 µL)
H2O	-	13,8	13,8
Tp Taq Pol 10X	1X	2,5	2,5
MgCl <sub>2</sub> , 50mM	3mM	1,5	1,5
dNTP 10mM mix	400µM	1	1
Amorce 1 <i>N. apis</i> (20 µM)	400nM	0,5	-
Amorce 2 <i>N. apis</i> (20 µM)	400nM	0,5	-
Amorce 1 <i>N. ceranae</i> (20 µM)	400nM	-	0,5
Amorce 2 <i>N. ceranae</i> (20 µM)	400nM	-	0,5
Taq Pol 5U/µl	1U	0,2	0,2
ADN	-	5	5

- Les mix se préparent dans un microtube stérile de 1,5 à 2 mL.
- Les différents composants sont décongelés puis homogénéisés par vortexage.
- Les différents composants sont ajoutés au microtube stérile à l'aide de micropipettes obligatoirement munies de micro-cônes stériles à embout filtre.
- Les deux microtubes contenant les mix sont vortexés avant leur distribution.
- Les mix sont distribués dans les microtubes de PCR à raison de 20 µL par microtube.

#### 8.3.2.Préparation des mélanges réactionnels

Les échantillons et témoins sont ajoutés dans une autre pièce à raison de 5 µl chacun :

- ADN des témoins positifs de processus (*N. apis* et *N. ceranae*),
- ADN du témoin négatif de processus,
- ADN des échantillons à analyser,
- Témoin négatif de PCR (eau),
- Témoins positifs de PCR (plasmide à 10xLD<sub>PCR</sub>).

Les tubes sont centrifugés brièvement, puis sont placés dans le bloc du thermocycleur.

Le programme suivant est lancé :

- |                                 |  |
|---------------------------------|--|
| • Dénaturation de l'ADN         | 94°C pendant 2 minutes   |
| • Amplification (35 cycles)     | 94°C pendant 30 secondes<br>62°C pendant 30 secondes<br>72°C pendant 30 secondes |
| • Elongation finale             | 72°C pendant 7 minutes   |
| • Conservation des échantillons | 10°C   |



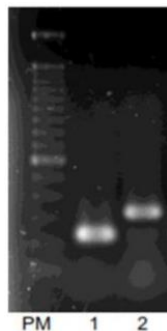


### 8.3.3. Visualisation des fragments PCR générés

L'analyse des produits de PCR est réalisée en salle post-PCR. La visualisation des fragments se réalise après la séparation par électrophorèse dans un gel d'agarose de 1,2% suivi d'une coloration à l'aide d'un agent spécifique de l'ADN (exemple bromure d'éthidium).

Dans le cadre de ces deux PCR monoplex d'identification de l'espèce de *Nosema*, l'interprétation des résultats est basée sur la détection d'ADN cible des deux espèces (*N. apis* et *N. ceranae*) suivant la taille des produits de PCR générés. Dans le cas d'un échantillon typé *N. apis*, la taille du produit de PCR généré sera de 321 paires de bases. Dans le cas d'un échantillon typé *N. ceranae*, la taille du produit de PCR généré sera de 218 paires de bases (ou 219 paires de bases suivant la séquence).

Puit 1 : *N. ceranae* 218pb                      Puit 2 : *N. apis* 321pb  
PM : Marqueur de taille moléculaire 100bp



## 9 Résultats

### 9.1 Contrôle de la validité des résultats

Un résultat d'identification de l'espèce de *Nosema* par PCR n'est considéré comme validé que si :

- Les témoins positifs d'extraction et de PCR sont bien positifs,
- Les témoins négatifs d'extraction et de PCR sont bien négatifs.

### 9.2 Cas des résultats négatifs

En cas de résultat négatif de l'identification pour les deux agents sur un même échantillon dans lequel des spores de *Nosema* ont été visualisées, il est nécessaire de s'assurer de l'absence d'inhibiteur de PCR dans l'extrait qui pourrait conduire à un résultat « faussement négatif ». Une PCR  $\beta$ -actine (voir protocole §9.3) est donc réalisée afin de mettre en évidence la présence du gène de la  $\beta$ -Actine spécifique de l'espèce *Apis mellifera*, correspondant à un témoin positif endogène non cible.



### 9.3 Contrôle de l'inhibition de la réaction par la réalisation d'une « PCR $\beta$ - actine »

#### 9.3.1 Amorces utilisées

Amorce	Séquence	Taille Produit de PCR (pb)	Spécificité
A.m-actin-L	5'-AGGAATGGAAGCTTGCGGTA-3'	181	$\beta$ - actine, <i>Apis mellifera</i>
A.m-actin-R	5'-AATTTTCATGGTGGATGGTGC-3'		

#### 9.3.2 Préparation et distribution du mélange réactionnel PCR (Mix PCR)

Le mix réactionnel est réalisé selon les indications du tableau ci-après :

Réactifs	Concentration finale	Volume par réaction (volume final : 25 $\mu$ L)
H2O	-	17,55
Tp Taq Pol 10X	1X	2,5
MgCl <sub>2</sub> , 50mM	1,5mM	0,75
dNTP 10mM mix	200 $\mu$ M	0,5
Amorce 1 (20 $\mu$ M)	400nM	0,5
Amorce 2 (20 $\mu$ M)	400nM	0,5
Taq Pol 5U/ $\mu$ l	1U	0,2
ADN	-	2,5

Les mix sont distribués dans les microtubes de PCR à raison de 22,5  $\mu$ L par microtube.

#### 9.3.3 Préparation des mélanges réactionnels

Les échantillons et témoins sont ajoutés dans une autre pièce à raison de 2,5  $\mu$ l chacun :

- ADN des témoins positifs de processus (*N.apis* et *N.ceranae*),
- ADN du témoin négatif de processus,
- ADN des échantillons à analyser,
- Témoin négatif PCR (eau),
- Témoins positifs PCR (plasmide O6 à 10xLD<sub>PCR</sub>).

Les tubes sont centrifugés brièvement, puis sont placés dans le bloc du thermocycleur.

Le programme suivant est lancé :

- Dénaturation de l'ADN 94°C pendant 2 minutes
- Amplification (30 cycles) 94°C pendant 30 secondes  
60°C pendant 30 secondes  
72°C pendant 15 secondes
- Elongation finale 72°C pendant 5 minutes
- Conservation des échantillons 10°C



Si la présence du gène de la  $\beta$ -actine est confirmée, le résultat négatif de l'échantillon analysé est confirmé. Dans le cas contraire, il faut refaire les PCR en diluant l'échantillon ou ré-extraire l'échantillon en question.

## 9.4 Expression des résultats

### 9.4.1 Conclusion analytique et interprétation de la PCR

Résultat de la PCR <i>N. apis</i>	Résultat de la PCR <i>N. ceranae</i>	Résultat de la PCR $\beta$ -actine	Interprétation
Négatif	Négatif	Négatif	Echantillon inhibé, pas d'identification possible
Négatif	Négatif	Positif	Aucune identification de <i>N. apis</i> , ni de <i>N. ceranae</i>
Négatif	Positif	/	Identification de <i>N. ceranae</i> positive, pas d'identification de <i>N. apis</i>
Positif	Négatif	/	Identification de <i>N. apis</i> positive, pas d'identification de <i>N. ceranae</i>
Positif	Positif	/	Identification de <i>N. apis</i> et <i>N. ceranae</i> positive

/ : Non réalisé

**En cas de doute sur l'identification de *Nosema* spp., notamment dans le cas d'une taille d'amplicon anormale, l'amplicon obtenu pourra être séquencé.**

### 9.4.2 Conclusion analytique et interprétation de la recherche de la nosérose

La conclusion analytique, prenant en compte les deux analyses, est portée de la façon suivante :

Résultat de l'examen microscopique ( <i>Nosema</i> spp.)	Identification de l'espèce de <i>Nosema</i> par PCR ( <i>N. apis</i> / <i>N. ceranae</i> )	Conclusion analytique
Non détecté	/	Recherche de la nosérose négative
Détecté	<i>N. apis</i>	Infection par <i>Nosema apis</i>
Détecté	<i>N. ceranae</i>	Infection par <i>Nosema ceranae</i>
Détecté	<i>N. apis</i> et <i>N. ceranae</i>	Infection par <i>Nosema apis</i> et <i>Nosema ceranae</i>
Détecté	/	Infection par <i>Nosema</i> spp.

/ : Non réalisé

Une interprétation du résultat analytique pourra être portée en fonction des informations et des signes cliniques mentionnés dans le commémoratif, du taux d'infection des abeilles et des résultats du typage de *N. apis* et *N. ceranae* par PCR (cf. Méthode « Recherche de la nosérose : mise en évidence et quantification de *Nosema* spp. par examen microscopique », ANSES/SOP/ANA-I1.MOA.09).



## 10 Caractéristiques de performance de la méthode

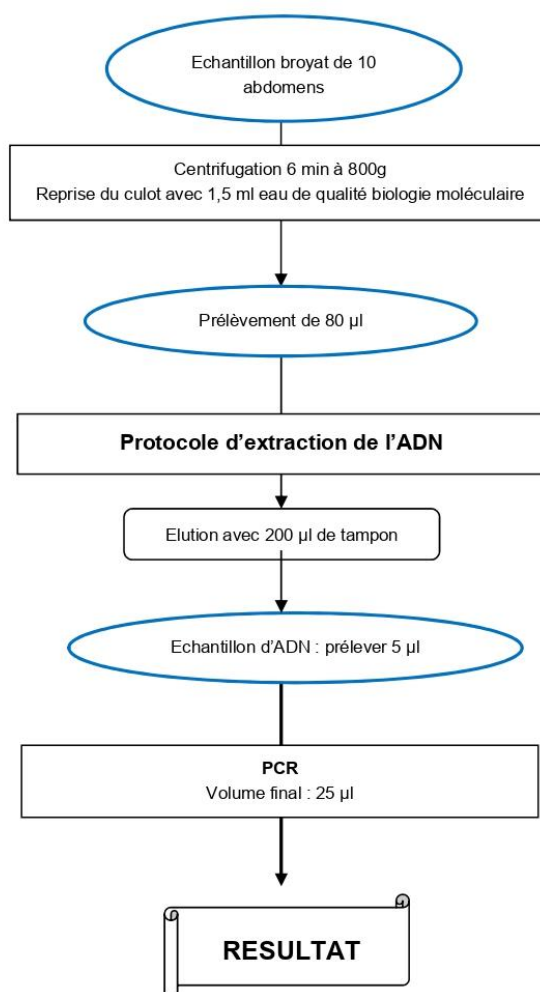
Critères	Critères de validité attendus	Performances observées
<b>Spécificité analytique</b>	100%	100%
<b>Limite de détection PCR</b>	-	* <i>N. apis</i> : 200 copies / réaction * <i>N.ceranae</i> : 1 300 copies / réaction
<b>Limite de détection de la méthode</b>	-	* <i>N. apis</i> : 376 spores / réaction * <i>N.ceranae</i> : 46 spores / réaction
<b>Sensibilité diagnostique</b>	≥ 90%	99%
<b>Spécificité diagnostique</b>	-	Remarque : la méthode PCR étant mise en œuvre uniquement sur les échantillons positifs en microscopie, ce critère n'a pas été évalué.





## Annexe

### Synoptique de la méthode d'identification de l'espèce de *Nosema* par PCR sur broyat d'abdomens





## Bibliographie

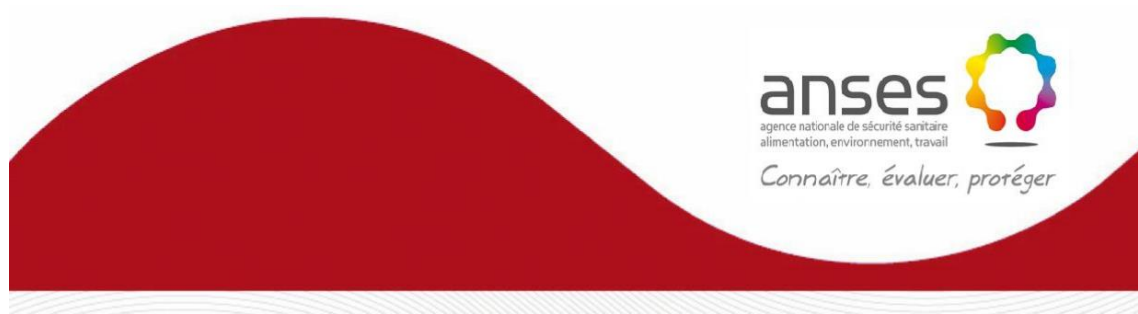
1. Arrêté du 29 juillet 2013 relatif à la définition des dangers sanitaires de première et deuxième catégorie pour les espèces animales.
2. Baker, M. D., Vossbrinck, C. R., Maddox, J. V., & Undeen, A. H., 1994. Phylogenetic relationships among *Vairimorpha* and *Nosema* species (Microspora) based on ribosomal RNA sequence data. *J. Invertebr. Pathol.* 64, 100-106.
3. Bourgeois, A.L., Rinderer, T.E., Beaman, L.D., Danka, R.G., 2010. Genetic detection and quantification of *Nosema apis* and *N. ceranae* in the honey bee. *J. Invertebr. Pathol.* 103, 53-58.
4. Chauzat, M.P., Higes, M., Martin, R., Meana, A. & Faucon, J.P, 2006. *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in France: co-infections in honey bee colonies. *Proceedings of the Second European Conference of Apidology 2006*, 30.
5. Chauzat, M.-P., Blanchard, Ph., Ribière, M., Celle, O., Villier A., 2009. Rapport Afssa : Etude co-financée par le programme apicole communautaire. Lutte contre la varroase et les maladies associée. *Nosema apis* et *Nosema ceranae*, 2 agents pathogènes de l'abeille : mise en place de tests moléculaires discriminants et essais d'infection. Rapport Final, pp 1-19.
6. Chen, Y., Evans, J. D., Smith, I. B., & Pettis, J. S., 2008. *Nosema ceranae* is a long present and wide-spread microsporidian infection of the European honey bee (*Apis mellifera*) in the United States. *J. Invertebr. Pathol.* 97, 186-188.
7. Fries, I., Feng, F., Da Silva, A., Slemenda, S. B., & Pieniasek, N. J., 1996. *Nosema ceranae* (Microspora, Nosematidae). Morphological and molecular characterization of a microsporidian parasite of the asian honey bee *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae). *European Journal of Protistology* 32, 356-365.
8. Fries I., 2010. *Nosema ceranae* in European honey bees (*Apis mellifera*), *J. Invertebr. Pathol.* 103, 73-79.
9. Gatehouse, H. S. & Malone, L. A., 1998. The Ribosomal RNA Gene Region of *Nosema apis* (Microspora): DNA Sequence for Small and Large Subunit rRNA Genes and Evidence of a Large Tandem Repeat Unit Size. *J. Invertebr. Pathol.* 71, 97-105.
10. Higes, M., Martin, R., & Meana, A., 2006. *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe. *J. Invertebr. Pathol.* 92, 93-95.
11. Huang, W. F., Jiang, J. H., Chen, Y. W., & Wang, C. H., 2007. A *Nosema ceranae* isolate from the honeybee *Apis mellifera*. *Apidologie* 38, 30-37.
12. Klee, J., Tek, T. W., & Paxton, R. J., 2006. Specific and sensitive detection of *Nosema bombi* (Microsporidia: Nosematidae) in bumble bees (*Bombus* spp.; Hymenoptera: Apidae) by PCR of partial rRNA gene sequences. *J. Invertebr. Pathol.* 91, 98-104.
13. Klee, J., Besana, A. M., Genersch, E., Gisder, S., Nanetti, A., Tam, D. Q., Chinh, T. X., Puerta, F., Ruz, J. M., Kryger, P., Message, D., Hatjina, F., Korpela, S., Fries, I., &



- Paxton, R. J., 2007. Widespread dispersal of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of the western honey bee, *Apis mellifera*. *J. Invertebr. Pathol.* 96, 1-10.
14. Malone, L. A., Broadwell, A. H., Lindridge, E. T., McIvor, C. A., & Ninham, J. A., 1994. Ribosomal RNA Genes of two microsporidia, *Nosema apis* and *Vavraia oncoperae*, are very variable. *J. Invertebr. Pathol.* 64, 151-152.
  15. Martin-Hernandez, R., Meana, A., Prieto, L., Salvador, A. M., Garrido-Bailon, E., & Higes, M., 2007. The outcome of the colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 6331-6338.
  16. Organisation Mondiale pour la Santé Animale (OIE), 2008. Nosérose des abeilles mellifères. Manuel des tests de diagnostic et des vaccins pour les animaux terrestres. Chapitre 2.2.4, pp. 448-453.
  17. Office Mondiale pour la Santé Animale (OIE), 2010. Principles and Methods of validation of diagnostic assays for infectious diseases. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animal. Chapter 1.1.5.
  18. Ritter, W., 2008. Nosemosis of honey bees. In: O.I.E Standards Commission (Ed.), Manual of standards for Diagnostic Tests and Vaccines. Paris, pp.410-414.
  19. Webster, T. C., Pomper, K. W., Hunt, G., Thacker, E. M., & Jones, S. C., 2004. *Nosema apis* infection in worker and queen *Apis mellifera*. *Apidologie* 35, 49-54.

# Annexe 4 : Identification des loques américaine et européenne par PCR

---



Méthode d'analyse en santé animale

RÉFÉRENCE : ANSES/SOP/ANA-I1.MOA.19 - Version 2

Août 2016

## Identification de *Paenibacillus larvae*, agent de la loque américaine, par PCR

**Anses Sophia Antipolis**

Laboratoire national de référence - Santé des abeilles  
Laboratoire de référence de l'Union Européenne - Santé de l'abeille



Le présent document est, sous sa forme électronique, mis à la disposition des utilisateurs en tant que méthode d'analyse. Ce document est la propriété de l'Anses. Toute reproduction, qu'elle soit totale ou partielle, n'est autorisée qu'à la condition expresse que la source soit citée, par exemple en faisant mention de sa référence (incluant sa version et année) et de son titre.

ANSES/PR3/7/01-04 [version c]



### Historique de la méthode

Une méthode peut être mise à jour afin de prendre en compte des modifications.

*Une modification est considérée comme majeure* dès lors qu'elle concerne des parties clés ou le fond même de la méthode, dont la prise en compte est susceptible d'améliorer significativement la portée ou le résultat de la méthode d'analyse. Une modification majeure induit en général des adaptations importantes. La méthode ainsi modifiée a fait l'objet d'une nouvelle validation.

*Une modification est considérée comme mineure* si elle apporte des précisions utiles ou pratiques, reformule les propos pour les rendre plus clairs ou plus précis, rectifie des erreurs bénignes. Les caractéristiques de performance de la méthode ainsi améliorée ne sont pas modifiées; elle n'a pas fait l'objet d'une nouvelle validation.

Le tableau ci-dessous récapitule l'historique des versions de la présente méthode.

Version	Nature des modifications	Date	Principales modifications
V 2	Révisions mineures	25 juillet 2016	Modifications de forme : application du modèle de l'Anses à la méthode ANA-I1.MOA.19 - révision 2 du LNR Santé des abeilles.



## Avant-propos

La présente méthode a été développée par :

**Anses - Laboratoire de Sophia Antipolis**

Laboratoire National de Référence sur la santé des abeilles

Laboratoire de référence de l'Union Européenne sur la santé de l'abeille

Adresse : Les Templiers, 105 Route des Chappes, CS 20111, 06902 Sophia Antipolis

Contact : [lnr.abeille@anses.f](mailto:lnr.abeille@anses.fr)





## Sommaire

Avant-propos .....	3
Introduction.....	5
Avertissements et précautions de sécurité .....	6
1     Objet et domaine d'application .....	7
2     Documents de référence.....	7
3     Termes, sigles et définitions .....	7
4     Principe de la méthode .....	7
5     Réactifs.....	8
5.1    Eau .....	8
5.2    Kit d'extraction de l'ADN total.....	8
5.3    Désoxyribonucléotides triphosphates .....	8
5.4    Kit d'amplification pour PCR conventionnelle .....	8
5.5    Amorces .....	8
5.6    Témoin positif de processus.....	9
5.7    Témoin négatif de processus.....	9
5.8    Témoin positif de PCR .....	9
5.9    Témoin négatif de PCR .....	9
6     Appareillage et matériels.....	9
6.1    Petit équipement de laboratoire.....	9
6.2    Thermocycleur de PCR pour PCR conventionnelles.....	9
6.3    Matériel de laboratoire (stériles, exempts de nucléase).....	10
7     Échantillons .....	10
7.1    Conditions d'acceptation des échantillons .....	10
7.2    Conservation des échantillons avant analyse.....	10
7.3    Conservation des échantillons reliquats après analyse .....	10
8     Mode opératoire.....	10
8.1    Préparation des échantillons pour analyse .....	10
8.2    Extraction de l'ADN génomique.....	10
8.3    Amplification de l'ADN cible.....	11
8.3.1  Préparation et distribution du mélange réactionnel PCR (Mix PCR) .....	11
8.3.2  Préparation des tubes de réaction de PCR.....	11
8.3.3  Visualisation des fragments PCR générés .....	12
9     Résultats.....	12
9.1    Contrôle de la validité des résultats.....	12
9.2    Cas des résultats négatifs .....	12
9.3    Contrôle de l'inhibition de la réaction par la réalisation d'une « PCR $\beta$ -actine » .....	13
9.3.1  Amorces utilisées .....	13
9.3.2  Préparation et distribution du mélange réactionnel PCR (Mix PCR) .....	13
9.3.3  Préparation des tubes de réaction de PCR.....	13
9.4    Expression des résultats.....	14
9.4.1  Conclusion analytique et interprétation de la PCR.....	14
9.5    Conclusion analytique et interprétation de la recherche de la loque américaine .....	14
10    Caractéristiques de performance de la méthode .....	15
Annexe.....	16
Bibliographie.....	17



## Introduction

La loque américaine affecte les stades larvaires de l'abeille domestique *Apis mellifera*. La maladie est présente dans le monde entier. L'agent causal, *Paenibacillus larvae* (White), est une bactérie qui peut produire plus d'un milliard de spores par larve infectée. Ces spores, extrêmement résistantes à la chaleur et aux agents chimiques, sont le vecteur de la maladie.

La loque américaine est classée danger sanitaire de catégorie 1 dans la réglementation française. Elle est réglementée à l'échelle européenne et fait partie de la liste de l'Organisation Mondiale pour la Santé Animale / Office International des Epizooties (OIE).

Plusieurs techniques sont envisageables pour détecter la maladie ou identifier la bactérie. La mise en évidence de bacilles ou de spores de type *P. larvae* peut être faite par examen microscopique (coloration de Gram). La culture sur milieu gélosé permet de mettre en évidence des colonies dont la morphologie est typique de celle de *P. larvae*. Des tests biochimiques (exemple : catalase) peuvent également aider à l'identification de la bactérie. Enfin, la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) permet l'identification de l'espèce bactérienne.





## Avertissements et précautions de sécurité

Il convient que l'utilisateur de la présente méthode connaisse bien les pratiques courantes de laboratoire. Il incombe à l'utilisateur d'établir des pratiques appropriées en matière d'hygiène et de sécurité, et de s'assurer de la conformité à la réglementation nationale en vigueur.

Il est essentiel que les manipulations conduites conformément à la présente méthode soient exécutées par du personnel ayant reçu une formation appropriée.

Manipulation et élimination des matériels susceptibles d'être contaminants : le laboratoire doit mettre en œuvre des mesures prenant en compte ces risques pour garantir la non-dissémination de *P. larvae* dans l'environnement.



## 1 Objet et domaine d'application

Ce document décrit la méthode officielle d'identification par PCR (réaction de polymérisation en chaîne) de l'agent de la loque américaine, *Paenibacillus larvae*, dans des prélèvements de couvain (larves) présentant les signes cliniques évocateurs de la maladie.

Le diagnostic de la loque américaine est, dans un premier temps, réalisé par examen bactérioscopique après coloration de Gram selon la méthode « Recherche de la loque américaine sur couvain d'abeilles » (ANSES/SOP/ANA-I1.MOA.03). Dans le cas où le résultat de cette analyse est « ininterprétable », l'identification de *P. larvae* est confirmée par PCR.

La méthode décrite est adaptée du Manuel de diagnostic pour les animaux terrestres de l'Office International des Epizootie (OIE), 2014 (Chapitre 2.2.2). Cette méthode a été validée selon la norme NF U47-600.

## 2 Documents de référence

- [1] AFNOR, NF EN ISO/CEI 17025. Septembre 2005. Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais.
- [2] AFNOR, NF U47-600 parties 1 et 2. Février 2015. Méthode d'analyse en santé animale – PCR (réaction de polymérisation en chaîne)
- [3] OIE, 2008. Manuel des tests de diagnostic et des vaccins pour les animaux terrestres, Chapitre 2.2.2, pp. 433-442.

## 3 Termes, sigles et définitions

Les termes, sigles et définitions décrits dans la norme française NF U47-600 partie 1 (AFNOR, 2015) s'appliquent au présent document.

## 4 Principe de la méthode

La PCR présentée est utilisée pour l'identification de l'espèce *P. larvae*, suite à la détection de spores ou de bacilles par microscopie. Les échantillons de larves ont donc été préalablement broyés afin d'obtenir une suspension homogène pour l'extraction des acides nucléiques.

La bactérie est identifiée par amplification de l'ADN de l'ARN ribosomal 16S. L'ADN ciblé est issu de l'ADN génomique (extraction directe). Il est amplifié par PCR grâce à des amorces spécifiques. Cette technique permet d'amplifier *in vitro* une région spécifique d'un acide nucléique donné.

La technique décrite ici est basée sur le protocole de PCR décrit par Dobbelaere *et al.* (2001) et reprise dans le manuel OIE (2008).



L'identification de *P. larvae* par PCR à partir des échantillons de larves d'abeilles se décompose en 3 étapes :

1. Extraction de l'ADN à partir des broyats de larves
2. Amplification par PCR de la séquence cible et analyse des produits de PCR
3. Interprétation et validation des résultats

## 5 Réactifs

**Avertissement :** Des appellations commerciales ou fournisseurs peuvent être mentionnés dans le descriptif des produits nécessaires à la mise en œuvre de la présente méthode. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs de la méthode et ne signifie nullement que l'Anses recommande l'emploi exclusif de ces produits. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

### 5.1 Eau

Eau de qualité biologie moléculaire exempte de nucléase

### 5.2 Kit d'extraction de l'ADN total

High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics)

### 5.3 Désoxyribonucléotides triphosphates

dNTP 10 mM mix – PCR Grade (Invitrogen)

### 5.4 Kit d'amplification pour PCR conventionnelle

Cette méthode a été caractérisée et validée avec la Taq polymérase Platinum (Invitrogen), ainsi que les dNTP et MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen).

Réactif	Concentration	Fournisseur
PCR Buffer, Minus Mg (200 mM Tris-HCl pH 8.4, 500 mM KCl)	10 X	Invitrogen
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	Invitrogen
dNTP mix	10 mM	Invitrogen
Platinum Taq DNA Polymerase	5 U/μl	Invitrogen

### 5.5 Amorces

Les amorces spécifiques de *P. larvae* (AFB 3 et AFB 4), en solution de travail à 20 μM en eau qualité biologie moléculaire, sont conservées à environ -18°C. Les séquences sont décrites dans le Tableau 1.

**Tableau 1 : Séquences des amorces ciblant l'ADN de l'ARN 16S de *P. larvae***

Amorces	Séquence	Taille produit de PCR
AFB 3	5'-CTT GTG TTT CTT TCG GGA GAC GCC A-3'	1096 pb
AFB 4	5'-TCT TAG AGT GCC CAC CTC TGC G-3'	

### 5.6 Témoin positif de processus

Le témoin positif de processus permet de contrôler l'efficacité de l'extraction et de la PCR. Il est constitué d'une suspension de larves naturellement infectées avec des spores de *P. larvae*, diluée à une concentration de 10 fois supérieure à la limite de détection de la méthode. Cette suspension de larves est issue d'un diagnostic de loque américaine dont l'espèce *P. larvae* a été identifiée au préalable et validée par le séquençage des produits de PCR.

### 5.7 Témoin négatif de processus

Le tampon d'éluion du kit d'extraction est utilisé comme témoin négatif de processus.

### 5.8 Témoin positif de PCR

Le témoin positif de PCR est constitué du contrôle positif plasmidique *P. larvae* dilué à la concentration de la Limite de Détection PCR (LD<sub>PCR</sub>) multipliée par 10.

### 5.9 Témoin négatif de PCR

De l'eau de qualité biomoléculaire est utilisée comme témoin négatif de PCR.

## 6 Appareillage et matériels

**Avertissement :** Des appellations commerciales ou fournisseurs peuvent être mentionnés dans le descriptif des appareils et matériels nécessaires à la mise en œuvre de la présente méthode. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs de la méthode et ne signifie nullement que l'Anses recommande l'emploi exclusif de ces matériels. Des matériels équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

### 6.1 Petit équipement de laboratoire

Micropipettes (0.5-10 µl, 2-20 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl), agitateur de paillasse, centrifugeuse(s) de microtubes, incubateur de microtubes, cuve électrophorèse et générateur, table UV avec système d'acquisition des images, thermocycleur.

### 6.2 Thermocycleur de PCR pour PCR conventionnelles

Par exemple : Eppendorf Mastercycler ou Eppendorf Nexus.



### 6.3 Matériel de laboratoire (stériles, exempts de nucléase)

Microtubes de 1,5 et 2 ml et pointes à filtre, microtubes 0,2 ml pour PCR.

## 7 Échantillons

### 7.1 Conditions d'acceptation des échantillons

Le diagnostic de la loque américaine étant, dans un premier temps, réalisé lors d'un examen bactérioscopique (cf. 1 Objet et domaine d'application), la PCR n'est utilisée que pour confirmer l'identification de l'agent bactérien. De ce fait, les conditions d'acceptation des échantillons ne s'appliquent pas à la présente méthode mais à la méthode « Recherche de la loque américaine du couvain d'abeilles ». Les échantillons issus de la recherche de la loque américaine et transférés pour l'identification de l'espèce *P. larvae* sont constitués de broyats de larves infectées.

### 7.2 Conservation des échantillons avant analyse

Le tube contenant l'échantillon issu de la recherche de loque américaine est conservé :

- En réfrigération à environ + 4 °C si l'analyse est réalisée dans la journée suivant la préparation du broyat ;
- En congélation à environ - 20 °C si l'analyse est différée.

### 7.3 Conservation des échantillons reliquats après analyse

Les échantillons (broyages de larves, ADN extraits) peuvent être conservés (sans limite prédéfinie) au congélateur à une température  $\leq -65^{\circ}\text{C}$  à des fins de recherche.

## 8 Mode opératoire

### 8.1 Préparation des échantillons pour analyse

Les larves ont été préalablement broyées afin d'effectuer l'examen bactérioscopique. Il est cependant recommandé de centrifuger rapidement l'échantillon pour culotter les débris en suspension afin de favoriser le pipetage des 80  $\mu\text{l}$  de la suspension de larves.

### 8.2 Extraction de l'ADN génomique

La préparation des réactifs du kit et l'extraction de l'ADN génomique sont réalisées sous hotte filtrante selon les instructions du fabricant (High Pure PCR Template Preparation Kit - Roche Diagnostics – version décembre 2008).

Brièvement, 80  $\mu\text{l}$  de broyat à analyser sont utilisés. A l'étape finale, les ADN sont élués avec 200  $\mu\text{l}$  de tampon d'éluion. Les témoins processus positifs et négatifs sont traités de la même manière en parallèle.





### 8.3 Amplification de l'ADN cible

#### 8.3.1 Préparation et distribution du mélange réactionnel PCR (Mix PCR)

Préparer le mélange réactionnel selon les indications du Tableau 3.  
Vortexer brièvement et centrifuger le mélange.

Tableau 3 : Préparation du mélange réactionnel PCR (Mix PCR)

	Réactifs	Concentration initiale	Concentration finale	Volume par réaction (Volume final: 25,0 µl)
Mix PCR	H <sub>2</sub> O	-	-	13,8
	Tampon Taq Pol	10 X	1 X	2,5
	MgCl <sub>2</sub>	50 mM	3 mM	1,5
	dNTP	10 mM	400 µM	1
	Amorce AFB 3	20 µM	400 nM	0,5
	Amorce AFB 4	20 µM	400 nM	0,5
	Taq Pol	5 U/µl	1 U / 25 µl	0,2
ADN	-	-	-	5

- Les mix se préparent dans un microtube stérile de 1,5 à 2 mL.
- Les différents composants sont décongelés puis homogénéisés par vortexage.
- Les différents composants sont ajoutés au microtube stérile à l'aide de micropipettes obligatoirement munies de micro-cônes stériles à embout filtre.
- Les deux microtubes contenant les mix sont vortexés avant leur distribution.
- Les mix sont distribués dans les microtubes de PCR à raison de 20 µl par microtube.

#### 8.3.2 Préparation des tubes de réaction de PCR

Compléter les tubes de réaction de PCR en ajoutant dans le tube correspondant :

20 µl de mix PCR + 5 µl d'ADN du témoin positif de processus, ou  
5 µl du témoin négatif de processus, ou  
5 µl du témoin positif de PCR, ou  
5 µl du témoin négatif de PCR, ou  
5 µl d'ADN d'échantillon à analyser.

Les tubes sont centrifugés brièvement, puis sont placés dans le bloc du thermocycleur. Le programme suivant est lancé (Tableau 6).

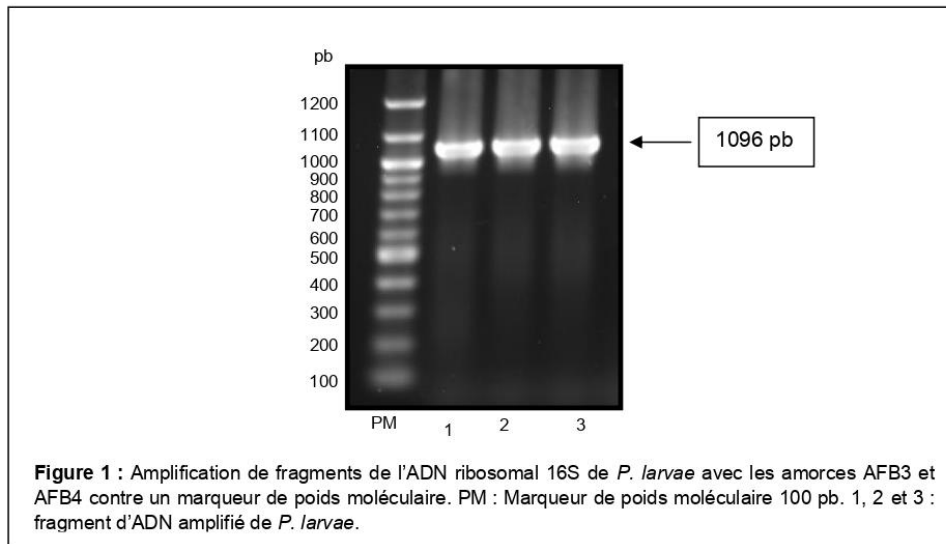
Tableau 6 : Conditions d'amplification

Dénaturation de l'ADN		94°C	2 min
PCR (30 cycles)	Dénaturation	94°C	30 sec
	Hybridation des amorces	55°C	30 sec
	Elongation	72°C	1 min
Elongation finale		72°C	5 min
Conservation des échantillons		10°C	



### 8.3.3 Visualisation des fragments PCR générés

L'analyse des produits de PCR est réalisée en salle post-PCR. La visualisation des fragments se réalise après la séparation par électrophorèse dans un gel d'agarose de 1 % suivi d'une coloration à l'aide d'un agent spécifique de l'ADN (exemple bromure d'éthidium).



## 9 Résultats

### 9.1 Contrôle de la validité des résultats

Un résultat d'identification de *P. larvae* par PCR n'est considéré comme validé que si :

- les témoins positifs de processus et de PCR sont positifs,
- les témoins négatifs de processus et de PCR sont négatifs.

### 9.2 Cas des résultats négatifs

En cas de résultat négatif de l'identification, il est nécessaire de s'assurer de l'absence d'inhibiteur de PCR dans l'extrait analysé qui pourrait conduire à un résultat « faussement négatif ». Une PCR pour l'amplification de la  $\beta$ -actine est alors réalisée afin de mettre en évidence la présence de ce gène spécifique de l'espèce *Apis mellifera*, correspondant à un témoin positif endogène non cible (cf. protocole « Contrôle de la présence du gène de la  $\beta$ -actine sur des échantillons d'abeille par PCR »).



### 9.3 Contrôle de l'inhibition de la réaction par la réalisation d'une « PCR $\beta$ -actine »

#### 9.3.1 Amorces utilisées

Tableau 7 : Séquences des amorces ciblant l'ADN de la  $\beta$ -actine d'*Apis mellifera*

Amorces	Séquence	Taille produit de PCR
A.m-actin-L	5'-AGGAATGGAAGCTTGCGGTA-3	181 pb
A.m-actin-R	5'-AATTTTCATGGTGGATGGTGC-3'	

#### 9.3.2 Préparation et distribution du mélange réactionnel PCR (Mix PCR)

Le mix réactionnel est réalisé selon les indications du Tableau 8 :

Tableau 8 : Préparation du mélange réactionnel PCR (Mix PCR) pour l'amplification de la  $\beta$ -actine

	Réactifs	Concentration initiale	Concentration finale	Volume par réaction (Volume final: 25,0 $\mu$ l)
Mix PCR	H <sub>2</sub> O	-	-	17,55
	Tampon Taq Pol	10 X	1 X	2,5
	MgCl <sub>2</sub>	50 mM	1,5 mM	0,75
	dNTP	10 mM	200 $\mu$ M	0,5
	Amorce A.m-actin-L	20 $\mu$ M	400 nM	0,5
	Amorce A.m-actin-R	20 $\mu$ M	400 nM	0,5
	Taq Pol	5 U/ $\mu$ l	1 U / 25 $\mu$ l	0,2
ADN	-	-	-	2,5

Les mix sont distribués dans les microtubes de PCR à raison de 22,5  $\mu$ l par microtube.

#### 9.3.3 Préparation des tubes de réaction de PCR

Compléter les tubes de réaction de PCR en ajoutant dans le tube correspondant :

22,5  $\mu$ l de mix PCR + 2,5  $\mu$ l d'ADN du témoin positif de processus, ou  
 2,5  $\mu$ l du témoin négatif de processus, ou  
 2,5  $\mu$ l du témoin positif de PCR, ou  
 2,5  $\mu$ l du témoin négatif de PCR, ou  
 2,5  $\mu$ l d'ADN d'échantillon à analyser.

Les tubes sont centrifugés brièvement, puis sont placés dans le bloc du thermocycleur. Le programme suivant est lancé (Tableau 9).





Tableau 9 : Conditions d'amplification

Dénaturation de l'ADN		94°C	2 min
PCR (30 cycles)	Dénaturation	94°C	30 sec
	Hybridation des amorces	60°C	30 sec
	Elongation	72°C	15 sec
Elongation finale		72°C	5 min
Conservation des échantillons		10°C	

- Si la présence du gène de la  $\beta$ -actine est confirmée, le résultat négatif de l'échantillon analysé est confirmé.
- Dans le cas contraire, l'extraction d'ADN doit être effectuée de nouveau pour l'échantillon en question.

#### 9.4 Expression des résultats

##### 9.4.1 Résultats, conclusion analytique et interprétation de la PCR

Résultat de la PCR <i>P. larvae</i>	Résultat de la PCR $\beta$ -actine	Conclusion
Positif	/	Identification de <i>P. larvae</i> positive
Négatif	Positif	Agent pathogène non typé, identification de <i>P. larvae</i> négative
Négatif	Négatif	Echantillon inhibé, pas d'identification possible

/ : Non réalisé

#### 9.5 Conclusion et interprétation du résultat dans le cadre du diagnostic de la loque américaine

La conclusion analytique est portée de la façon suivante :

Résultat de l'examen microscopique	Identification de l'espèce <i>P. larvae</i>	Conclusion analytique
Non détecté	/	Recherche de la loque américaine négative
Détecté	/	Recherche de la loque américaine positive
Ininterprétable	Négative	Recherche de la loque américaine négative
Ininterprétable	Positive	<i>P. larvae</i> , agent de la loque américaine, détecté

/ : Non réalisé



Une interprétation pourra être portée en fonction des lésions observées lors de l'examen du couvain au laboratoire (et/ou des signes cliniques mentionnés dans le commémoratif) et des résultats de l'examen bactérioscopique et de la PCR (cf. Méthode « Recherche de la loque américaine du couvain d'abeille », ANSES/SOP/ANA-I1.MOA.03).

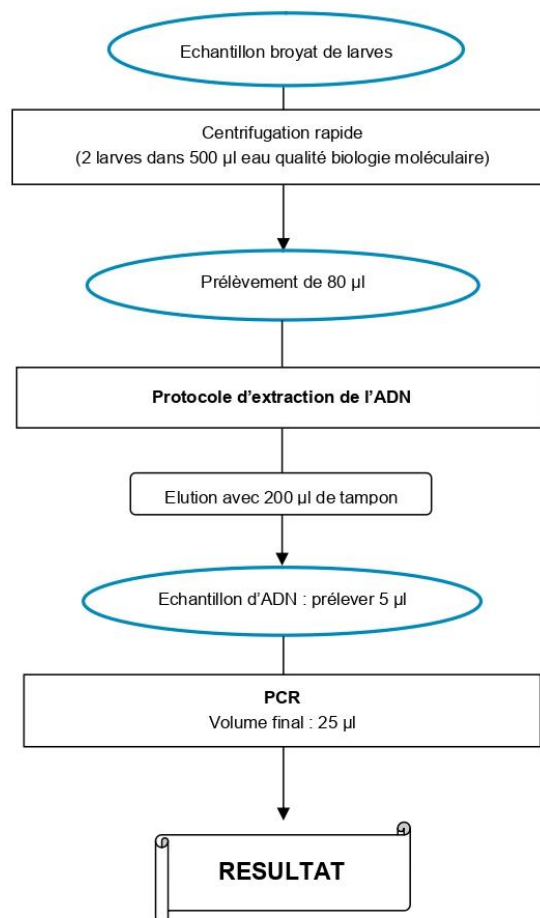
## 10 Caractéristiques de performance de la méthode

Critères	Critères de validité attendus	Performances observées
Spécificité analytique	100 %	100 %
Limite de détection PCR	-	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ERIC I : 74 copies/réaction</li> <li>• ERIC II : 60 copies/réaction</li> <li>• ERIC III : 93 copies/réaction</li> <li>• ERIC IV : 160 copies/réaction</li> </ul>
Limite de détection de la méthode	-	Témoin processus dilué 100 fois
Sensibilité diagnostique	≥ 90 %	100 %
Spécificité diagnostique	-	La méthode PCR étant mise en œuvre uniquement sur les échantillons positifs en microscopie, ce critère n'a pas été évalué.



## Annexe

### Synoptique de la méthode d'identification de *P. larvae* dans un broyat de larves





## Bibliographie

1. Arrêté du 29 juillet 2013 relatif à la définition des dangers sanitaires de première et deuxième catégorie pour les espèces animales.
2. Dobbelaere, W., de Graaf, D.C., Peeters, J.E. and Jacobs, F.J. (2001) Development of a fast and reliable diagnostic method for American foulbrood disease (*Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*) using a 16S rRNA gene based PCR. *Apidologie* 32, 363–370.
3. Organisation Mondiale pour la Santé Animale (OIE), 2008. Loque américaine des abeilles mellifères. Manuel des tests de diagnostic et des vaccins pour les animaux terrestres. Chapitre 2.2.2, pp.

**Méthode d'analyse en santé animale**

**RÉFÉRENCE : ANSES/SOP/ANA-I1.21 - Version 2**

Août 2016

# Identification de *Melissococcus plutonius*, agent de la loque européenne, par PCR

**Anses Sophia Antipolis**

**Laboratoire national de référence - Santé des abeilles**  
**Laboratoire de référence de l'Union Européenne - Santé de l'abeille**



Le présent document est, sous sa forme électronique, mis à la disposition des utilisateurs en tant que méthode d'analyse. Ce document est la propriété de l'Anses. Toute reproduction, qu'elle soit totale ou partielle, n'est autorisée qu'à la condition expresse que la source soit citée, par exemple en faisant mention de sa référence (incluant sa version et année) et de son titre.

ANSES/PR3/7/01-04 [version c]



### Historique de la méthode

Une méthode peut être mise à jour afin de prendre en compte des modifications.

*Une modification est considérée comme majeure* dès lors qu'elle concerne des parties clés ou le fond même de la méthode, dont la prise en compte est susceptible d'améliorer significativement la portée ou le résultat de la méthode d'analyse. Une modification majeure induit en général des adaptations importantes. La méthode ainsi modifiée a fait l'objet d'une nouvelle validation.

*Une modification est considérée comme mineure* si elle apporte des précisions utiles ou pratiques, reformule les propos pour les rendre plus clairs ou plus précis, rectifie des erreurs bénignes. Les caractéristiques de performance de la méthode ainsi améliorée ne sont pas modifiées; elle n'a pas fait l'objet d'une nouvelle validation.

Le tableau ci-dessous récapitule l'historique des versions de la présente méthode.

Version	Nature des modifications	Date	Principales modifications
V 2	Révisions mineures	25 juillet 2016	Modifications de forme : application du modèle de l'Anses à la méthode ANA-I1.MOA.21 - révision 2 du LNR Santé des abeilles.



## Avant-propos

La présente méthode a été développée par :

**Anses - Laboratoire de Sophia Antipolis**

Laboratoire National de Référence sur la santé des abeilles

Laboratoire de référence de l'Union Européenne sur la santé de l'abeille

Adresse : Les Templiers, 105 Route des Chappes, CS 20111, 06902 Sophia Antipolis

Contact : [lnr.abeille@anses.f](mailto:lnr.abeille@anses.fr)





## Sommaire

Avant-propos .....	3
Introduction.....	6
Avertissements et précautions de sécurité .....	7
1     Objet et domaine d'application .....	8
2     Documents de référence.....	8
3     Termes, sigles et définitions .....	8
4     Principe de la méthode .....	8
5     Réactifs.....	9
5.1   Eau .....	9
5.2   Kit d'extraction de l'ADN total.....	9
5.3   Désoxyribonucléotides triphosphates .....	9
5.4   Kit d'amplification pour PCR conventionnelle .....	9
5.5   Amorces .....	9
5.6   Témoin positif de processus.....	10
5.7   Témoin négatif de processus.....	10
5.8   Témoin positif de PCR .....	10
5.9   Témoin négatif de PCR .....	10
6     Appareillage et matériels.....	10
6.1   Petit équipement de laboratoire.....	10
6.2   Thermocycleur de PCR pour PCR conventionnelles.....	10
6.3   Matériel de laboratoire (stériles, exempts de nucléase).....	10
7     Échantillons .....	11
7.1   Conditions d'acceptation des échantillons .....	11
7.2   Conservation des échantillons avant analyse.....	11
7.3   Conservation des échantillons reliquats après analyse .....	11
8     Mode opératoire.....	11
8.1   Préparation des échantillons pour analyse .....	11
8.2   Extraction de l'ADN génomique.....	11
8.3   Amplification de l'ADN cible.....	11
8.3.1  Préparation et distribution du mélange réactionnel PCR (Mix PCR) .....	11
8.3.2  Préparation des tubes de réaction de PCR.....	12
8.3.3  Visualisation des fragments PCR générés .....	12
9     Résultats.....	13
9.1   Contrôle de la validité des résultats.....	13
9.2   Cas des résultats négatifs .....	13
9.3   Contrôle de l'inhibition de la réaction par la réalisation d'une « PCR $\beta$ -actine » .....	14
9.3.1  Amorces utilisées .....	14
9.3.2  Préparation et distribution du mélange réactionnel PCR (Mix PCR) .....	14
9.3.3  Préparation des tubes de réaction de PCR.....	14
9.4   Expression des résultats .....	15
9.4.1  Résultats, conclusion analytique et interprétation de la PCR.....	15
9.5   Conclusion et interprétation dans le cadre du diagnostic de la loque européenne .....	15





---

<b>10</b>	<b>Caractéristiques de performance de la méthode .....</b>	<b>16</b>
	<b>Annexe.....</b>	<b>17</b>
	<b>Bibliographie.....</b>	<b>18</b>



## Introduction

La loque européenne est présente dans le monde entier. Elle affecte les stades larvaires de l'abeille domestique, *Apis mellifera*. Contrairement à ce qui est observé suite à une infection de la loque américaine, les larves meurent un à deux jours avant l'operculation et quelques fois juste après. L'agent étiologique de la maladie est *Melissococcus plutonius*. Des agents peuvent également se multiplier de façon secondaire dans les larves malades comme *Paenibacillus alvei*, *Enterococcus faecalis* et *Achromobacter eurydice*.

La loque européenne fait partie de la liste de l'Organisation Mondiale pour la Santé Animale / Office International des Epizooties (OIE).

Plusieurs techniques sont envisageables pour détecter la maladie ou identifier la bactérie. La mise en évidence de coques de type *M. plutonius* peut être réalisée par examen microscopique (coloration de Gram). La culture sur milieu gélosé permet de mettre en évidence des colonies dont la morphologie est typique de celle de *M. plutonius*. Enfin, l'amplification en chaîne par polymérase (PCR) permet l'identification de l'espèce bactérienne.



## Avertissements et précautions de sécurité

Il convient que l'utilisateur de la présente méthode connaisse bien les pratiques courantes de laboratoire. Il incombe à l'utilisateur d'établir des pratiques appropriées en matière d'hygiène et de sécurité, et de s'assurer de la conformité à la réglementation nationale en vigueur.

Il est essentiel que les manipulations conduites conformément à la présente méthode soient exécutées par du personnel ayant reçu une formation appropriée.

Manipulation et élimination des matériels susceptibles d'être contaminants : le laboratoire doit mettre en œuvre des mesures prenant en compte ces risques pour garantir la non-dissémination de *M. plutonius* dans l'environnement.



## 1 Objet et domaine d'application

Ce document décrit la méthode officielle d'identification par PCR (réaction de polymérisation en chaîne) de l'agent de la loque européenne, *Melissococcus plutonius*, dans des prélèvements de couvain (larves) présentant les signes cliniques caractéristiques de la maladie.

Le diagnostic de la loque européenne est, dans un premier temps, réalisé lors d'un examen bactérioscopique après coloration de Gram selon la méthode « Recherche de la loque européenne sur couvain d'abeilles » (ANSES/SOP/ANA-I1.MOA.01). Puis, l'identification de l'agent est confirmée par PCR.

La méthode décrite est adaptée du Manuel de diagnostic pour les animaux terrestres de l'Office International des Epizootie (OIE), 2008 (Chapitre 2.2.3). Cette méthode a été validée selon la norme NF U47-600.

## 2 Documents de référence

- [1] AFNOR, NF EN ISO/CEI 17025. Septembre 2005. Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais.
- [2] AFNOR, NF U47-600 parties 1 et 2. Février 2015. Méthode d'analyse en santé animale – PCR (réaction de polymérisation en chaîne)
- [3] OIE, 2008. Manuel des tests de diagnostic et des vaccins pour les animaux terrestres, Chapitre 2.2.3, pp. 443-447.

## 3 Termes, sigles et définitions

Les termes, sigles et définitions décrits dans la norme française NF U47-600 partie 1 (AFNOR, 2015) s'appliquent au présent document.

## 4 Principe de la méthode

La PCR présentée est utilisée pour l'identification de l'espèce *M. plutonius*, suite à la détection de coques par microscopie. Les échantillons de larves ont donc été préalablement broyés afin d'obtenir une suspension homogène pour l'extraction des acides nucléiques.

La bactérie est identifiée par amplification de l'ADN de l'ARN ribosomal 16S. L'ADN ciblé est issu de l'ADN génomique (extraction directe). Il est amplifié par PCR grâce à des amorces spécifiques. Cette technique permet d'amplifier *in vitro* une région spécifique d'un acide nucléique donné.

La technique décrite ici est basée sur le protocole de PCR décrit par Govan *et al.* (1998) et reprise dans le manuel OIE (2008).

L'identification de *M. plutonius* par PCR à partir des échantillons de larves d'abeilles se décompose en 3 étapes :

1. Extraction de l'ADN à partir des broyats de larves
2. Amplification par PCR de la séquence cible et analyse des produits de PCR
3. Interprétation et validation des résultats



## 5 Réactifs

**Avertissement :** Des appellations commerciales ou fournisseurs peuvent être mentionnés dans le descriptif des produits nécessaires à la mise en œuvre de la présente méthode. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs de la méthode et ne signifie nullement que l'Anses recommande l'emploi exclusif de ces produits. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

### 5.1 Eau

Eau de qualité biologie moléculaire exempte de nucléase

### 5.2 Kit d'extraction de l'ADN total

High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics)

### 5.3 Désoxyribonucléotides triphosphates

dNTP 10 mM mix – PCR Grade (Invitrogen)

### 5.4 Kit d'amplification pour PCR conventionnelle

Cette méthode a été caractérisée et validée avec la Taq polymérase Platinum (Invitrogen), ainsi que les dNTP et du MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen).

Réactif	Concentration	Fournisseur
PCR Buffer, Minus Mg (200 mM Tris-HCL pH 8.4, 500 mM KCL)	10 X	Invitrogen
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	Invitrogen
dNTP mix	10 mM	Invitrogen
Platinum Taq DNA Polymerase	5 U/μl	Invitrogen

### 5.5 Amorces

Les amorces spécifiques de *M. plutonius* (EFB 1 et EFB 2), en solution de travail à 20 μM en eau qualité biologie moléculaire, sont conservées à environ -18°C. Les séquences sont décrites dans le Tableau 1.

**Tableau 1 : Séquences des amorces ciblant l'ADN de l'ARN 16S de *M. plutonius***

Amorces	Séquence	Taille produit de PCR
EFB 1	5'-GAA GAG GAG TTA AAA GGC GC-3'	832 pb
EFB 2	5'-TTA TCT CTA AGG CGT TCA AAG G-3'	



### 5.6 Témoin positif de processus

Le témoin positif de processus permet de contrôler l'efficacité de l'extraction et de la PCR. Il est constitué d'une suspension de larves naturellement infectées avec des coques de *M. plutonius*, diluée à une concentration de 10 fois supérieure à la limite de détection de la méthode. Cette suspension de larves est issue d'un diagnostic de loque européenne dont l'espèce *M. plutonius* a été identifiée au préalable et validée par le séquençage des produits de PCR.

### 5.7 Témoin négatif de processus

Le tampon d'éluion du kit d'extraction est utilisé comme témoin négatif de processus.

### 5.8 Témoin positif de PCR

Le témoin positif de PCR est constitué du contrôle positif plasmidique *M. plutonius* dilué à la concentration de la Limite de Détection PCR (LD<sub>PCR</sub>) multipliée par 10.

### 5.9 Témoin négatif de PCR

De l'eau de qualité biomoléculaire est utilisée comme témoin négatif de PCR.

## 6 Appareillage et matériels

**Avertissement:** Des appellations commerciales ou fournisseurs peuvent être mentionnés dans le descriptif des appareils et matériels nécessaires à la mise en œuvre de la présente méthode. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs de la méthode et ne signifie nullement que l'Anses recommande l'emploi exclusif de ces matériels. Des matériels équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

### 6.1 Petit équipement de laboratoire

Micropipettes (0.5-10 µl, 2-20 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl), agitateur de paillasse, centrifugeuse(s) de microtubes, incubateur de microtubes, cuve électrophorèse et générateur, table UV avec système d'acquisition des images, thermocycleur.

### 6.2 Thermocycleur de PCR pour PCR conventionnelles

Par exemple : Eppendorf Mastercycler ou Eppendorf Nexus.

### 6.3 Matériel de laboratoire (stériles, exempts de nucléase)

Microtubes de 1,5 et 2 ml et pointes à filtre, microtubes 0,2 ml pour PCR.





## 7 Échantillons

### 7.1 Conditions d'acceptation des échantillons

Le diagnostic de la loque européenne étant, dans un premier temps, réalisé lors d'un examen bactérioscopique (cf. 1 Objet et domaine d'application), la PCR n'est utilisée que pour confirmer l'identification de l'agent bactérien. De ce fait, les conditions d'acceptation des échantillons ne s'appliquent pas à la présente méthode mais à la méthode « Recherche de la loque européenne du couvain d'abeilles ». Les échantillons issus de la recherche de la loque européenne et transférés pour l'identification de l'espèce *M. plutonius* sont constitués de broyats de larves infectées.

### 7.2 Conservation des échantillons avant analyse

Le tube contenant l'échantillon issu de la recherche de loque européenne est conservé :

- En réfrigération à environ + 4 °C si l'analyse est réalisée dans la journée suivant la préparation du broyat ;
- En congélation à environ – 20 °C si l'analyse est différée.

### 7.3 Conservation des échantillons reliquats après analyse

Les échantillons (broyages de larves, ADN extraits) peuvent être conservés (sans limite prédéfinie) au congélateur à une température  $\leq$  à -65°C à des fins de recherche.

## 8 Mode opératoire

### 8.1 Préparation des échantillons pour analyse

Les larves ont été préalablement broyées afin d'effectuer l'examen bactérioscopique. Il est cependant recommandé de centrifuger rapidement l'échantillon pour culotter les débris en suspension afin de favoriser le pipetage des 80  $\mu$ l de la suspension de larves.

### 8.2 Extraction de l'ADN génomique

La préparation des réactifs du kit et l'extraction de l'ADN génomique sont réalisées sous hotte filtrante selon les instructions du fabricant (High Pure PCR Template Preparation Kit - Roche Diagnostics – version décembre 2008).

Brièvement, 80  $\mu$ l de broyat à analyser sont utilisés. A l'étape finale, les ADN sont élués avec 200  $\mu$ l de tampon d'éluion. Les témoins processus positifs et négatifs sont traités de la même manière en parallèle.

### 8.3 Amplification de l'ADN cible

#### 8.3.1 Préparation et distribution du mélange réactionnel PCR (Mix PCR)

Préparer le mélange réactionnel selon les indications du Tableau 3.  
Vortexer brièvement et centrifuger le mélange.



Tableau 3 : Préparation du mélange réactionnel PCR (Mix PCR)

	Réactifs	Concentration initiale	Concentration finale	Volume par réaction (Volume final: 25,0 µl)
Mix PCR	H <sub>2</sub> O	-	-	13,8
	Tampon Taq Pol	10 X	1 X	2,5
	MgCl <sub>2</sub>	50 mM	3 mM	1,5
	dNTP	10 mM	400 µM	1
	Amorce AFB 3	20 µM	400 nM	0,5
	Amorce AFB 4	20 µM	400 nM	0,5
	Taq Pol	5 U/µl	1 U / 25 µl	0,2
ADN	-	-	-	5

- Les mix se préparent dans un microtube stérile de 1,5 à 2 mL.
- Les différents composants sont décongelés puis homogénéisés par vortexage.
- Les différents composants sont ajoutés au microtube stérile à l'aide de micropipettes obligatoirement munies de micro-cônes stériles à embout filtre.
- Les deux microtubes contenant les mix sont vortexés avant leur distribution.
- Les mix sont distribués dans les microtubes de PCR à raison de 20 µL par microtube.

### 8.3.2 Préparation des tubes de réaction de PCR

Compléter les tubes de réaction de PCR en ajoutant dans le tube correspondant :

20 µl de mix PCR + 5 µl d'ADN du témoin positif de processus, ou  
5 µl du témoin négatif de processus, ou  
5 µl du témoin positif de PCR, ou  
5 µl du témoin négatif de PCR, ou  
5 µl d'ADN d'échantillon à analyser.

Les tubes sont centrifugés brièvement, puis sont placés dans le bloc du thermocycleur. Le programme suivant est lancé (Tableau 6).

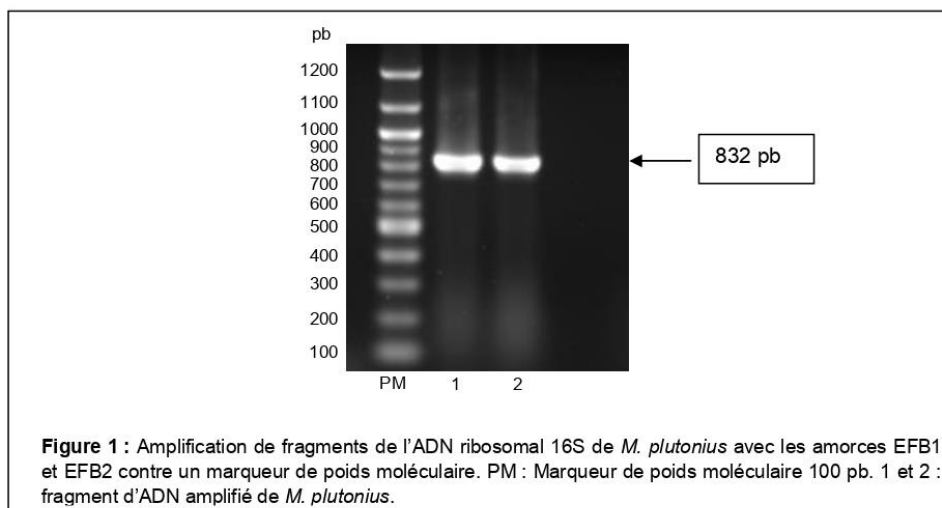
Tableau 6 : Conditions d'amplification

Dénaturation de l'ADN		94°C	2 min
PCR (30 cycles)	Dénaturation	94°C	30 sec
	Hybridation des amorces	55°C	30 sec
	Elongation	72°C	1 min
Elongation finale		72°C	5 min
Conservation des échantillons		10°C	

### 8.3.3 Visualisation des fragments PCR générés

L'analyse des produits de PCR est réalisée en salle post-PCR. La visualisation des fragments se réalise après la séparation par électrophorèse dans un gel d'agarose de 1 % suivi d'une coloration à l'aide d'un agent spécifique de l'ADN (exemple bromure d'éthidium).





## 9 Résultats

### 9.1 Contrôle de la validité des résultats

Un résultat d'identification de *M. plutonius* par PCR n'est considéré comme valide que si :

- les témoins positifs de processus et de PCR sont positifs,
- les témoins négatifs de processus et de PCR sont négatifs.

### 9.2 Cas des résultats négatifs

En cas de résultat négatif de l'identification, il est nécessaire de s'assurer de l'absence d'inhibiteur de PCR dans l'extrait analysé qui pourrait conduire à un résultat « faussement négatif ». Une PCR pour l'amplification de la  $\beta$ -actine est alors réalisée afin de mettre en évidence la présence de ce gène spécifique de l'espèce *Apis mellifera*, correspondant à un témoin positif endogène non cible (cf. protocole « Contrôle de la présence du gène de la  $\beta$ -actine sur des échantillons d'abeille par PCR »).



### 9.3 Contrôle de l'inhibition de la réaction par la réalisation d'une « PCR $\beta$ -actine »

#### 9.3.1 Amorces utilisées

Tableau 7 : Séquences des amorces ciblant l'ADN de la  $\beta$ -actine d'*Apis mellifera*

Amorces	Séquence	Taille produit de PCR
A.m-actin-L	5'-AGGAATGGAAGCTTGCGGTA-3'	181 pb
A.m-actin-R	5'-AATTTTCATGGTGGATGGTGC-3'	

#### 9.3.2 Préparation et distribution du mélange réactionnel PCR (Mix PCR)

Le mix réactionnel est réalisé selon les indications du Tableau 8 :

Tableau 8 : Préparation du mélange réactionnel PCR (Mix PCR) pour l'amplification de la  $\beta$ -actine

	Réactifs	Concentration initiale	Concentration finale	Volume par réaction (Volume final: 25,0 $\mu$ l)
Mix PCR	H <sub>2</sub> O	-	-	17,55
	Tampon Taq Pol	10 X	1 X	2,5
	MgCl <sub>2</sub>	50 mM	1,5 mM	0,75
	dNTP	10 mM	200 $\mu$ M	0,5
	Amorce A.m-actin-L	20 $\mu$ M	400 nM	0,5
	Amorce A.m-actin-R	20 $\mu$ M	400 nM	0,5
	Taq Pol	5 U/ $\mu$ l	1 U / 25 $\mu$ l	0,2
ADN	-	-	-	2,5

Les mix sont distribués dans les microtubes de PCR à raison de 22,5  $\mu$ l par microtube.

#### 9.3.3 Préparation des tubes de réaction de PCR

Compléter les tubes de réaction de PCR en ajoutant dans le tube correspondant :

22,5  $\mu$ l de mix PCR + 2,5  $\mu$ l d'ADN du témoin positif de processus, ou  
2,5  $\mu$ l du témoin négatif de processus, ou  
2,5  $\mu$ l du témoin positif de PCR, ou  
2,5  $\mu$ l du témoin négatif de PCR, ou  
2,5  $\mu$ l d'ADN d'échantillon à analyser.

Les tubes sont centrifugés brièvement, puis sont placés dans le bloc du thermocycleur. Le programme suivant est lancé (Tableau 9).

**Tableau 9 : Conditions d'amplification**

Dénaturation de l'ADN		94°C	2 min
PCR (30 cycles)	Dénaturation	94°C	30 sec
	Hybridation des amorces	60°C	30 sec
	Elongation	72°C	15 sec
Elongation finale		72°C	5 min
Conservation des échantillons		10°C	

- Si la présence du gène de la  $\beta$ -actine est confirmée, le résultat négatif de l'échantillon analysé est confirmé.
- Dans le cas contraire, l'extraction d'ADN doit être effectuée de nouveau pour l'échantillon en question.

## 9.4 Expression des résultats

### 9.4.1 Résultats, conclusion analytique et interprétation de la PCR

Résultat de la PCR <i>M. plutonius</i>	Résultat de la PCR $\beta$ -actine	Conclusion
Positif	/	Identification de <i>M. plutonius</i> positive
Négatif	Positif	Agent pathogène non typé, Identification de <i>M. plutonius</i> négative
Négatif	Négatif	Echantillon inhibé, pas d'identification possible

/ : Non réalisé

## 9.5 Conclusion et interprétation dans le cadre du diagnostic de la loque européenne

La conclusion analytique est portée de la façon suivante :

Résultat de l'examen microscopique	Identification de l'espèce <i>M. plutonius</i>	Conclusion analytique
Non détecté	/	Recherche de la loque européenne négative
Détecté	/	Recherche de la loque européenne positive
Ininterprétable	Négative	Recherche de la loque européenne négative
Ininterprétable	Positive	<i>M. plutonius</i> , agent de la loque européenne, détecté

/ : Non réalisé



Une interprétation pourra être portée en fonction des lésions observées lors de l'examen du couvain au laboratoire (et/ou des signes cliniques mentionnés dans le commémoratif) et des résultats de de l'examen bactérioscopique et de la PCR (cf. Méthode « Recherche de la loque européenne du couvain d'abeille », ANSES/SOP/ANA-I1.MOA.01).

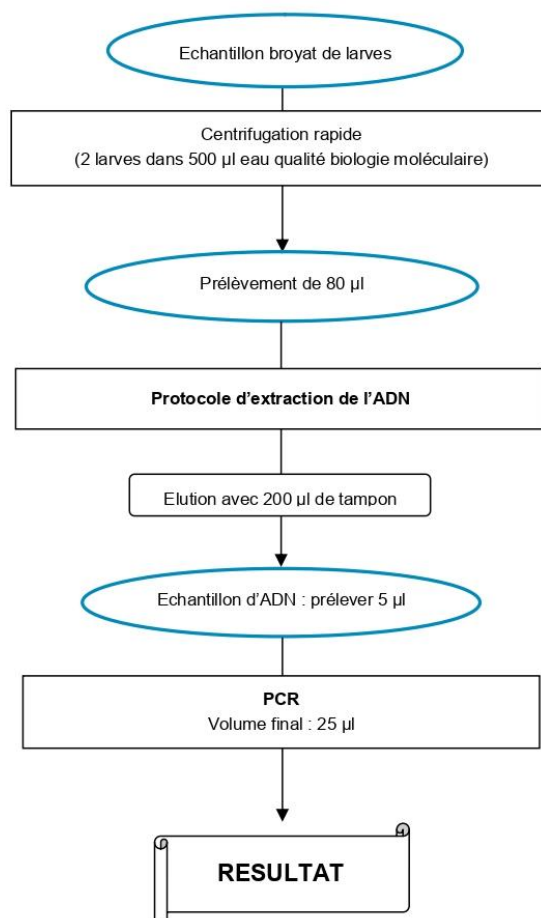
## 10 Caractéristiques de performance de la méthode

Critères	Critères de validité attendus	Performances observées
Spécificité analytique	100 %	100 %
Limite de détection PCR	-	42 copies/réaction
Limite de détection de la méthode	-	Témoin processus dilué 100 fois
Sensibilité diagnostique	≥ 90 %	100 %
Spécificité diagnostique	-	La méthode PCR étant mise en œuvre uniquement sur les échantillons positifs en microscopie, ce critère n'a pas été évalué.



## Annexe

### Synoptique de la méthode d'identification de *M. plutonius* dans un broyat de larves






## Bibliographie

1. Arrêté du 29 juillet 2013 relatif à la définition des dangers sanitaires de première et deuxième catégorie pour les espèces animales.
2. Govan, V.A., Brozel, V., Allsopp, M.H., Davison, S., 1998. A PCR detection method for rapid identification of *Melissococcus pluton* in honeybee larvae. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 1983-1985.
3. Organisation Mondiale pour la Santé Animale (OIE), 2008. Loque européenne des abeilles mellifères. Manuel des tests de diagnostic et des vaccins pour les animaux terrestres. Chapitre 2.2.2, pp. 443-447.

# Annexe 5 : Protocole de contrôle du gène de la $\beta$ -actine par PCR

	INSTRUCTION DE TRAVAIL _ LABORATOIRE DE SOPHIA ANTIPOLIS		
	<i>Mode opératoire d'analyse : MOA</i>		
	1-ABE		
	<b>Contrôle de la présence du gène de la <math>\beta</math> actine sur des échantillons d'abeille par PCR (méthode interne)</b>		
	<i>Codification : ANA-II.MOA.30.</i>	<i>révision : 01</i>	Page 1 / 4


### *Diffusion du document*

<b>Destinataires</b>
<b>Correspondant qualité unité</b>

L'original est conservé par l'unité

**Date de mise en application : 18/01/2011**

*Document ne pouvant être reproduit sans l'accord de l'Anses laboratoire de Sophia Antipolis  
Tél. : 04-92-94-37-00 Fax. : 04-92-94-37-01*


	INSTRUCTION DE TRAVAIL _ <i>LABORATOIRE DE SOPHIA ANTIPOLIS</i>		
	<i>Mode opératoire d'analyse : MOA</i>		
	1-ABE		
	<b>Contrôle de la présence du gène de la <math>\beta</math> actine sur des échantillons d'abeille par PCR (méthode interne)</b>		
	<i>Codification : ANA-II.MOA.30.</i>	<i>révision : 01</i>	Page 2 / 4

## Sommaire

1	OBJET ET DOMAINE D'APPLICATION.....	3
2	RESPONSABILITE.....	3
3	CONTENU.....	3
3.1	Principe .....	3
3.2	Introduction.....	3
3.3	Amplification par PCR et détection des produits PCR.....	3
3.3.1	Points spécifiques .....	4
3.3.2	Programme de PCR : PCRACTIN .....	4
3.4	Interprétation et validation des résultats .....	4

*Document ne pouvant être reproduit sans l'accord de l'Anses laboratoire de Sophia Antipolis  
Tél. : 04-92-94-37-00 Fax. : 04-92-94-37-01*



	INSTRUCTION DE TRAVAIL _ <i>LABORATOIRE DE SOPHIA ANTIPOLIS</i>		
	Mode opératoire d'analyse : MOA		
	1-ABE		
	<b>Contrôle de la présence du gène de la <math>\beta</math> actine sur des échantillons d'abeille par PCR (méthode interne)</b>		
	Codification : ANA-II.MOA.30.	révision : 01	Page 3 / 4

## 1 OBJET ET DOMAINE D'APPLICATION

Cette instruction vise à décrire le contrôle de la présence du gène de la  $\beta$  actine, spécifique de l'espèce *Apis mellifera*, dans des échantillons d'abeilles qui se sont révélés négatifs lors de la recherche de pathogènes. Ce contrôle est réalisé par PCR à partir d'extraits d'ADNs ou à partir d'ADN c obtenu par RT-PCR, il permet ainsi de contrôler l'absence d'inhibiteur de polymérase dans les échantillons testés.

## 2 RESPONSABILITE

Cette instruction est destinée aux personnes habilitées de l'équipe « Virologie et Diagnostics Moléculaires » de l'Unité Pathologie de l'Abeille.

## 3 CONTENU

### 3.1 Principe

La technique utilisée est basée sur le protocole de PCR décrit par Chen et al, (2005). Le couple d'amorces utilisées permet d'amplifier un produit de PCR de 181 pb (AEM, Vol. 71, No. 1, pp 436-441), spécifique de l'espèce *Apis mellifera* (GenBank accession no. AB023025).

### 3.2 Introduction

La détection du gène de la  $\beta$  actine est réalisée à partir des extraits d'ADNs pour les pathogènes de type bactérien (Loques), fongique (Nosema) ou parasitaire (Petit coléoptère de la ruche), ou à partir des extraits d'ADNs pour la recherche des virus de l'abeille. Seuls les échantillons qui se sont révélés négatifs sont contrôlés afin de vérifier la présence du gène de la  $\beta$  actine.


La technique d'amplification se décompose en 3 étapes :

1. Les échantillons sont issus des préparations selon les protocoles dédiés pour la détection des pathogènes de type bactérien (Loques cf. [ANA-II.MOA.19](#) et [ANA-II.MOA.21](#)), fongique (Nosema cf. [ANA-II.MOA.11](#)) ou parasitaire (Petit coléoptère de la ruche cf. [ANA-II.MOA.17](#)), ou à partir des extraits d'ADNs pour la recherche des virus de l'abeille (cf. [ANA-II.MOA.13](#) et [ANA-II.MOA.29](#))
2. Amplification de l'ADN cible et analyse des produits de PCR selon le protocole « [ANA-II.MOP.07](#) ».
3. Interprétation et validation des résultats décrit ici.

### 3.3 Amplification par PCR et détection des produits PCR

Suivre la procédure [ANA-II.MOP.07](#). « Etape d'amplification en chaine, PCR pour la détection et/ ou identification des pathogènes de l'abeille et analyses des produits PCR ».

*Document ne pouvant être reproduit sans l'accord de l'Anses laboratoire de Sophia Antipolis  
Tél. : 04-92-94-37-00 Fax. : 04-92-94-37-01*

	INSTRUCTION DE TRAVAIL _ LABORATOIRE DE SOPHIA ANTIPOLIS		
	Mode opératoire d'analyse : MOA		
	1-ABE		
	<b>Contrôle de la présence du gène de la <math>\beta</math> actine sur des échantillons d'abeille par PCR (méthode interne)</b>		
	Codification : ANA-IL.MOA.30.	révision : 01	Page 4 / 4

### 3.3.1 Points spécifiques

Amorces spécifiques pour la détection de la  $\beta$  actine d'*Apis mellifera*:

Amorce	Séquence	Taille Produit PCR (pb)	Cible
<b>A.m-actin-L</b>	5'-AGGAATGGAAGCTTGCGGTA-3'	181	$\beta$ actine, <i>Apis mellifera</i>
<b>A.m-actin-R</b>	5'-AATTTTCATGGTGGATGGTGC-3'		

- La fiche de travail spécifique « PCR Actin, [ANA-E1.FSA.15](#) » permet d'indiquer le nombre d'échantillons à analyser, leur numérotation, ainsi que la préparation du mélange réactionnel (ajouter au dernier moment la Taq polymérase).
- Le volume d'échantillon utilisé est de 2,5  $\mu$ l cf fiche de travail spécifique « PCR Actin, [ANA-E1.FSA.15](#) »
- Il est nécessaire d'ajouter un témoin positif PCR Actin (Témoin positif plasmidique Actin Clone O6 diluée à la concentration de la Limite de Détection PCR ( $LD_{PCR}$ ) multipliée par 10.
- Le programme de PCR adapté est le programme PCRACTIN .

### 3.3.2 Programme de PCR : PCRACTIN

Les spécificités de ce programme PCRACTIN sont soulignées :

- Dénaturation de l'ADN (94°C pendant 2 minutes)
- 30 cycles comprenant :
  - Dénaturation 94°C pendant 30 secondes
  - Hybridation des amorces à 60°C pendant 30 secondes
  - Elongation à 72°C pendant 15 secondes
- Elongation finale à 72°C pendant 5 minutes
- Conservation des échantillons à 10°C

### 3.4 Interprétation et validation des résultats

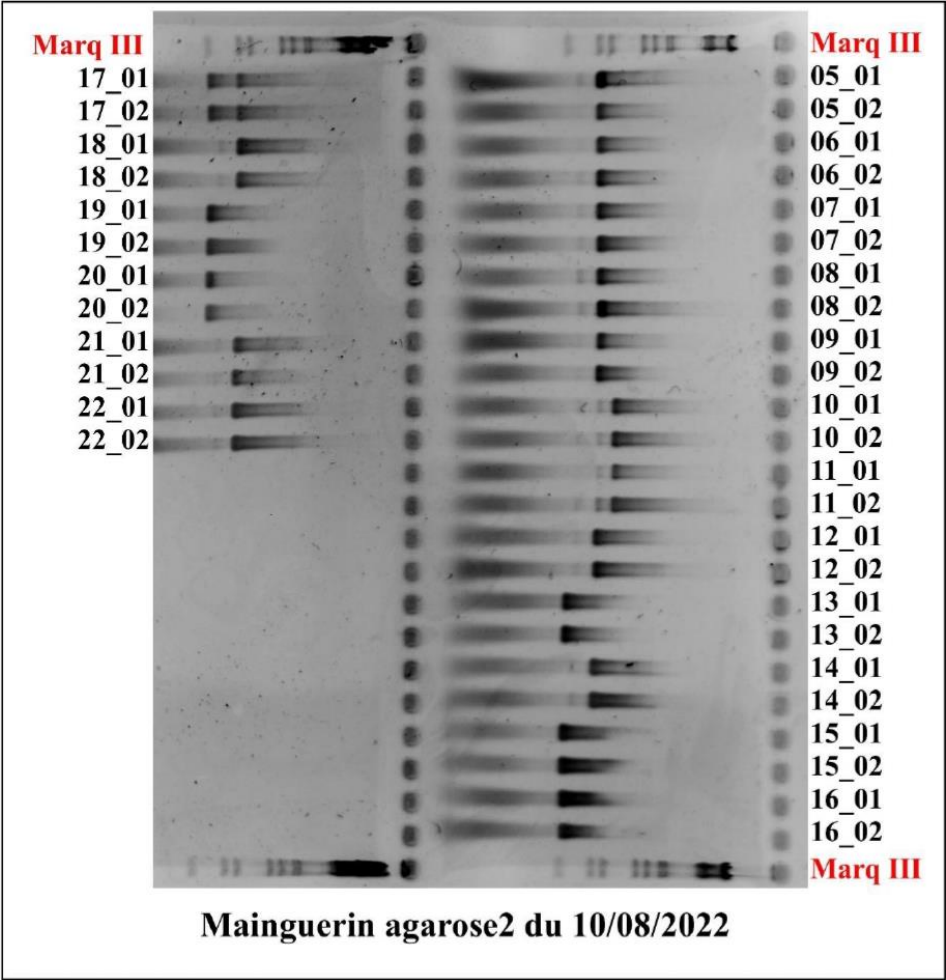
Dans le cadre de cette PCR de contrôle de la présence du gène de la  $\beta$  actine, l'interprétation des résultats est basée sur la présence du produit amplifié de 181 pb.

Un résultat de PCR n'est considéré comme valide que si :

- Les témoins positifs d'extraction et de PCR sont bien positifs,
- Les témoins négatifs d'extraction et de PCR sont bien négatifs.

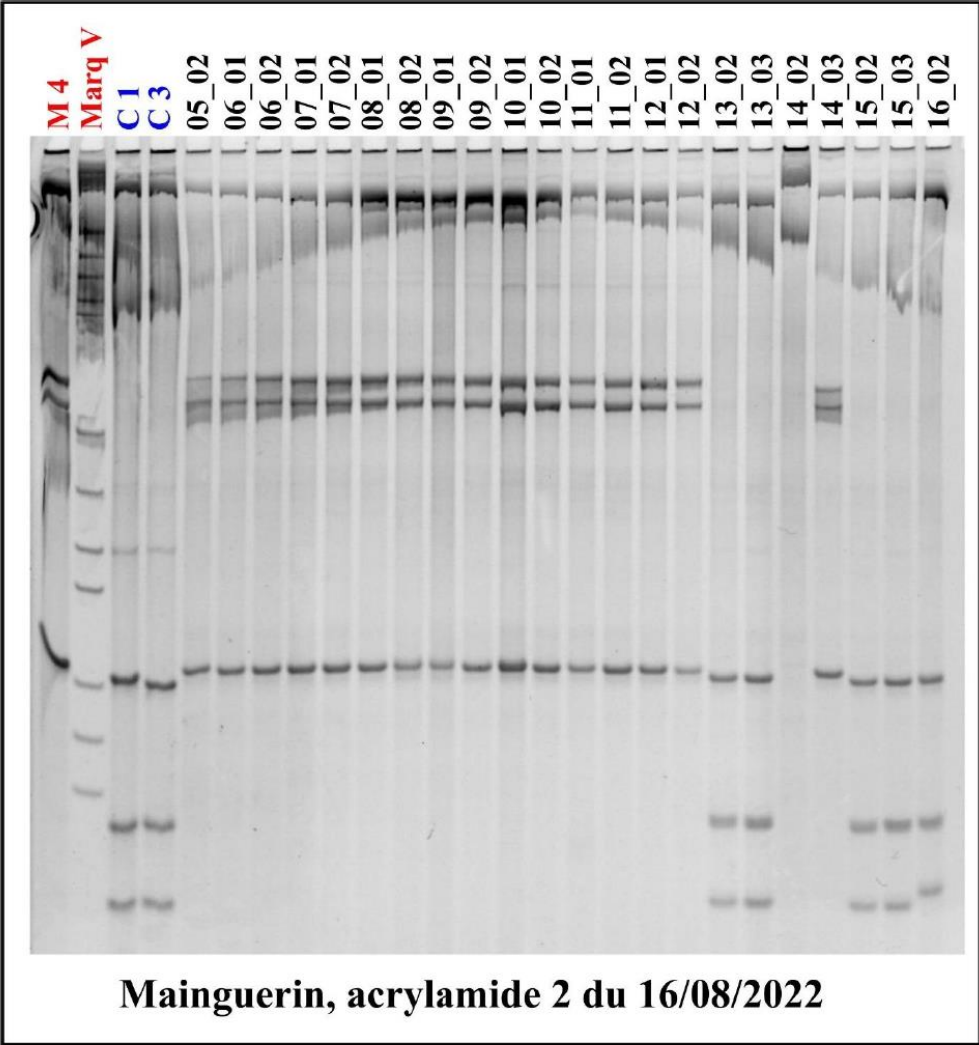
Si la présence du gène de la  $\beta$ -Actine est confirmée, le résultat négatif de l'échantillon analysé pour la recherche de pathogènes (réalisée précédemment et ré analysé simultanément) est confirmé. Dans le cas contraire, il faut refaire l'extraction et/ou la transcription inverse pour l'échantillon en question.

# Annexe 6 : Exemple de gel de migration en agarose des produits de PCR



# Annexe 7 : Exemple de gel de migration en poly-acrylamide, obtenu après digestion du produit de PCR par l'enzyme *DraI*

---



# Annexe 8 : Détail de la composition des lignées de référence

---

## Lignée M (Ouest-Méditerranéenne)

- Pyr-Atl (1992) : *Apis m. mellifera*, Sud-Ouest France (Bayonne), n=39 abeilles
- Landes (1992) : *Apis m. mellifera*, Sud-Ouest France (Sabres), n=45 abeilles
- Nord (1992) : *Apis m. mellifera*, Nord France (Valenciennes), n=54 abeilles
- Saintes (1992) : *Apis m. mellifera*, Ouest France (Valenciennes), n=29 abeilles
- Belgique (1995) : *Apis m. mellifera*, Conservatoire de Chimay (Hainault), n=79 abeilles
- Savoie (1999) : *Apis m. mellifera*, Département de Savoie (Bauges), n=45 abeilles
- Haute Savoie (1994) : *Apis m. mellifera*, Département de Haute-Savoie, n=50 abeilles
- Braga (1994) : *Apis m. iberiensis*, n=24 abeilles

## Lignée C (Nord-Méditerranéenne)

- Slovénie (2005) : *Apis m. carnica*, n=91 abeilles
- Croatie (1998) : *Apis m. carnica*, n=50 abeilles
- N\_Grèce (1992) : *Apis m. macedonica*, N\_Grèce septentrionale (Chalkidiki), n=30 abeilles
- S\_Grèce (2004) : *Apis m. cecropia*, N\_Grèce Péloponèse (Argos), n=49 abeilles
- Italie (1993) : *Apis m. linguistica*, Italie (Forli), n = 30 abeilles

## Lignée O (Orientale)

- Arménie (1993) : *Apis m. armeniaca*, Arménie (Erevan), n=17 abeilles
- Caucase (1999) : *Apis m. caucasica*, Géorgie (Tbilissi), n=23 abeilles
- Turquie 1 (2004) : *Apis m. anatoliaca*, Turquie (Mugla), n=48 abeilles
- Turquie 2 (2004) : *Apis m. anatoliaca*, Turquie (Tcanadolu), n=48 abeilles

## Lignée A (Africaine)

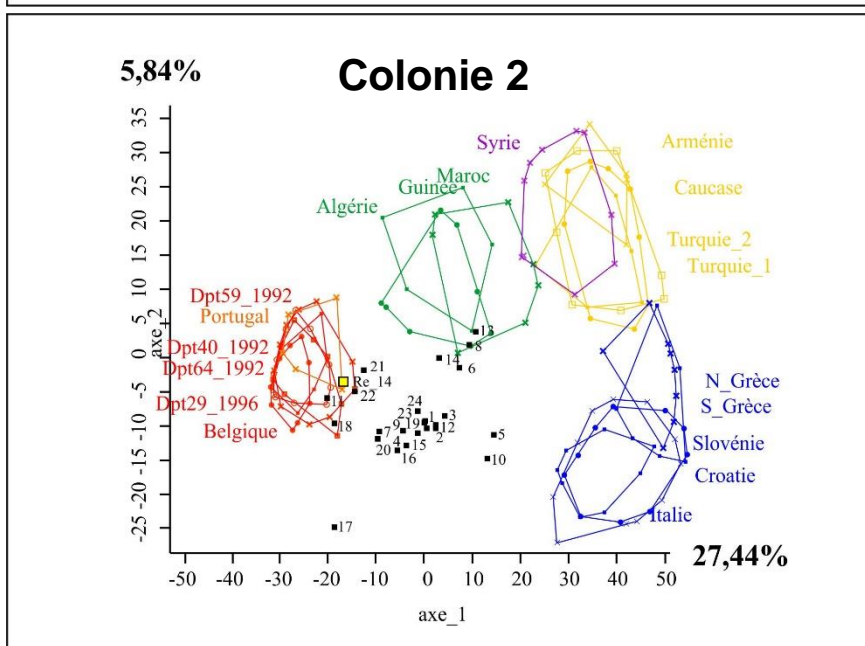
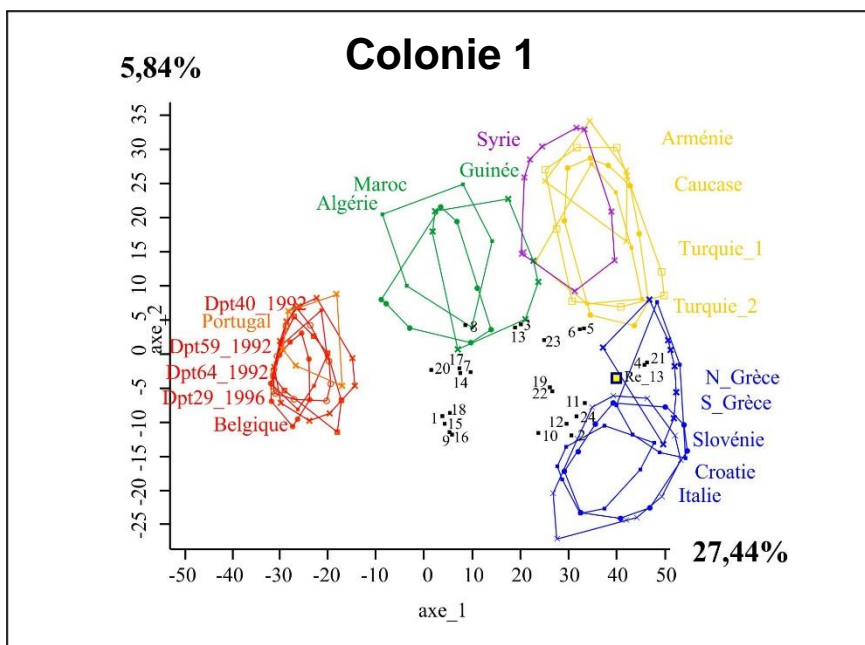
- Maroc (1992) : *A.m.major*, Maroc (Al Hoceima), n = 28 abeilles
- Algérie (2004) : *A.m.intermissa*, Algérie (Annaba), n = 31 abeilles
- Guinée (1992) : *A.m.adansoni*, Guinée (Mont Nimba), n = 22 abeilles

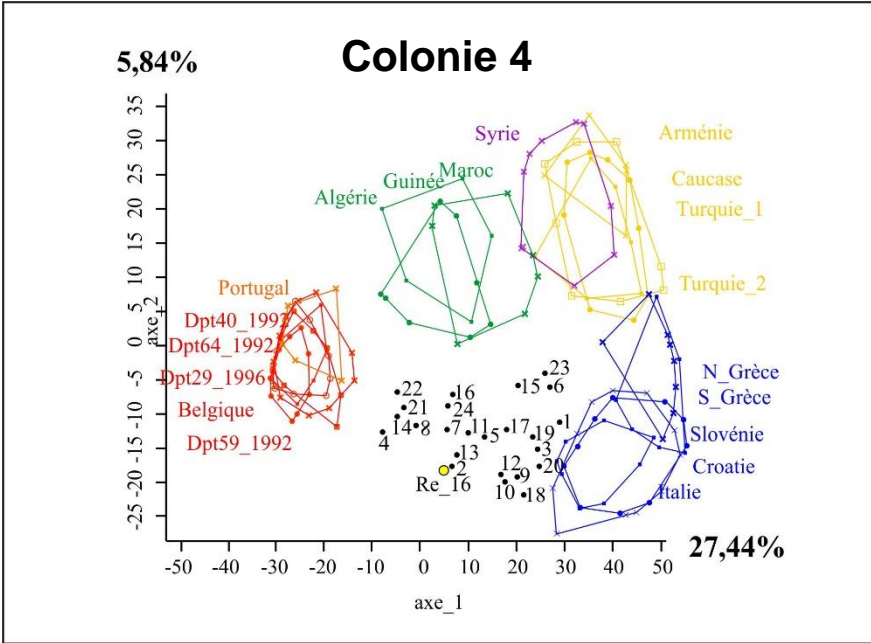
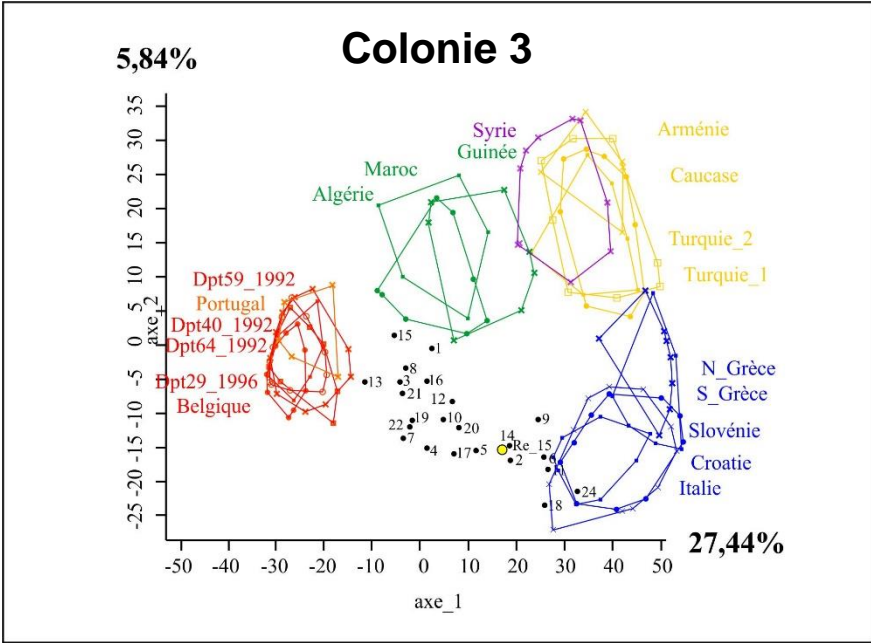
## Lignée Z (Proche-Orient)

- Syrie : *Apis m. syriaca*, n=96 abeilles.

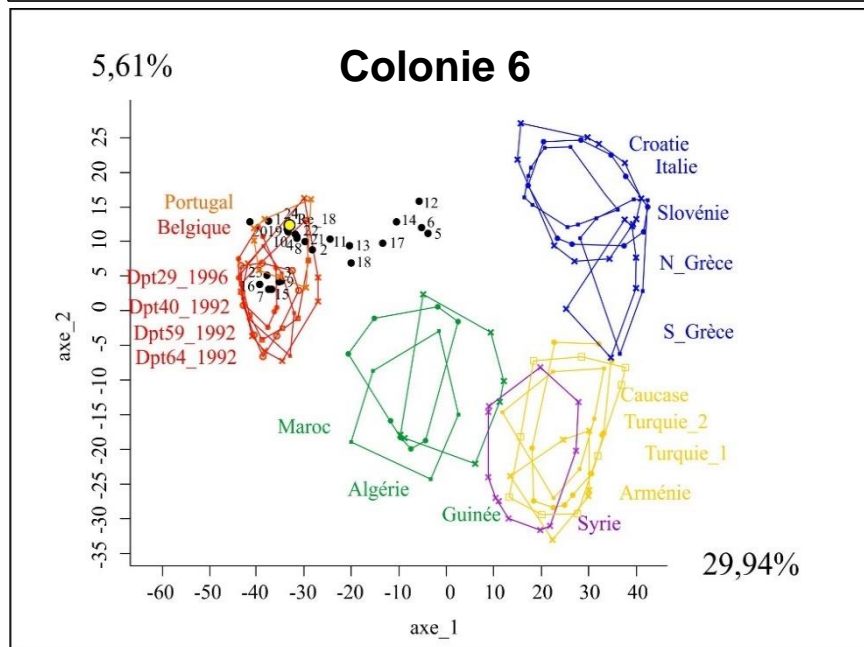
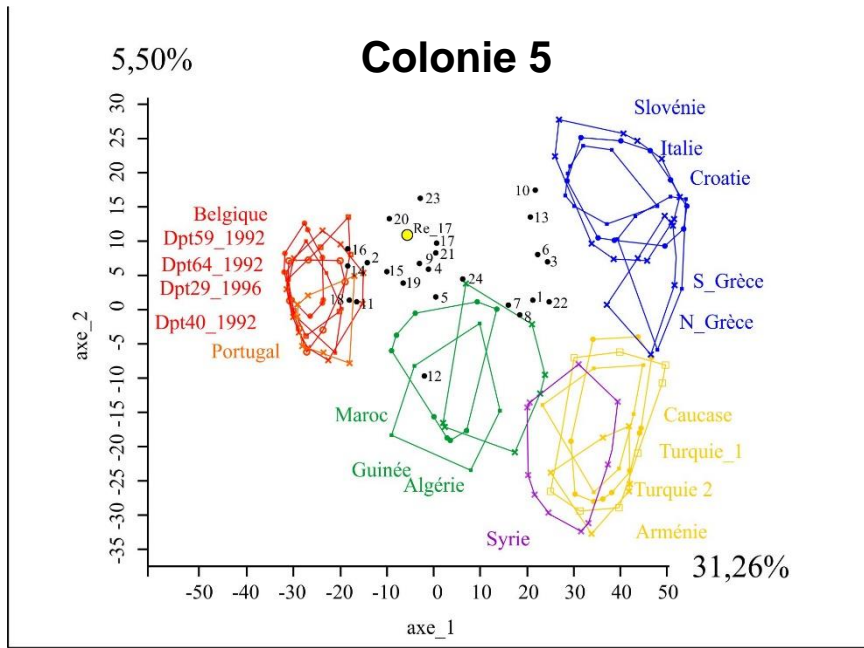


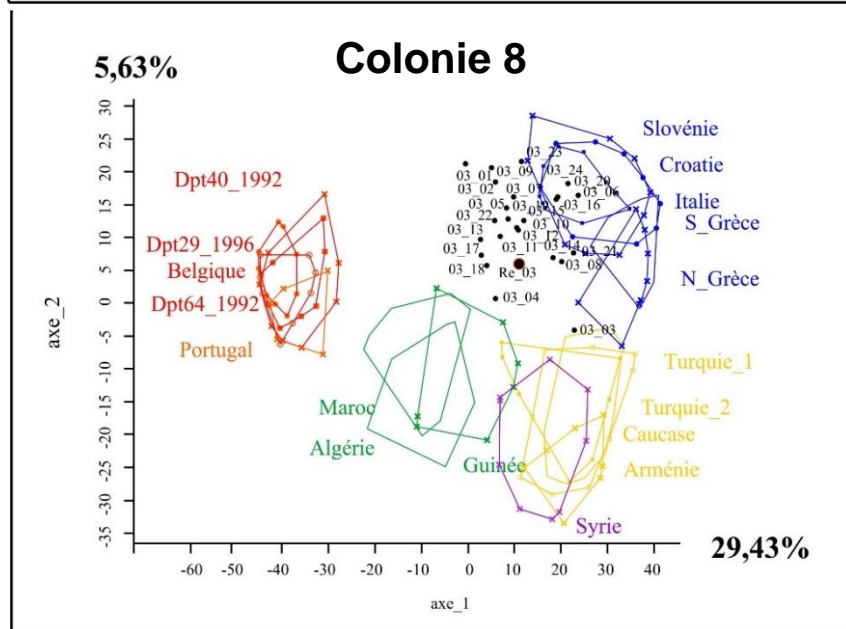
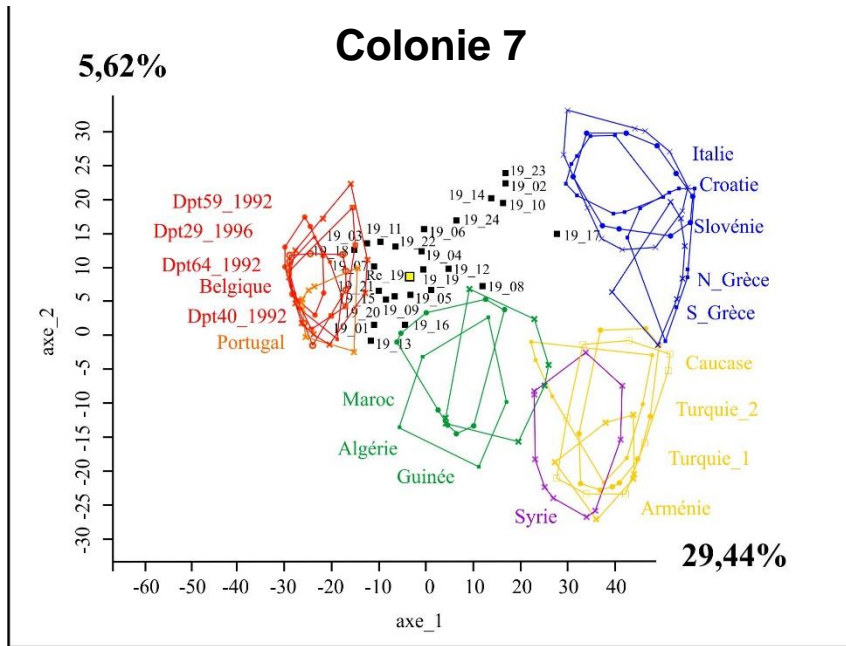
# Annexe 9 : Figures ACP des colonies incluses dans l'étude

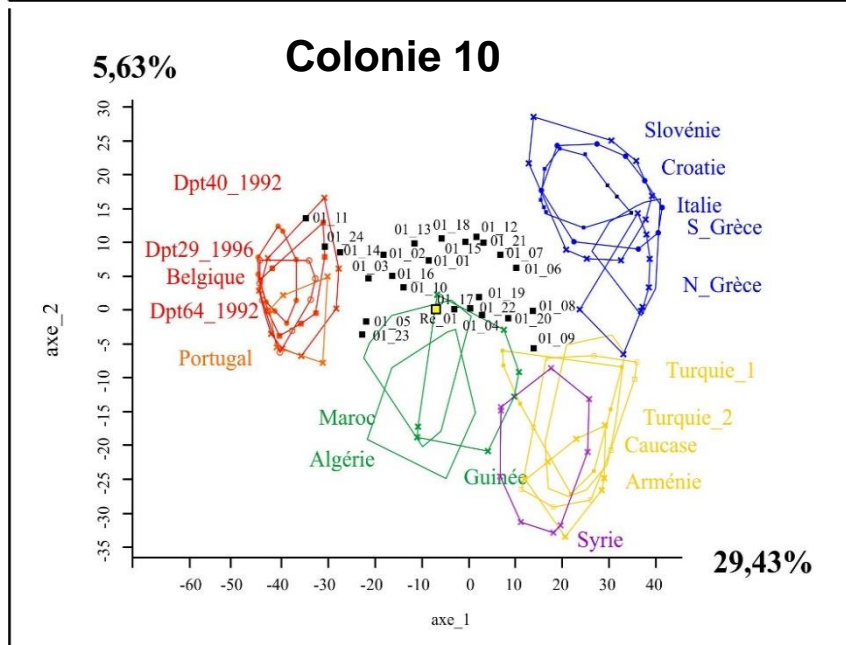
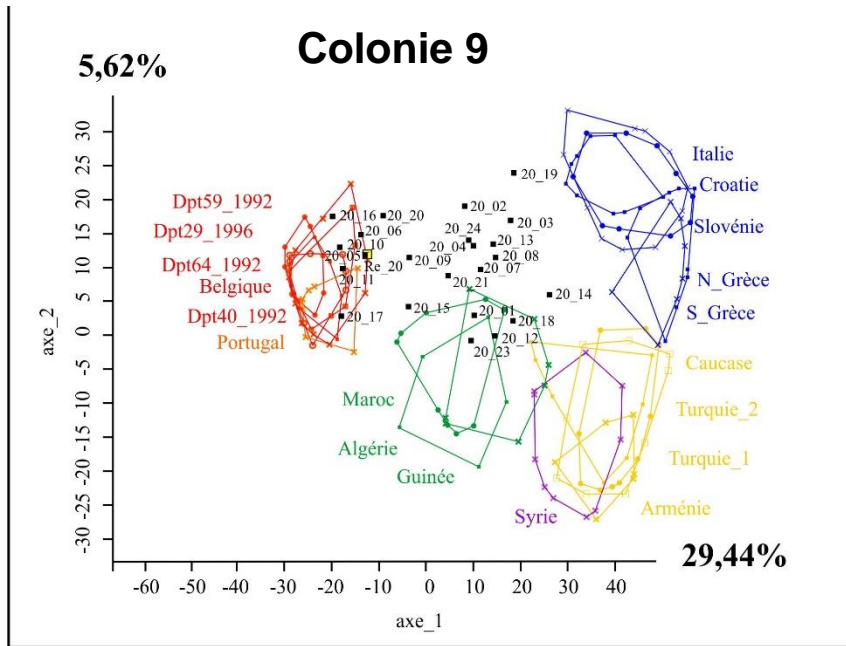


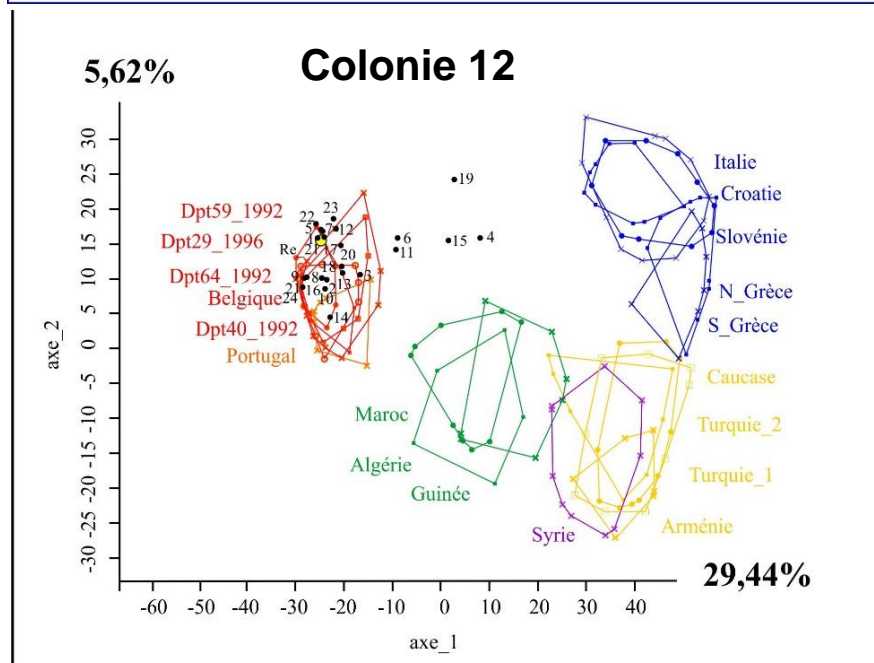
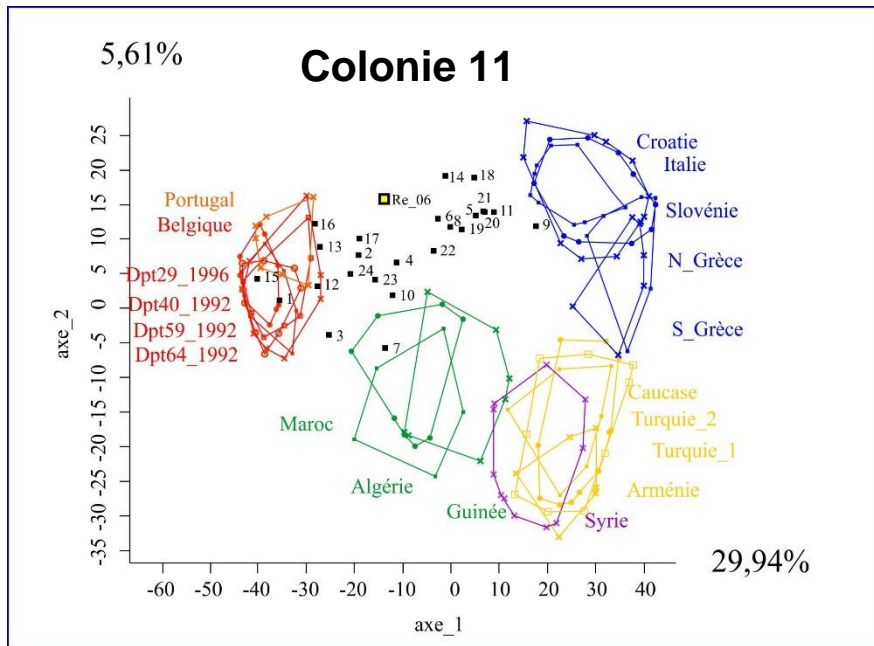


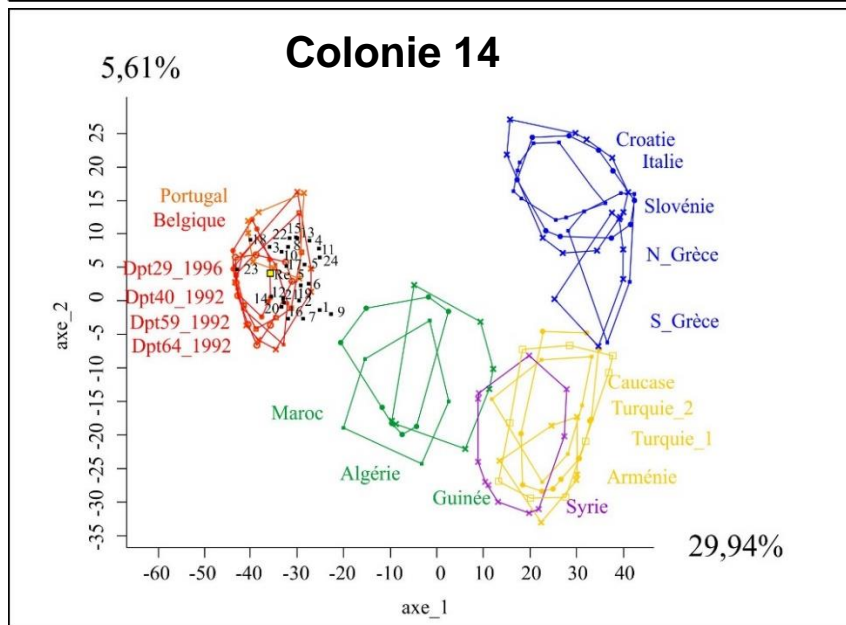
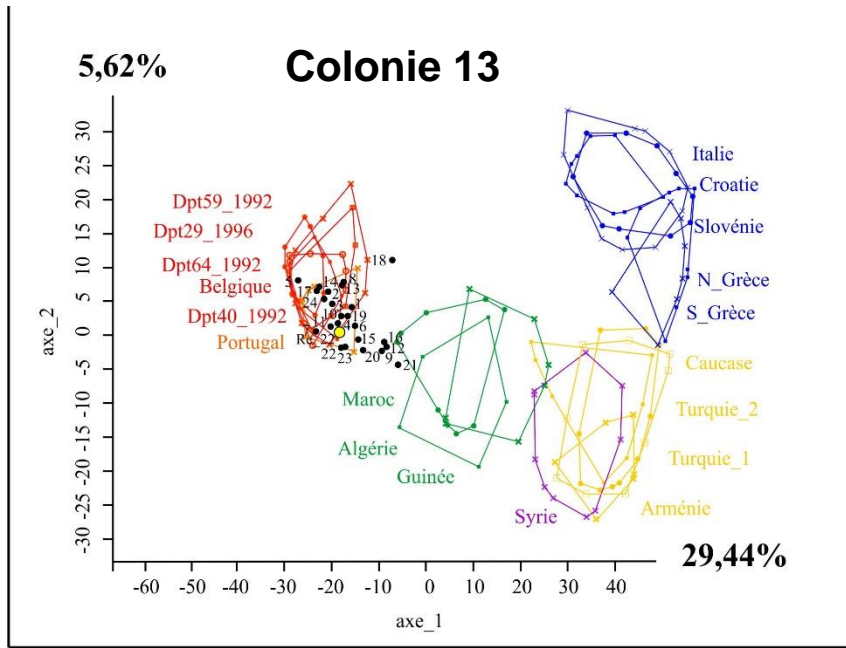


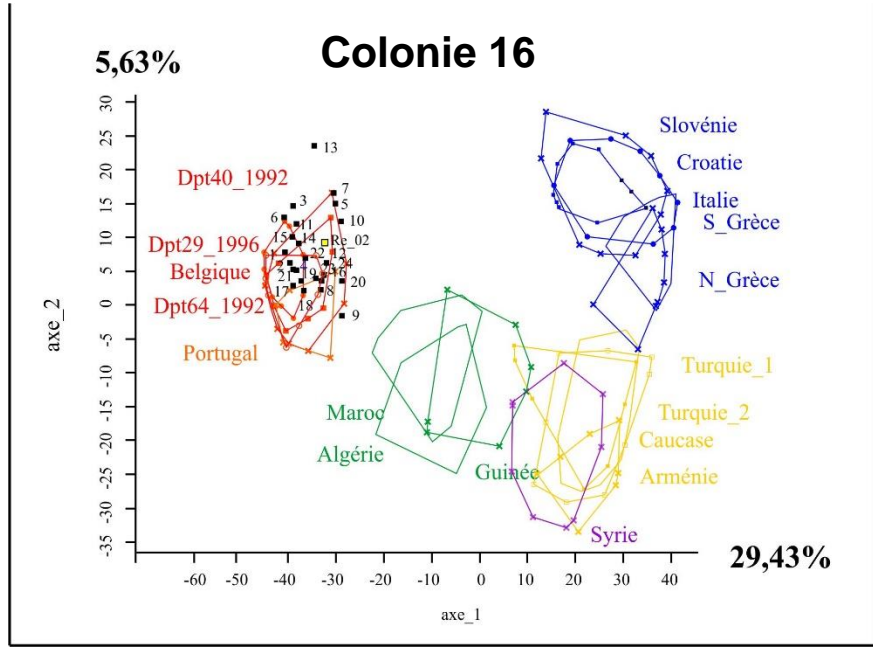
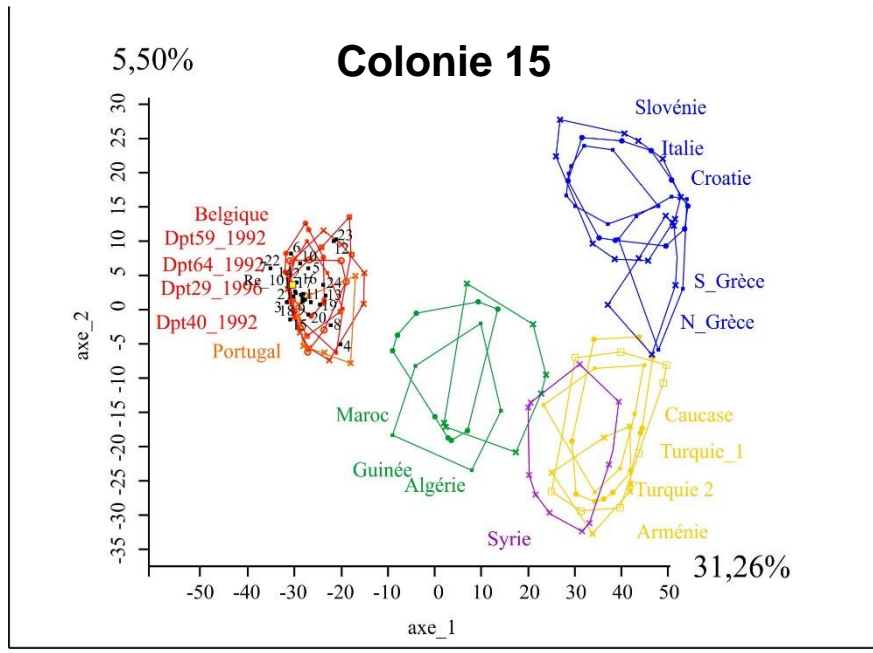




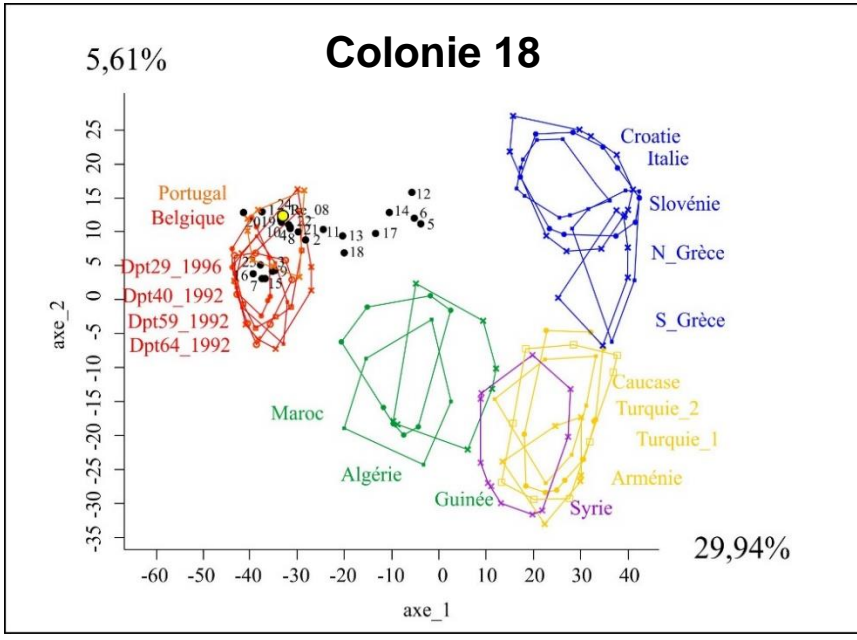
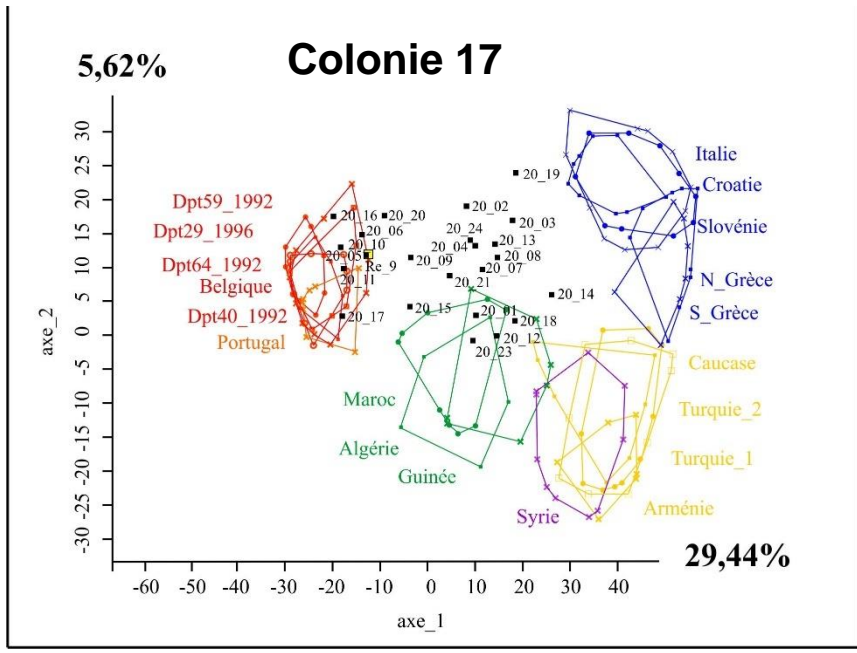


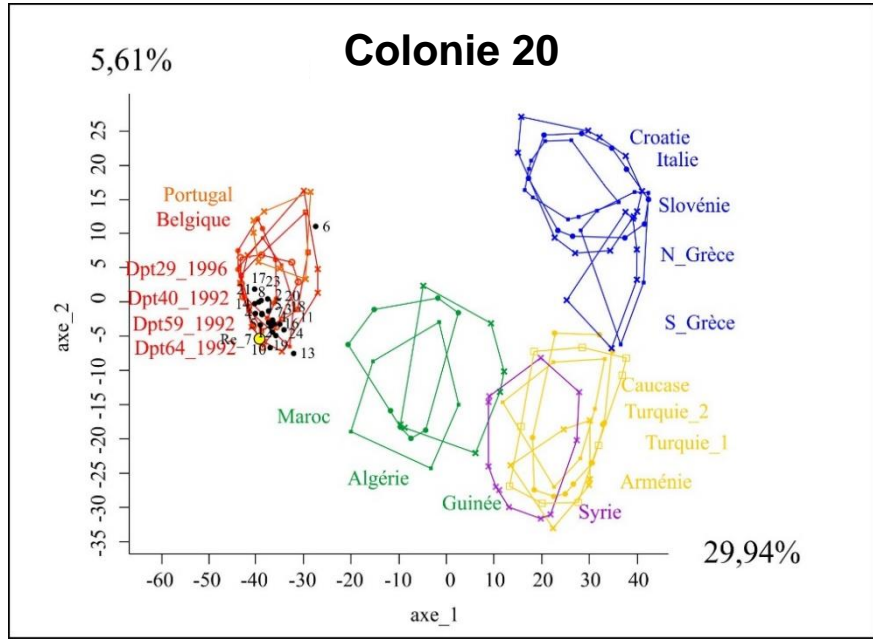
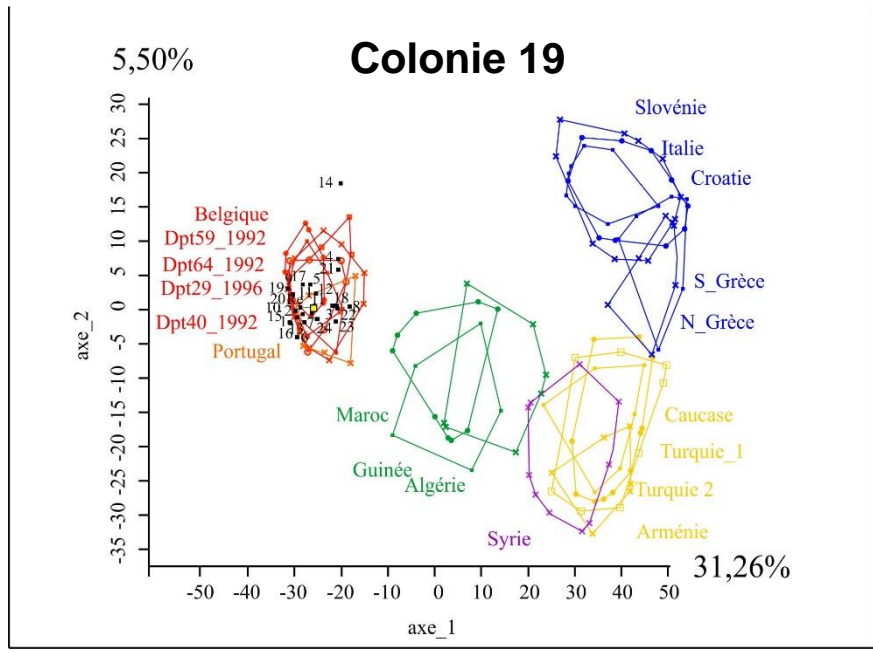




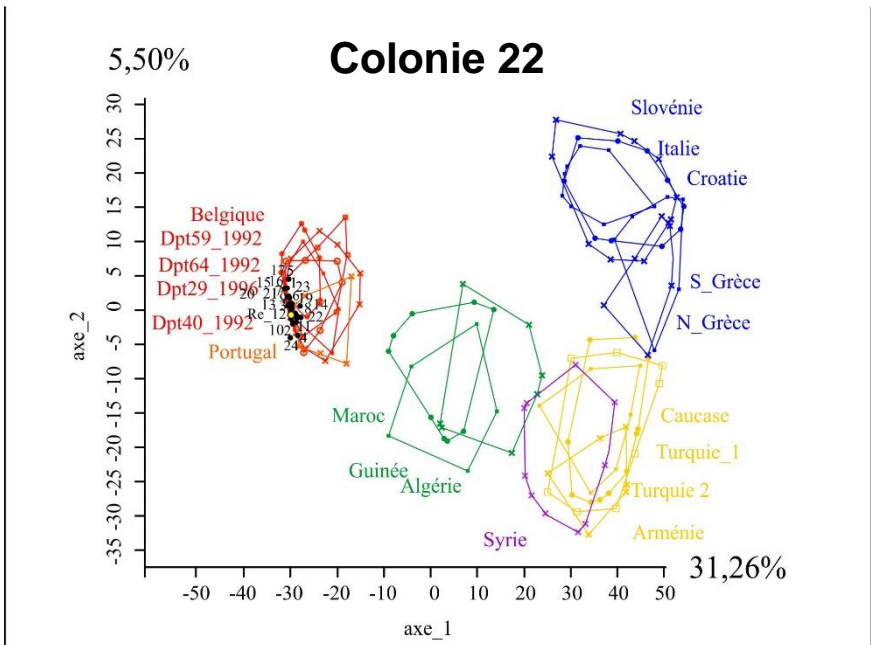
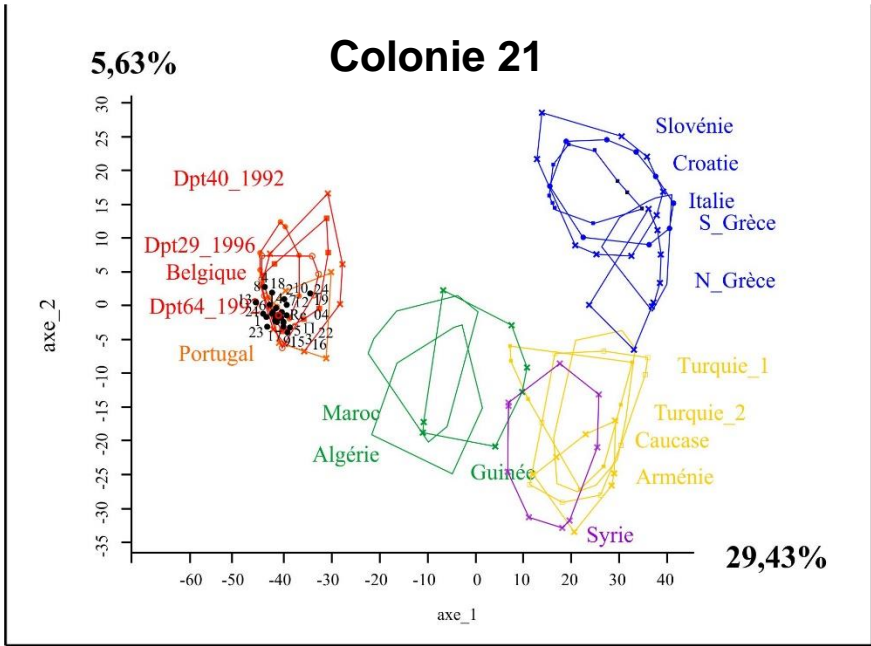








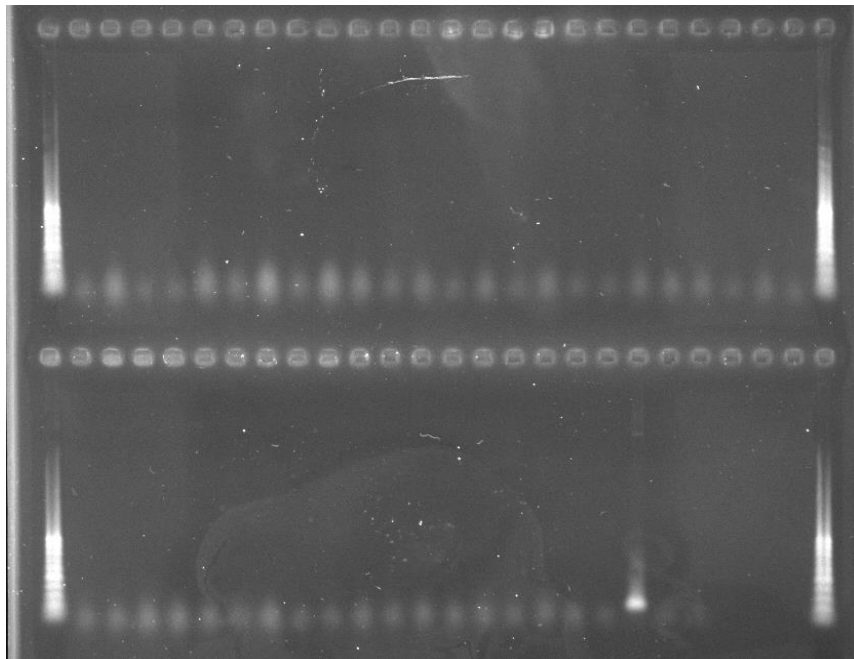




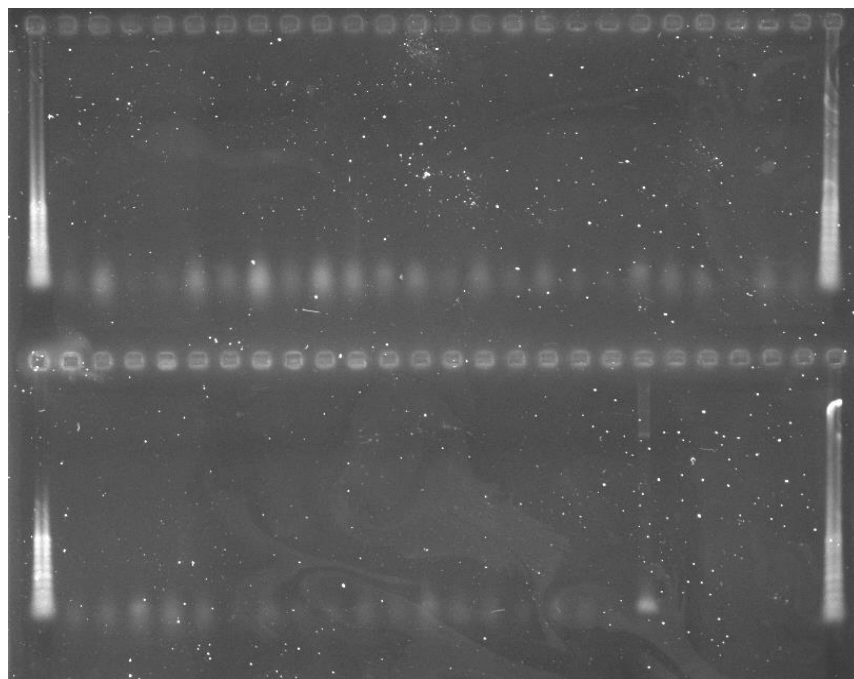
# Annexe 10 : Gels de migration sur agarose pour la détection des agents de loque américaine et européenne

---

Loque américaine (*Panaebacillus larvae*) :



Loque européenne (*Melissococcus plutonius*) :



Plan de plaques :

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	01-M	09-M	20-M	05-J	14-J	22-J	01-M	09-M	20-M	05-J	14-J	22-J
<b>B</b>	02- M	10-M	21-M	06-J	15-J	T- (PCR)	02- M	10-M	21-M	06-J	15-J	T- (PCR)
<b>C</b>	03-M	13-M	22M-	07-J	16-J	T+ (PLD)	03-M	13-M	22M-	07-J	16-J	T+ (PLD)
<b>D</b>	04- M	14-M	12M	08-J	17-J	T-(extract)	04- M	14-M	7-B	08-J	17-J	T- (extract)
<b>E</b>	05-M	15-M	01-J	09-J	18-J	T- (TP P)	05-M	15-M	01-J	09-J	18-J	T- (TP P)
<b>F</b>	06-M	16-M	02-J	10-J	19-J		06-M	16-M	02-J	10-J	19-J	
<b>G</b>	07-M	17-M	03-J	12-J	20-J		07-M	17-M	03-J	12-J	20-J	
<b>H</b>	08-M	18-M	04-J	13-J	21-J		08-M	18-M	04-J	13-J	21-J	

# Annexe 11 : Rapports d'analyses de miels



## BULLETIN D'ANALYSE

BULLETIN D'ANALYSE N° 6 732

Edité le 23/11/2022

Laboratoire habilité par l'INAO

Dossier : G00015649  
Type de produit : MIEL  
Enregistré le : 03/11/2022

GARNERY LIONEL - CNRS  
12 ROUTE 128, BATIMENT 680  
91190 GIF SUR YVETTE  
France

Votre référence : 1 - Abeille Noire Orne - Toutes fleurs / printemps - Ile de France

Echantillon : G00117489001

Etat à réception : Conditionnement conforme aux exigences du laboratoire

### ANALYSES PHYSICOCHIMIQUES

(1) La déclaration de conformité s'appuie sur la directive 2001/110/CE et la directive 2014/63/UE.

(2) La déclaration de conformité s'appuie sur la directive 2001/110/CE - 2014/63/UE ainsi que sur la littérature existante et sur les cahiers des charges spécifiques aux appellations florales.

Analyse	Résultat	Unité	Spécifications	Conformité
<b>Taux d'hydroxyméthylfurfural (2)</b> Description méthode: HPLC UV - ETENDUE DE MESURE: 2 À 40 MG/KG (MI) (*)				
HMF	3.99 (+/-14%)	mg/kg	x <= 40,00	■
<b>Amylase (1)</b> Description méthode: ENZYMATIQUE PLAGE DE 2.6 À 38 INDICE DE SHADE (MI) (*)				
Activité diastasique	21.91 (+/-10%)	DZ Schade	x >= 8	■
<b>Taux d'humidité (2)</b> Description méthode: RÉFRACTOMÈTRE À 20°C - ETENDUE DE MESURE: 14 À 22.28 (MI) (*)				
Humidité	17.00 (+/-2%)	%	x <= 20	■
<b>Conductivité électrique</b> Description méthode: CONDUCTIVIMÈTRE - ETENDUE DE MESURE: 00 À 1.980µS/CM - ARRÊTÉ DU 15/02/77 P.3 (*)				
Conductivité électrique	189 (+/-3%)	µS/cm		
<b>Couleur</b> Description méthode: LOUVELOD (MI)				
Couleur	5	mm Pfund		
<b>pH</b> Description méthode: PH MÉTRE - ETENDUE DE MESURE: 3.1 À 4.9 - ARRÊTÉ DU 15/02/77 P.3 (*)				
pH	4.19 (+/-3%)			

### ANALYSES DE RÉSIDUS

(12) La déclaration de conformité s'appuie sur les règlements (CE) n°470/2009 et n°37/2010, et le CRL Guidance paper 2007 pour les miels français.

(18) La déclaration de conformité s'appuie sur le règlement (CE) n°396/2005.

Analyse	Résultat	Unité	Spécifications	Conformité
<b>Analyse Anti Microbial Array II (12)</b> Description méthode: SANDOZ - QUINOLONES: OC3: 4µg/10g - ERREUR 8.8% / STREPTOMYCINES: LOD: 5µg/10g / TYLOSINE: OC3: 2 µg/10g - ERREUR 8.8% / TÉTRACYCLINES: C'OC3: 9 PPB - ERREUR 8.8% MOULÉQUES ACCRÉDITÉES: <a href="https://labo.abo.com/cofrac">HTTPS://LABO.ABO.COM/COFRAC</a> (MI)				
Quinolones (*)	Non détecté	µg/kg	Non détecté	■
Streptomycines	Non détecté	µg/kg	Non détecté	■
Tylosine (*)	Non détecté	µg/kg	Non détecté	■

LEGENDE : (\*) analyse sous-traitée, (\*) analyse couverte par l'accréditation COFRAC, (MI) Méthode interne,

LOD (limit of detection) Limite de détection, LOQ (limit of quantification) Limite de quantification

ND: Non détecté ou Absence pour les résultats d'analyses microbiologiques

■ Conforme ■ Non conforme En cas d'absence de réglementation disponible, aucune déclaration de conformité n'est apposée.



Accréditation ESSAIS n°1-7001

Portée d'accréditation

disponible

sur [www.cofrac.fr](http://www.cofrac.fr)

Page : 1/17

Votre référence : 1 - Abeille Noire Orne - Toutes fleurs / printemps - Ile de France

Echantillon : G00117489001

ANALYSES DE RÉSIDUS				
<p>(12) La déclaration de conformité s'appuie sur les règlements (CE) n°470/2009 et n°37/2010, et le CRL Guidance paper 2007 pour les miels français.</p> <p>(18) La déclaration de conformité s'appuie sur le règlement (CE) n°396/2005.</p>				
Analyse	Résultat	Unité	Spécifications	Conformité
<b>Analyse Anti Microbial Array II (12)</b>				
Description méthode: RANDOX - QUINOLONES COB : 4µg/KG - ERREUR 6 SR / STREPTOMYCINES LOD : 3µg/KG / TYLOSINE COB : 2 µg/KG - ERREUR 6 SR / TÉTRACYCLINES COB : 9 PPB - ERREUR 6 SR MOLECULES ACCRÉDITÉES : <a href="http://lab-labo.com/cofrac">HTTP://LAB-LABO.COM/COFRAC</a> (MI)				
Tétracyclines (*a)	Non détecté	µg/kg	Non détecté	■
<b>Glyphosate (18)</b>				
Description méthode: ELISA - COB : 25 PPB - ERREUR 6 SR (MI)				
Glyphosate	Non détecté	mg/kg	x < 0.05	■
AUTHENTICITÉ				
(9) La déclaration de conformité s'appuie sur la directive 2001/110/CE et 2014/63/UE, ce dans la limite de détection de la méthode.				
Analyse	Résultat	Unité	Spécifications	Conformité
<b>IRMN (9)</b>				
Description méthode: RMN-1H/MODELE STAT. D'INTERPRÉTATION V3.0 SOUS-TRAITÉ À BRUKER BIOSPIN ACCRÉDITATION D-PL-19229-01-00 (ÉTENDUE DE MESURE: F 51.2 À 45.2%, G 23.5 À 39.9%, SAC 1.9 À 5.7%, MAL 1 À 4.8%, TUR 1.4 À 2.6%, MÉL 3.7 À 8.7%, FKG 53.6 À 75.2%, FVG 0.94 À 1.75 (MI)				
Compatibilité zone *s	N/A		In-Model	■
Compatibilité pays *s	consistant		In-Model	■
Compatibilité florale *s	N/A		In-Model	■
Présence de sucres exogènes *s	no		No	■
Somme Glucose + Fructose (*a)	73.9 (+/-2%)	%		
Rapport Fructose / Glucose (*a)	1.13 (+/-2%)	%		
Fructose (*a)	39.2 (+/-3%)	%		
Glucose (*a)	34.6 (+/-2%)	%		
Saccharose (*a)	< 1.9	%	x <= 5	■
Turanose (*a)	1.60 (+/-8%)	%		
Maltose (*a)	1.0 (+/-11%)			
Mélézitose (*a)	< 3.7			
Empreinte spectrale (*a)	cf. annexe			
ANALYSES SENSORIELLES				
(2) La déclaration de conformité s'appuie sur la directive 2001/110/CE - 2014/63/UE ainsi que sur la littérature existante et sur les cahiers des charges spécifiques aux appellations florales.				
Analyse	Résultat	Unité	Spécifications	Conformité
<b>Analyses sensorielles (2)</b>				
Description méthode: ANALYSE SENSORIELLE (MI)				
Texture	crystallisée			
Odeur	Végétale, avec des notes chaudes Intensité moyenne Persistance courte			

LEGENDE : (\*s) analyse sous-traitée, (\*a) analyse couverte par l'accréditation COFRAC, (MI) Méthode interne, LOD (limit of detection) Limite de détection, LOQ (limit of quantification) Limite de quantification  
ND : Non détecté ou Absence pour les résultats d'analyses microbiologiques

■ Conforme

■ Non conforme

En cas d'absence de réglementation disponible, aucune déclaration de conformité n'est apposée.



Accréditation ESSAIS n°1-7001  
Portée d'accréditation disponible sur [www.cofrac.fr](http://www.cofrac.fr)

Votre référence : 1 - Abeille Noire Orne - Toutes fleurs / printemps - Ile de France

Echantillon : G00117489001

ANALYSES SENSORIELLES				
<p>(2) La déclaration de conformité s'appuie sur la directive 2001/110/CE - 2014/63/UE ainsi que sur la littérature existante et sur les cahiers des charges spécifiques aux appellations florales.</p>				
Analyse	Résultat	Unité	Spécifications	Conformité
<b>Analyses sensorielles (2)</b>				
Description méthode: ANALYSE SENSORIELLE (MI)				
<b>Saveur</b>	Végétale, avec des notes fruitées de type fruits cuits Sucrosité élevée Intensité moyenne Persistance courte			
<b>Profil organoleptique</b>	Typique		Typique	■

LEGENDE : (\*s) analyse sous-traitée, (\*a) analyse couverte par l'accréditation COFRAC, (MI) Méthode interne, LOD (limit of detection) Limite de détection, LOQ (limit of quantification) Limite de quantification  
ND : Non détecté ou Absence pour les résultats d'analyses microbiologiques

■ Conforme

■ Non conforme

En cas d'absence de réglementation disponible, aucune déclaration de conformité n'est apposée.



Accréditation ESSAIS n°1-7001  
Portée d'accréditation disponible sur [www.cofrac.fr](http://www.cofrac.fr)

Votre référence : 1 - Abeille Noire Orne - Toutes fleurs / printemps - Ile de France

Echantillon : G00117489001

ANALYSES MICROSCOPIQUES			
Analyse	Résultat	Spécifications	Conformité
<b>Analyse pollinique qualitative</b>			
Description méthode : Microscopie (MI) (*)			
<b>Densité</b>	<b>Moyenne</b>		
Pollens > 45%	Brassica napus (Colza)		
Pollens 15 << 45%	/		
Pollens < 15%	Aesculus (Marronnier) Vicia (Vesce) Helianthus annuus (Tournesol) Robinia pseudo-acacia (Robinier faux-acacia) Acer (Erable) Rosaceae (Rosacées)		
<b>Appellation florale</b>			
Appellation florale	Le spectre analysé associé à l'examen sensoriel correspond à un miel de fleurs de printemps.		
<b>Appellation géographique</b>			
Appellation géographique	Le spectre analysé est compatible avec une origine France.		

LEGENDE : (\*) analyse sous-traitée, (\*) analyse couverte par l'accréditation COFRAC, (MI) Méthode interne,  
LOD (limit of detection) Limite de détection, LOQ (limit of quantification) Limite de quantification  
ND : Non détecté ou Absence pour les résultats d'analyses microbiologiques

■ Conforme

■ Non conforme

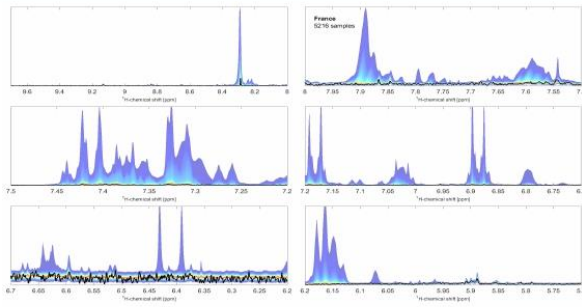
En cas d'absence de réglementation disponible, aucune déclaration de conformité n'est apposée.



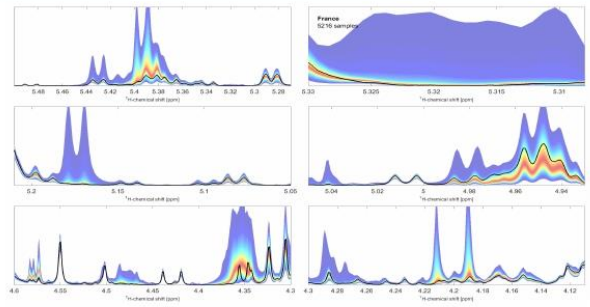
Accréditation ESSAIS n°1-7001

Portée d'accréditation  
disponible  
sur [www.cofrac.fr](http://www.cofrac.fr)

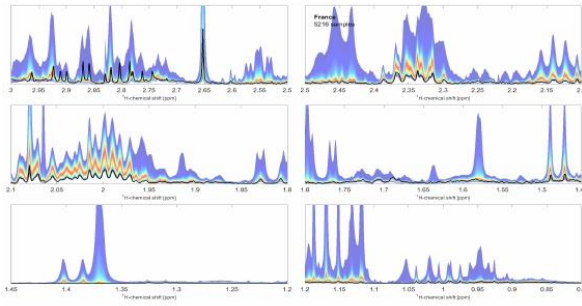




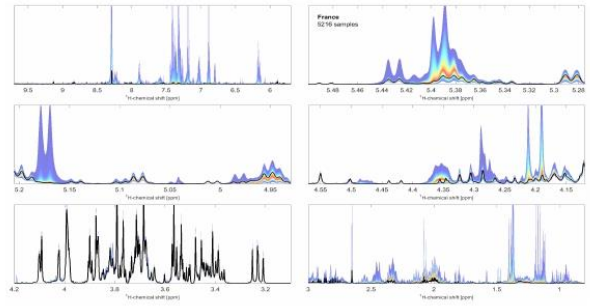
ANNEXE 50 683 : quantiles\_1\_G00117489001.png



ANNEXE 50 700 : quantiles\_2\_G00117489001.png



ANNEXE 50 717 : quantiles\_3\_G00117489001.png



ANNEXE 50 734 : quantiles\_4\_G00117489001.png

LEGENDE : (\*s) analyse sous-traitée, (\*a) analyse couverte par l'accréditation COFRAC, (MI) Méthode interne,  
 LOD (limit of detection) Limite de détection, LOQ (limit of quantification) Limite de quantification  
 ND : Non détecté ou Absence pour les résultats d'analyses microbiologiques

■ Conforme

■ Non conforme

En cas d'absence de réglementation disponible, aucune déclaration de conformité n'est apposée.



Accréditation ESSAIS n°1-7001  
 Portée d'accréditation  
 disponible  
 sur [www.cofrac.fr](http://www.cofrac.fr)



Votre référence : 2 - Abeille Noire Calvados - Toutes fleurs / printemps - Ile de France

Echantillon : G00117489002

Etat à réception : Conditionnement conforme aux exigences du laboratoire

ANALYSES PHYSICOCHIMIQUES				
<p>(1) La déclaration de conformité s'appuie sur la directive 2001/110/CE et la directive 2014/63/UE</p> <p>(2) La déclaration de conformité s'appuie sur la directive 2001/110/CE - 2014/63/UE ainsi que sur la littérature existante et sur les cahiers des charges spécifiques aux appellations florales.</p>				
Analyse	Résultat	Unité	Spécifications	Conformité
<b>Taux d'hydroxyméthylfurfural (2)</b>				
Description méthode: HPLC UV - ETENDUE DE MESURE: 2 À 40 MG/KG (MI) (MI)				
HMF	4.36 (+/-14%)	mg/kg	x <= 40,00	■
<b>Amylase (1)</b>				
Description méthode: ENZYMATIQUE PLAGE DE 2.5 À 35 INDICE DE SHADE (MI) (MI)				
Activité diastatique	21.38 (+/-10%)	DZ Schade	x >= 8	■
<b>Taux d'humidité (2)</b>				
Description méthode: RÉFRACTOMÈTRE À 20°C - ETENDUE DE MESURE: 14 À 22.2% (MI) (MI)				
Humidité	15.90 (+/-2%)	%	x <= 20	■
<b>Conductivité électrique</b>				
Description méthode: CONDUCTIVIMÈTRE - ETENDUE DE MESURE : 80 À 1550µS/CM - ARRÊTÉ DU 15/02/77 P.3 (MI)				
Conductivité électrique	200 (+/-3%)	µS/cm		
<b>Couleur</b>				
Description méthode: COUVRON (MI)				
Couleur	5	mm Pfund		
<b>pH</b>				
Description méthode: PH MÉTRIE - ETENDUE DE MESURE 3.1 À 4.9 - ARRÊTÉ DU 15/02/77 P.3 (MI)				
pH	4.15 (+/-3%)			

ANALYSES DE RÉSIDUS				
<p>(12) La déclaration de conformité s'appuie sur les règlements (CE) n°470/2009 et n°37/2010, et le CRL Guidance paper 2007 pour les miels français.</p> <p>(18) La déclaration de conformité s'appuie sur le règlement (CE) n°396/2005.</p>				
Analyse	Résultat	Unité	Spécifications	Conformité
<b>Analyse Anti Microbial Array II (12)</b>				
Description méthode: RANDOX - QUINOLONES - CCS : 4µG/KG - ERREUR 8 8% / STREPTOMYCINES LOD : 3µG/KG / TYLOSINE - CCS : 2 µG/KG - ERREUR 8 8% / TÉTRACYCLINES - CCS : 9 PPB - ERREUR 8 8% MOLECULES ACCRÉDITÉES : HTTPS://JAB-LABO.COM/COFRAC (MI)				
Quinolones (*a)	Non détecté	µg/kg	Non détecté	■
Streptomycines	Non détecté	µg/kg	Non détecté	■
Tylosine (*a)	Non détecté	µg/kg	Non détecté	■
Tétracyclines (*a)	Non détecté	µg/kg	Non détecté	■
<b>Glyphosate (18)</b>				
Description méthode: ELISA - CCS : 25 PPB - ERREUR 8 8% (MI)				
Glyphosate	Non détecté	mg/kg	x < 0,05	■

AUTHENTICITÉ				
(9) La déclaration de conformité s'appuie sur la directive 2001/110/CE et 2014/63/UE, ce dans la limite de détection de la méthode.				
Analyse	Résultat	Unité	Spécifications	Conformité
<b>IRMN (9)</b>				
Description méthode: RMN-1H (MODÈLE STAT. D'INTERPRÉTATION V3.0 SOUS-TRAITÉ À BRUKER BIOSPIN ACCRÉDITATION D-PL-19229-01-00) ETENDUE DE MESURE: F 31.2 À 45.2% G 23.5 À 39.9% SAC 1.9 À 5.7% MAL 1 À 4.8% TUR 1.4 À 2.6% MÈL 3.7 À 8.7% FPG 53.6 À 75.2% FVG 0.94 À 1.75 (MI)				

LEGENDE : (\*s) analyse sous-traitée, (\*a) analyse couverte par l'accréditation COFRAC, (MI) Méthode interne,  
 LOD (limit of detection) Limite de détection, LOQ (limit of quantification) Limite de quantification  
 ND : Non détecté ou Absence pour les résultats d'analyses microbiologiques

■ Conforme

■ Non conforme

En cas d'absence de réglementation disponible, aucune déclaration de conformité n'est apposée.



Accréditation ESSAIS n°1-7001  
 Portée d'accréditation  
 disponible  
 sur www.cofrac.fr

Votre référence : 2 - Abeille Noire Calvados - Toutes fleurs / printemps - Ile de France

Echantillon : G00117489002

AUTHENTICITÉ				
<small>(1) La déclaration de conformité s'appuie sur la directive 2001/110/CE et 2014/63/UE, ce dans la limite de détection de la méthode.</small>				
Analyse	Résultat	Unité	Spécifications	Conformité
<b>IRMN (9)</b>				
<small>Description méthode: RMN-1H/MODÈLE STAT. D'INTERPRÉTATION V.S.O SOUS-TRAITÉ À BRUKER BIOSPIN ACCRÉDITATION D-PL-19229-01-00JEUENQUE DE MESURE: F 31.2 À 45.2% G 23.5 À 39.9% SAC 1.9 À 5.7% MAL 1 À 4.8% TUR 1.4 À 2.6% MÉL 3.7 À 8.7% FKG 53.6 À 75.2% FVG 0.94 À 1.75 (MI)</small>				
Compatibilité zone *s	N/A		In-Model	■
Compatibilité pays *s	consistant		In-Model	■
Compatibilité florale *s	N/A		In-Model	■
Présence de sucres exogènes *s	no		No	■
Somme Glucose + Fructose (*a)	72.2 (+/-2%)	%		
Rapport Fructose / Glucose (*a)	1.31 (+/-2%)	%		
Fructose (*a)	41.0 (+/-3%)	%		
Glucose (*a)	31.2 (+/-2%)	%		
Saccharose (*a)	< 1.9	%	x <= 5	■
Turanose (*a)	1.80 (+/-8%)	%		
Maltose (*a)	2.1 (+/-11%)			
Mélezitose (*a)	< 3.7			
Empreinte spectrale (*a)	cf. annexe			
ANALYSES SENSORIELLES				
<small>(2) La déclaration de conformité s'appuie sur la directive 2001/110/CE - 2014/63/UE ainsi que sur la littérature existante et sur les cahiers des charges spécifiques aux appellations florales.</small>				
Analyse	Résultat	Unité	Spécifications	Conformité
<b>Analyses sensorielles (2)</b>				
<small>Description méthode: ANALYSE SENSORIELLE (MI)</small>				
Texture	crystallisée			
Odeur	Végétale, de type végétal sec avec des notes vanillées Intensité moyenne Persistance faible			
Saveur	Végétale, avec des notes de caramel au lait Sucrosité élevée Intensité moyenne Persistance moyenne			
Profil organoleptique	Typique		Typique	■

LEGENDE : (\*s) analyse sous-traitée, (\*a) analyse couverte par l'accréditation COFRAC, (MI) Méthode interne, LOD (limit of detection) Limite de détection, LOQ (limit of quantification) Limite de quantification  
ND : Non détecté ou Absence pour les résultats d'analyses microbiologiques

■ Conforme

■ Non conforme

En cas d'absence de réglementation disponible, aucune déclaration de conformité n'est apposée.



Accréditation ESSAIS n°1-7001  
Portée d'accréditation  
disponible  
sur [www.cofrac.fr](http://www.cofrac.fr)

Votre référence : 2 - Abeille Noire Calvados - Toutes fleurs / printemps - Ile de France

Echantillon : G00117489002

ANALYSES MICROSCOPIQUES			
Analyse	Résultat	Spécifications	Conformité
<b>Analyse pollinique qualitative</b>			
Description méthode : Microscopie (MI) (*)			
<b>Densité</b>	<b>Moyenne</b>		
Pollens > 45%	Brassica napus (Colza)		
Pollens 15 << 45%	/		
Pollens < 15%	Robinia pseudo-acacia (Robinier faux-acacia) Vicia (Vesce) Phacelia (Phacélie) Tilia (Tilleul) Acer (Erable) Trifolium repens (Trèfle blanc) Salix (Saule) Fagopyrum (Sarrasin) Cornus (Cornouiller)		
<b>Appellation florale</b>			
Appellation florale	Le spectre analysé associé à l'examen sensoriel correspond à un miel de fleurs de printemps.		
<b>Appellation géographique</b>			
Appellation géographique	Le spectre analysé est compatible avec une origine France.		

LEGENDE : (\*) analyse sous-traitée, (\*) analyse couverte par l'accréditation COFRAC, (MI) Méthode interne, LOD (limit of detection) Limite de détection, LOQ (limit of quantification) Limite de quantification  
ND : Non détecté ou Absence pour les résultats d'analyses microbiologiques

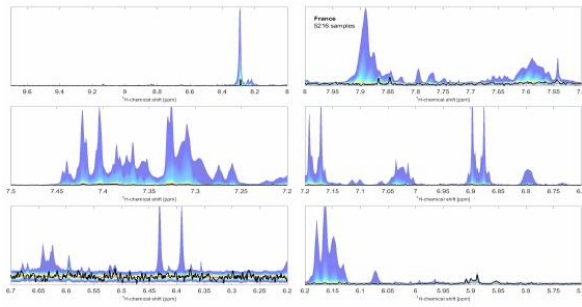
■ Conforme

■ Non conforme

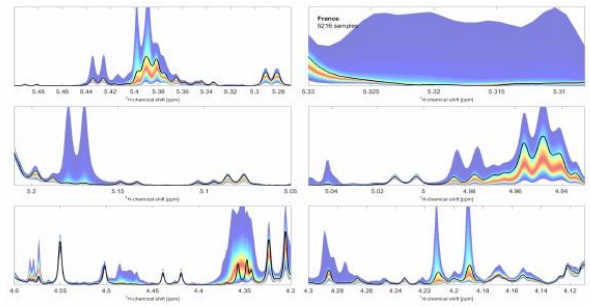
En cas d'absence de réglementation disponible, aucune déclaration de conformité n'est apposée.



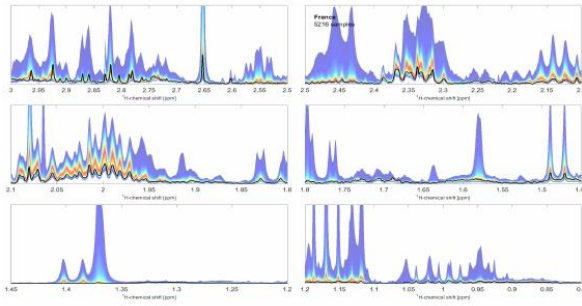
Accréditation ESSAIS n°1-7001  
Portée d'accréditation  
disponible  
sur [www.cofrac.fr](http://www.cofrac.fr)



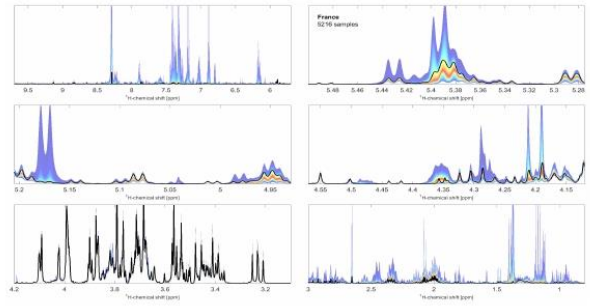
ANNEXE 50 684 : quantiles\_1\_G00117489002.png



ANNEXE 50 701 : quantiles\_2\_G00117489002.png



ANNEXE 50 718 : quantiles\_3\_G00117489002.png



ANNEXE 50 735 : quantiles\_4\_G00117489002.png

LEGENDE : (\*s) analyse sous-traitée, (\*a) analyse couverte par l'accréditation COFRAC, (MI) Méthode interne,  
 LOD (limit of detection) Limite de détection, LOQ (limit of quantification) Limite de quantification  
 ND : Non détecté ou Absence pour les résultats d'analyses microbiologiques

■ Conforme

■ Non conforme

En cas d'absence de réglementation disponible, aucune déclaration de conformité n'est apposée.



Accréditation ESSAIS n°1-7001  
 Portée d'accréditation  
 disponible  
 sur [www.cofrac.fr](http://www.cofrac.fr)

Votre référence : 3 - Abeille Noire Bretagne - Toutes fleurs / printemps - Ile de France

Echantillon : G00117489003

Etat à réception : Conditionnement conforme aux exigences du laboratoire

ANALYSES PHYSICOCHIMIQUES				
<p>(1) La déclaration de conformité s'appuie sur la directive 2001/110/CE et la directive 2014/63/UE</p> <p>(2) La déclaration de conformité s'appuie sur la directive 2001/110/CE - 2014/63/UE ainsi que sur la littérature existante et sur les cahiers des charges spécifiques aux appellations florales.</p>				
Analyse	Résultat	Unité	Spécifications	Conformité
<b>Taux d'hydroxyméthylfurfural (2)</b>				
Description méthode: HPLC UV - ETENDUE DE MESURE: 2 À 40 MG/KG (MI) (1a)				
HMF	4.89 (+/-14%)	mg/kg	x <= 40,00	■
<b>Amylase (1)</b>				
Description méthode: ENZYMATIQUE PLAGE DE 2.5 À 35 INDICE DE SHADE (MI) (1a)				
Activité diastatique	23.17 (+/-10%)	DZ Schade	x >= 8	■
<b>Taux d'humidité (2)</b>				
Description méthode: RÉFRACTOMÈTRE À 20°C - ETENDUE DE MESURE: 14 À 22.2% (MI) (1a)				
Humidité	17.30 (+/-2%)	%	x <= 20	■
<b>Conductivité électrique</b>				
Description méthode: CONDUCTIMÈTRE - ETENDUE DE MESURE : 80 À 1550µS/CM - ARRÊTÉ DU 15/02/77 P.3 (1a)				
Conductivité électrique	251 (+/-3%)	µS/cm		
<b>Couleur</b>				
Description méthode: COUVRONO (MI)				
Couleur	45	mm Pfund		
<b>pH</b>				
Description méthode: PH MÉTRIE - ETENDUE DE MESURE 3.1 À 4.9 - ARRÊTÉ DU 15/02/77 P.3 (1a)				
pH	4.16 (+/-3%)			

ANALYSES DE RÉSIDUS				
<p>(12) La déclaration de conformité s'appuie sur les règlements (CE) n°470/2009 et n°37/2010, et le CRL Guidance paper 2007 pour les miels français.</p> <p>(18) La déclaration de conformité s'appuie sur le règlement (CE) n°396/2005.</p>				
Analyse	Résultat	Unité	Spécifications	Conformité
<b>Analyse Anti Microbial Array II (12)</b>				
Description méthode: RANDOX - QUINOLONES - COC : 4µG/KG - ERREUR 8 8% / STREPTOMYCINES LOD : 3µG/KG / TYLOSINE - COC : 2 µG/KG - ERREUR 8 8% / TÉTRACYCLINES - COC : 9 PPB - ERREUR 8 8% MOLECULES ACCRÉDITÉES : HTTP://JAB-LABO.COM/COFRAC (MI)				
Quinolones (*a)	Non détecté	µg/kg	Non détecté	■
Streptomycines	Non détecté	µg/kg	Non détecté	■
Tylosine (*a)	Non détecté	µg/kg	Non détecté	■
Tétracyclines (*a)	Non détecté	µg/kg	Non détecté	■
<b>Glyphosate (18)</b>				
Description méthode: ELISA - COC : 25 PPB - ERREUR 8 8% (MI)				
Glyphosate	Non détecté	mg/kg	x < 0,05	■

AUTHENTICITÉ				
(9) La déclaration de conformité s'appuie sur la directive 2001/110/CE et 2014/63/UE, ce dans la limite de détection de la méthode.				
Analyse	Résultat	Unité	Spécifications	Conformité
<b>IRMN (9)</b>				
Description méthode: RMN-1H (MODÈLE STAT. D'INTERPRÉTATION V3.0 SOUS-TRAITÉ À BRUKER BIOSPIN ACCRÉDITATION D-PL-19229-01-00) ETENDUE DE MESURE: F 31.2 À 45.2% G 23.5 À 39.9% SAC 1.9 À 5.7% MAL 1 À 4.8% TUR 1.4 À 2.8% MÈL 3.7 À 8.7% FNG 53.6 À 75.2% FVG 0.94 À 1.75 (MI)				

LEGENDE : (\*s) analyse sous-traitée, (\*a) analyse couverte par l'accréditation COFRAC, (MI) Méthode interne,  
LOD (limit of detection) Limite de détection, LOQ (limit of quantification) Limite de quantification  
ND : Non détecté ou Absence pour les résultats d'analyses microbiologiques

■ Conforme

■ Non conforme

En cas d'absence de réglementation disponible, aucune déclaration de conformité n'est apposée.



Accréditation ESSAIS n°1-7001  
Portée d'accréditation  
disponible  
sur [www.cofrac.fr](http://www.cofrac.fr)

Votre référence : 3 - Abeille Noire Bretagne - Toutes fleurs / printemps - Ile de France

Echantillon : G00117489003

AUTHENTICITÉ				
<small>(1) La déclaration de conformité s'appuie sur la directive 2001/110/CE et 2014/63/UE, ce dans la limite de détection de la méthode.</small>				
Analyse	Résultat	Unité	Spécifications	Conformité
<b>IRMN (1)</b>				
<small>Description méthode: IRMN- (M) / MODÈLE STAT. D'INTERPRÉTATION V.S.O SOUS-TRAITÉ À BRUKER BIOSPIN ACCRÉDITATION D-PL-19229-01-00JEUENQUE DE MESURE: F 31.2 À 45.2%, G 23.5 À 39.9%, SAC 1.9 À 5.7%, MAL 1 À 4.8%, TUR 1.4 À 2.6%, MÈL 3.7 À 6.7%, FKG 53.6 À 75.2%, FVG 0.94 À 1.75 (MI)</small>				
Compatibilité zone *s	N/A		In-Model	■
Compatibilité pays *s	consistant		In-Model	■
Compatibilité florale *s	N/A		In-Model	■
Présence de sucres exogènes *s	no		No	■
Somme Glucose + Fructose (*a)	69.7 (+/-2%)	%		
Rapport Fructose / Glucose (*a)	1.38 (+/-2%)	%		
Fructose (*a)	40.4 (+/-3%)	%		
Glucose (*a)	29.3 (+/-2%)	%		
Saccharose (*a)	< 1.9	%	x <= 5	■
Turanose (*a)	1.80 (+/-8%)	%		
Maltose (*a)	2.2 (+/-11%)			
Mélezitose (*a)	< 3.7			
Empreinte spectrale (*a)	cf. annexe			
ANALYSES SENSORIELLES				
<small>(2) La déclaration de conformité s'appuie sur la directive 2001/110/CE - 2014/63/UE ainsi que sur la littérature existante et sur les cahiers des charges spécifiques aux appellations florales.</small>				
Analyse	Résultat	Unité	Spécifications	Conformité
<b>Analyses sensorielles (2)</b>				
<small>Description méthode: ANALYSE SENSORIELLE (MI)</small>				
Texture	en voie de cristallisation			
Odeur	Florale, avec de légères notes vanillées Intensité faible Persistance courte			
Saveur	Fruitée, de type fruits cuits Sucrosité élevée Intensité moyenne Persistance moyenne			
Profil organoleptique	Typique		Typique	■

LEGENDE : (\*s) analyse sous-traitée, (\*a) analyse couverte par l'accréditation COFRAC, (MI) Méthode interne, LOD (limit of detection) Limite de détection, LOQ (limit of quantification) Limite de quantification  
ND : Non détecté ou Absence pour les résultats d'analyses microbiologiques



Conforme



Non conforme

En cas d'absence de réglementation disponible, aucune déclaration de conformité n'est apposée.



Accréditation ESSAIS n°1-7001  
Portée d'accréditation disponible sur [www.cofrac.fr](http://www.cofrac.fr)



Votre référence : 3 - Abeille Noire Bretagne - Toutes fleurs / printemps - Ile de France

Echantillon : G00117489003

ANALYSES MICROSCOPIQUES			
Analyse	Résultat	Spécifications	Conformité
<b>Analyse pollinique qualitative</b>			
Description méthode : Microscopie (MI) (*)			
<b>Densité</b>	<b>Moyenne</b>		
Pollens > 45%	Brassica napus (Colza)		
Pollens 15 << 45%	/		
Pollens < 15%	Robinia pseudo-acacia (Robinier faux-acacia) Rosaceae (Rosacées) Vicia (Vesce) Ilex (Houx) Cornus (Cornouiller) Type Rubus (Type Ronce) Apiaceae (Apiacées) Filipendula (Filipendule) Aesculus (Marronnier) Melilotus (Mélilot)		
<b>Appellation florale</b>			
Appellation florale	Le spectre analysé associé à l'examen sensoriel correspond à un miel de fleurs de printemps.		
<b>Appellation géographique</b>			
Appellation géographique	Le spectre analysé est compatible avec une origine France.		

LEGENDE : (\*) analyse sous-traitée, (\*) analyse couverte par l'accréditation COFRAC, (MI) Méthode interne,  
 LOD (limit of detection) Limite de détection, LOQ (limit of quantification) Limite de quantification  
 ND : Non détecté ou Absence pour les résultats d'analyses microbiologiques

■ Conforme

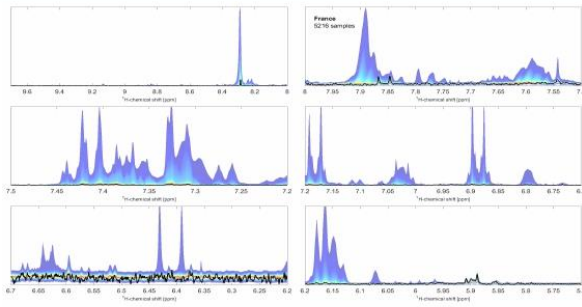
■ Non conforme

En cas d'absence de réglementation disponible, aucune déclaration de conformité n'est apposée.

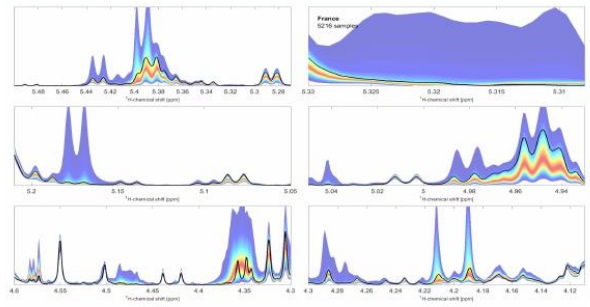


Accréditation ESSAIS n°1-7001

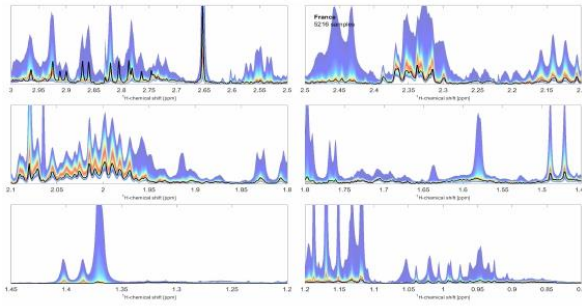
Portée d'accréditation  
 disponible  
 sur [www.cofrac.fr](http://www.cofrac.fr)



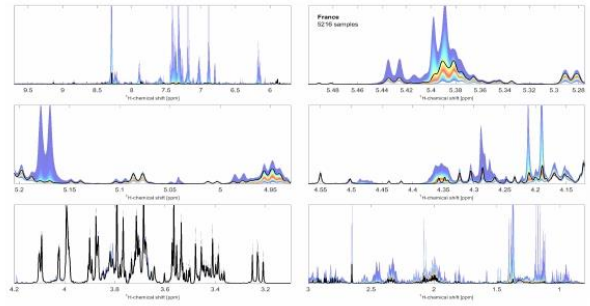
ANNEXE 50 685 : quantiles\_1\_G00117489003.png



ANNEXE 50 702 : quantiles\_2\_G00117489003.png



ANNEXE 50 719 : quantiles\_3\_G00117489003.png



ANNEXE 50 736 : quantiles\_4\_G00117489003.png

LEGENDE : (\*s) analyse sous-traitée, (\*a) analyse couverte par l'accréditation COFRAC, (MI) Méthode interne,  
 LOD (limit of detection) Limite de détection, LOQ (limit of quantification) Limite de quantification  
 ND : Non détecté ou Absence pour les résultats d'analyses microbiologiques

■ Conforme

■ Non conforme

En cas d'absence de réglementation disponible, aucune déclaration de conformité n'est apposée.



Accréditation ESSAIS n°1-7001  
 Portée d'accréditation  
 disponible  
 sur [www.cofrac.fr](http://www.cofrac.fr)



Votre référence : 4 - Hybrides - Toutes fleurs / printemps - Ile de France

Echantillon : G00117489004

Etat à réception : Conditionnement conforme aux exigences du laboratoire

ANALYSES PHYSICOCHIMIQUES				
<p>(1) La déclaration de conformité s'appuie sur la directive 2001/110/CE et la directive 2014/63/UE</p> <p>(2) La déclaration de conformité s'appuie sur la directive 2001/110/CE - 2014/63/UE ainsi que sur la littérature existante et sur les cahiers des charges spécifiques aux appellations florales.</p>				
Analyse	Résultat	Unité	Spécifications	Conformité
<b>Taux d'hydroxyméthylfurfural (2)</b>				
Description méthode: HPLC UV - ETENDUE DE MESURE : 2 À 40 MG/KG (MI) (MI)				
HMF	4.10 (+/-14%)	mg/kg	x <= 40,00	■
<b>Amylase (1)</b>				
Description méthode: ENZYMATIQUE PLAGE DE 2.5 À 35 INDICE DE SHADE (MI) (MI)				
Activité diastatique	24.86 (+/-10%)	DZ Schade	x >= 8	■
<b>Taux d'humidité (2)</b>				
Description méthode: RÉFRACTOMÈTRE À 20°C - ETENDUE DE MESURE: 14 À 22.2% (MI) (MI)				
Humidité	17.50 (+/-2%)	%	x <= 20	■
<b>Conductivité électrique</b>				
Description méthode: CONDUCTIMÈTRE - ETENDUE DE MESURE : 80 À 1550µS/CM - ARRÊTÉ DU 15/02/77 P.3 (MI)				
Conductivité électrique	213 (+/-3%)	µS/cm		
<b>Couleur</b>				
Description méthode: COULEUR (MI)				
Couleur	5	mm Pfund		
<b>pH</b>				
Description méthode: PH MÉTRIE - ETENDUE DE MESURE 3.1 À 4.9 - ARRÊTÉ DU 15/02/77 P.3 (MI)				
pH	4.04 (+/-3%)			

ANALYSES DE RÉSIDUS				
<p>(12) La déclaration de conformité s'appuie sur les règlements (CE) n°470/2009 et n°37/2010, et le CRL Guidance paper 2007 pour les miels français.</p> <p>(18) La déclaration de conformité s'appuie sur le règlement (CE) n°396/2005.</p>				
Analyse	Résultat	Unité	Spécifications	Conformité
<b>Analyse Anti Microbial Array II (12)</b>				
Description méthode: RANDOX - QUINOLONES - COC : 4µG/KG - ERREUR 6 5% / STREPTOMYCINES LOD : 3µG/KG / TYLOSINE - COC : 2 µG/KG - ERREUR 6 5% / TÉTRACYCLINES - COC : 9 PPB - ERREUR 6 5% MOLECULES ACCRÉDITÉES : <a href="https://lab-labo.com/cofrac">HTTPS://LAB-LABO.COM/COFRAC</a> (MI)				
Quinolones (*a)	Non détecté	µg/kg	Non détecté	■
Streptomycines	Non détecté	µg/kg	Non détecté	■
Tylosine (*a)	Non détecté	µg/kg	Non détecté	■
Tétracyclines (*a)	Non détecté	µg/kg	Non détecté	■
<b>Glyphosate (18)</b>				
Description méthode: ELISA - COC : 25 PPB - ERREUR 6 5% (MI)				
Glyphosate	Non détecté	mg/kg	x < 0,05	■

AUTHENTICITÉ				
(9) La déclaration de conformité s'appuie sur la directive 2001/110/CE et 2014/63/UE, ce dans la limite de détection de la méthode.				
Analyse	Résultat	Unité	Spécifications	Conformité
<b>IRMN (9)</b>				
Description méthode: RMN-1H (MODÈLE STAT. D'INTERPRÉTATION V3.0 SOUS-TRAITÉ À BRUKER BIOSPIN ACCRÉDITATION D-PL-19229-01-00) ETENDUE DE MESURE: F 31.2 À 45.2% G 23.5 À 39.9% SAC 1.9 À 5.7% MAL 1 À 4.6% TUR 1.4 À 2.6% MÈL 3.7 À 6.7% FNG 53.6 À 75.2% FVG 0.94 À 1.75 (MI)				

LEGENDE : (\*s) analyse sous-traitée, (\*a) analyse couverte par l'accréditation COFRAC, (MI) Méthode interne,  
 LOD (limit of detection) Limite de détection, LOQ (limit of quantification) Limite de quantification  
 ND : Non détecté ou Absence pour les résultats d'analyses microbiologiques

■ Conforme ■ Non conforme En cas d'absence de réglementation disponible, aucune déclaration de conformité n'est apposée.



Accréditation ESSAIS n°1-7001  
 Portée d'accréditation  
 disponible  
 sur [www.cofrac.fr](http://www.cofrac.fr)

Votre référence : 4 - Hybrides - Toutes fleurs / printemps - Ile de France

Echantillon : G00117489004

AUTHENTICITÉ				
<small>(1) La déclaration de conformité s'appuie sur la directive 2001/110/CE et 2014/63/UE, ce dans la limite de détection de la méthode.</small>				
Analyse	Résultat	Unité	Spécifications	Conformité
<b>IRMN (9)</b>				
<small>Description méthode: IRMN-IPH/MODÈLE STAT. D'INTERPRÉTATION V.S.O SOUS-TRAITÉ À BRUKER BIOSPIN ACCRÉDITATION D-PL-19229-01-00JEUENQUE DE MESURE: F 31.2 À 45.2% G 23.5 À 39.9% SAC 1.9 À 5.7% MAL 1 À 4.8% TUR 1.4 À 2.6% MÈL 3.7 À 6.7% FKG 53.6 À 75.2% FVG 0.94 À 1.75 (MI)</small>				
Compatibilité zone *s	N/A		In-Model	■
Compatibilité pays *s	N/A		In-Model	■
Compatibilité florale *s	N/A		In-Model	■
Présence de sucres exogènes *s	no		No	■
Somme Glucose + Fructose (*a)	71.2 (+/-2%)	%		
Rapport Fructose / Glucose (*a)	1.40 (+/-2%)	%		
Fructose (*a)	41.5 (+/-3%)	%		
Glucose (*a)	29.7 (+/-2%)	%		
Saccharose (*a)	< 1.9	%	x <= 5	■
Turanose (*a)	1.80 (+/-8%)	%		
Maltose (*a)	1.8 (+/-11%)			
Mélezitose (*a)	< 3.7			
Empreinte spectrale (*a)	cf. annexe			
ANALYSES SENSORIELLES				
<small>(2) La déclaration de conformité s'appuie sur la directive 2001/110/CE - 2014/63/UE ainsi que sur la littérature existante et sur les cahiers des charges spécifiques aux appellations florales.</small>				
Analyse	Résultat	Unité	Spécifications	Conformité
<b>Analyses sensorielles (2)</b>				
<small>Description méthode: ANALYSE SENSORIELLE (MI)</small>				
Texture	crystallisée			
Odeur	Végétale, de type végétal vert de chou Intensité moyenne Persistance courte			
Saveur	Végétale, avec des notes fruitées de type fruits cuits Sucrosité élevée Intensité moyenne Persistance moyenne			
Profil organoleptique	Typique		Typique	■

LEGENDE : (\*s) analyse sous-traitée, (\*a) analyse couverte par l'accréditation COFRAC, (MI) Méthode interne, LOD (limit of detection) Limite de détection, LOQ (limit of quantification) Limite de quantification  
ND : Non détecté ou Absence pour les résultats d'analyses microbiologiques

■ Conforme

■ Non conforme

En cas d'absence de réglementation disponible, aucune déclaration de conformité n'est apposée.



Accréditation ESSAIS n°1-7001

Portée d'accréditation disponible

sur [www.cofrac.fr](http://www.cofrac.fr)

Votre référence : 4 - Hybrides - Toutes fleurs / printemps - Ile de France

Echantillon : G00117489004

ANALYSES MICROSCOPIQUES			
Analyse	Résultat	Spécifications	Conformité
<b>Analyse pollinique qualitative</b>			
Description méthode : Microscopie (MI) (*)			
<b>Densité</b>	<b>Moyenne</b>		
Pollens > 45%	Brassica napus (Colza)		
Pollens 15 << 45%	/		
Pollens < 15%	Aesculus (Marronnier) Salix (Saule) Phacelia (Phacélie) Robinia pseudo-acacia (Robinier faux-acacia) Rosaceae (Rosacées) Vicia (Vesce) Ilex (Houx) Trifolium pratense (Trèfle violet)		
<b>Appellation florale</b>			
Appellation florale	Le spectre analysé associé à l'examen sensoriel correspond à un miel de fleurs de printemps.		
<b>Appellation géographique</b>			
Appellation géographique	Le spectre analysé est compatible avec une origine France.		

LEGENDE : (\*) analyse sous-traitée, (\*\*) analyse couverte par l'accréditation COFRAC, (MI) Méthode interne, LOD (limit of detection) Limite de détection, LOQ (limit of quantification) Limite de quantification  
ND : Non détecté ou Absence pour les résultats d'analyses microbiologiques

■ Conforme

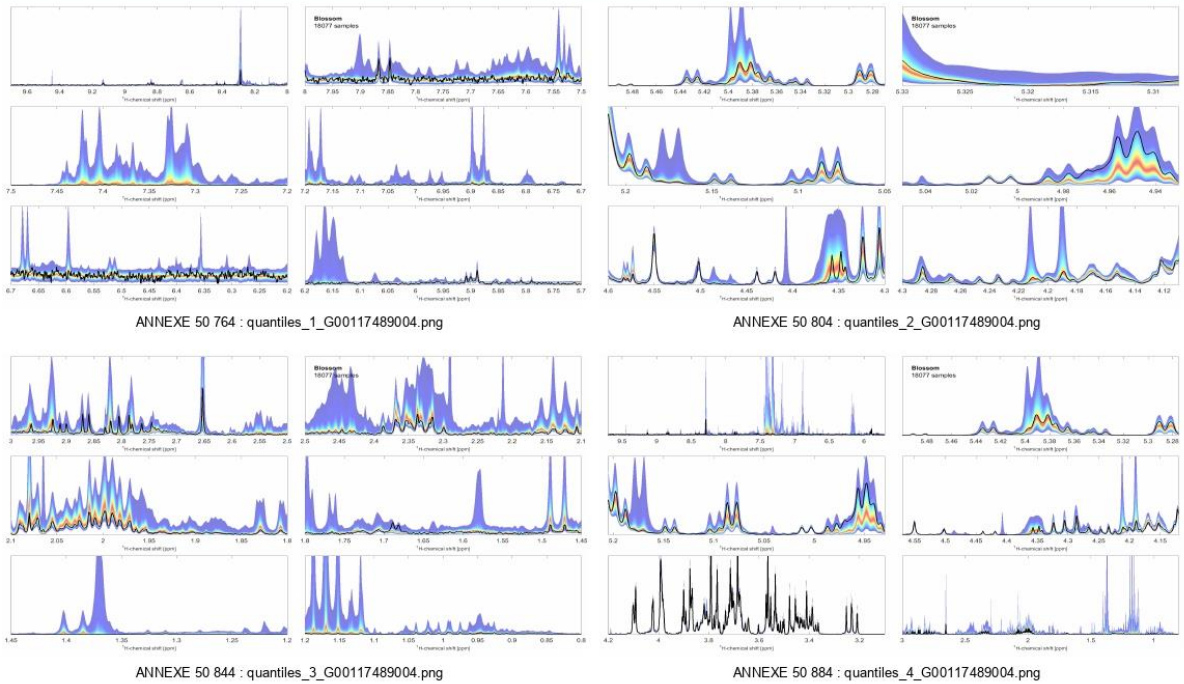
■ Non conforme

En cas d'absence de réglementation disponible, aucune déclaration de conformité n'est apposée.



Accréditation ESSAIS n°1-7001

Portée d'accréditation  
disponible  
sur [www.cofrac.fr](http://www.cofrac.fr)



Dossier revu et approuvé par : Régine LURDOS  
 signataire des rapports d'analyses externes  
 23/11/2022

Les conclusions ne font pas partie de la portée d'accréditation COFRAC.  
 Pour déclarer ou non la conformité à la spécification, il n'a pas été tenu compte de l'incertitude associée au résultat.  
 Les résultats d'analyses ne concernent que l'échantillon soumis à l'analyse, tel qu'il a été reçu, et les déterminations présentées.  
 Les clients ne sont pas autorisés à utiliser la référence à l'accréditation du laboratoire AB LABO, à l'exception de la reproduction de ce rapport d'analyse sous la forme de fac-similé photographique intégral. Le laboratoire AB LABO prendra toute action appropriée en cas d'usage erroné.



Domaine Saint-Georges - Chemin de Berdoulou - 64290 Gan - FRANCE  
 TEL : +33(0)5 59 21 91 34 - contact@ab-labo.com

www.ab-labo.com

LEGENDE : (\*s) analyse sous-traitée, (\*a) analyse couverte par l'accréditation COFRAC, (MI) Méthode interne,  
 LOD (limit of detection) Limite de détection, LOQ (limit of quantification) Limite de quantification  
 ND : Non détecté ou Absence pour les résultats d'analyses microbiologiques

■ Conforme

■ Non conforme

En cas d'absence de réglementation disponible, aucune déclaration de conformité n'est apposée.



Accréditation ESSAIS n°1-7001  
 Portée d'accréditation  
 disponible  
 sur www.cofrac.fr

## Laboratoire habilité par l'INAO

Dossier : G00015650

Type de produit : MIEL

Enregistré le : 03/11/2022

GARNERY LIONEL - CNRS  
12 ROUTE 128, BATIMENT 680  
91190 GIF SUR YVETTE  
France

Votre référence : 5 - Abeille Noire Orne - Toutes fleurs /été - Ile de France

Echantillon : G00117490001

Etat à réception : Conditionnement conforme aux exigences du laboratoire

ANALYSES PHYSICOCHIMIQUES				
<p>(1) La déclaration de conformité s'appuie sur la directive 2001/110/CE et la directive 2014/63/UE.                      (2) La déclaration de conformité s'appuie sur la directive 2001/110/CE - 2014/63/UE ainsi que sur la littérature existante et sur les cahiers des charges spécifiques aux appellations florales.</p>				
Analyse	Résultat	Unité	Spécifications	Conformité
<b>Taux d'hydroxyméthylfurfural (2)</b>				
Description méthode: HPLC UV - ETENDUE DE MESURE : 2 À 40 MG/KG (MI) (*)				
HMF	5.07 (+/-14%)	mg/kg	x <= 40,00	■
<b>Amylase (1)</b>				
Description méthode: ENZYMATIQUE PLAGE DE 2.6 À 35 INDICE DE SHADE (MI) (*)				
Activité diastatique	> 35	DZ Schade	x >= 8	■
<b>Taux d'humidité (2)</b>				
Description méthode: RÉFRACTOMÈTRE À 20°C - ETENDUE DE MESURE: 14 À 22.28 (MI) (*)				
Humidité	17.40 (+/-2%)	%	x <= 20	■
<b>Conductivité électrique</b>				
Description méthode: CONDUCTIMÈTRE - ETENDUE DE MESURE : 80 À 1550µS/CM - ARRÊTÉ DU 15/02/77 P.3 (*)				
Conductivité électrique	268 (+/-3%)	µS/cm		
<b>Couleur</b>				
Description méthode: LOUVERINO (MI)				
Couleur	40	mm Pfund		
<b>pH</b>				
Description méthode: PH MÈTRE - ETENDUE DE MESURE 3.1 À 4.9 - ARRÊTÉ DU 15/02/77 P.3 (*)				
pH	3.75 (+/-3%)			

ANALYSES DE RÉSIDUS				
<p>(12) La déclaration de conformité s'appuie sur les règlements (CE) n°470/2009 et n°37/2010, et le CRL Guidance paper 2007 pour les miels français.                      (18) La déclaration de conformité s'appuie sur le règlement (CE) n°396/2005.</p>				
Analyse	Résultat	Unité	Spécifications	Conformité
<b>Analyse Anti Microbial Array II (12)</b>				
Description méthode: RANDOX - QUINOLONES : 4µG/KG - ERREUR 8 8% / STREPTOMYCINES LOD : 3µG/KG / TYLOSINE : 2 µG/KG - ERREUR 8 8% / TÉTRACYCLINES : 9 PPB - ERREUR 8 8% MOLECULES ACCRÉDITÉES : <a href="https://lab-labo.com/cofrac">HTTPS://LAB-LABO.COM/COFRAC</a> (MI)				
Quinolones (*)	Non détecté	µg/kg	Non détecté	■
Streptomycines	Non détecté	µg/kg	Non détecté	■
Tylosine (*)	Non détecté	µg/kg	Non détecté	■

LEGENDE : (\*) analyse sous-traitée, (\*) analyse couverte par l'accréditation COFRAC, (MI) Méthode interne, LOD (limit of detection) Limite de détection, LOQ (limit of quantification) Limite de quantification  
 ND : Non détecté ou Absence pour les résultats d'analyses microbiologiques

■ Conforme

■ Non conforme

En cas d'absence de réglementation disponible, aucune déclaration de conformité n'est apposée.



Accréditation ESSAIS n°1-7001  
Portée d'accréditation disponible sur [www.cofrac.fr](http://www.cofrac.fr)



Votre référence : 5 - Abeille Noire Orne - Toutes fleurs /été - Ile de France

Echantillon : G00117490001

ANALYSES DE RÉSIDUS				
<p>(12) La déclaration de conformité s'appuie sur les règlements (CE) n°470/2009 et n°37/2010, et le CRL Guidance paper 2007 pour les miels français.</p> <p>(18) La déclaration de conformité s'appuie sur le règlement (CE) n°396/2005.</p>				
Analyse	Résultat	Unité	Spécifications	Conformité
<b>Analyse Anti Microbial Array II (12)</b>				
Description méthode: RANDOX - QUINOLONES COB : 4µg/KG - ERREUR 6 SR / STREPTOMYCINES LOD : 3µg/KG / TYLOSINE COB : 2 µg/KG - ERREUR 6 SR / TÉTRACYCLINES COB : 9 PPB - ERREUR 6 SR MOLECULES ACCRÉDITÉES : <a href="http://lab-labo.com/cofrac">HTTP://LAB-LABO.COM/COFRAC</a> (MI)				
Tétracyclines (*a)	Non détecté	µg/kg	Non détecté	■
<b>Glyphosate (18)</b>				
Description méthode: ELISA - COB : 25 PPB - ERREUR 6 SR (MI)				
Glyphosate	Non détecté	mg/kg	x < 0.05	■
AUTHENTICITÉ				
(9) La déclaration de conformité s'appuie sur la directive 2001/110/CE et 2014/63/UE, ce dans la limite de détection de la méthode.				
Analyse	Résultat	Unité	Spécifications	Conformité
<b>IRMN (9)</b>				
Description méthode: RMN-1H/MODELE STAT. D'INTERPRÉTATION V3.0 SOUS-TRAITÉ À BRUKER BIOSPIN ACCRÉDITATION D-PL-19229-01-00(JETENDUE DE MESURE: F 51.2 À 45.2%, G 23.5 À 39.9%, SAC 1.9 À 5.7%, MAL 1 À 4.8%, TUR 1.4 À 2.6%, MÉL 3.7 À 8.7%, FKG 53.6 À 75.2%, FVG 0.94 À 1.75 (MI)				
Compatibilité zone *s	N/A		In-Model	■
Compatibilité pays *s	consistant		In-Model	■
Compatibilité florale *s	N/A		In-Model	■
Présence de sucres exogènes *s	no		No	■
Somme Glucose + Fructose (*a)	72.6 (+/-2%)	%		
Rapport Fructose / Glucose (*a)	1.21 (+/-2%)	%		
Fructose (*a)	39.8 (+/-3%)	%		
Glucose (*a)	32.8 (+/-2%)	%		
Saccharose (*a)	< 1.9	%	x <= 5	■
Turanose (*a)	< 1.4	%		
Maltose (*a)	2.0 (+/-11%)			
Mélézitose (*a)	< 3.7			
Empreinte spectrale (*a)	cf. annexe			
ANALYSES SENSORIELLES				
(2) La déclaration de conformité s'appuie sur la directive 2001/110/CE - 2014/63/UE ainsi que sur la littérature existante et sur les cahiers des charges spécifiques aux appellations florales.				
Analyse	Résultat	Unité	Spécifications	Conformité
<b>Analyses sensorielles (2)</b>				
Description méthode: ANALYSE SENSORIELLE (MI)				
Texture	crystallisée			
Odeur	Végétale, avec des notes acides Intensité moyenne Persistance courte			

LEGENDE : (\*s) analyse sous-traitée, (\*a) analyse couverte par l'accréditation COFRAC, (MI) Méthode interne, LOD (limit of detection) Limite de détection, LOQ (limit of quantification) Limite de quantification  
ND : Non détecté ou Absence pour les résultats d'analyses microbiologiques

■ Conforme

■ Non conforme

En cas d'absence de réglementation disponible, aucune déclaration de conformité n'est apposée.



Accréditation ESSAIS n°1-7001  
Portée d'accréditation disponible  
sur [www.cofrac.fr](http://www.cofrac.fr)

Votre référence : 5 - Abeille Noire Orne - Toutes fleurs /été - Ile de France

Echantillon : G00117490001

ANALYSES SENSORIELLES				
<p>(2) La déclaration de conformité s'appuie sur la directive 2001/110/CE - 2014/63/UE ainsi que sur la littérature existante et sur les cahiers des charges spécifiques aux appellations florales.</p>				
Analyse	Résultat	Unité	Spécifications	Conformité
<b>Analyses sensorielles (2)</b>				
Description méthode: ANALYSE SENSORIELLE (MI)				
Saveur	Fruitée, de type confiture Sucrosité élevée Intensité moyenne Persistance moyenne			
Profil organoleptique	Typique		Typique	■

LEGENDE : (\*s) analyse sous-traitée, (\*a) analyse couverte par l'accréditation COFRAC, (MI) Méthode interne,  
LOD (limit of detection) Limite de détection, LOQ (limit of quantification) Limite de quantification  
ND : Non détecté ou Absence pour les résultats d'analyses microbiologiques

■ Conforme

■ Non conforme

En cas d'absence de réglementation disponible, aucune déclaration de conformité n'est apposée.



Accréditation ESSAIS n°1-7001

Portée d'accréditation  
disponible  
sur [www.cofrac.fr](http://www.cofrac.fr)

Votre référence : 5 - Abeille Noire Orne - Toutes fleurs /été - Ile de France

Echantillon : G00117490001

ANALYSES MICROSCOPIQUES			
Analyse	Résultat	Spécifications	Conformité
<b>Analyse pollinique qualitative</b>			
Description méthode : Microscopie (MI) (*)			
<b>Densité</b>	<b>Faible</b>		
<b>Pollens &gt; 45%</b>	/		
<b>Pollens 15 &lt;&lt; 45%</b>	<b>Fagopyrum (Sarrasin)</b> <b>Apiaceae (Apiacées)</b>		
<b>Pollens &lt; 15%</b>	<b>Medicago sativa (Luzerne)</b> <b>Phacelia (Phacélie)</b> <b>Castanea (Châtaignier)</b> <b>Rosaceae (Rosacées)</b> <b>Brassicaceae (Brassicacées)</b> <b>Helianthus annuus (Tournesol)</b> <b>Vicia (Vesce)</b>		
<b>Appellation florale</b>			
<b>Appellation florale</b>	Le spectre analysé associé à l'examen sensoriel correspond à un miel de fleurs d'été.		
<b>Appellation géographique</b>			
<b>Appellation géographique</b>	Le spectre analysé est compatible avec une origine France.		

LEGENDE : (\*) analyse sous-traitée, (\*) analyse couverte par l'accréditation COFRAC, (MI) Méthode interne,  
LOD (limit of detection) Limite de détection, LOQ (limit of quantification) Limite de quantification  
ND : Non détecté ou Absence pour les résultats d'analyses microbiologiques

■ Conforme

■ Non conforme

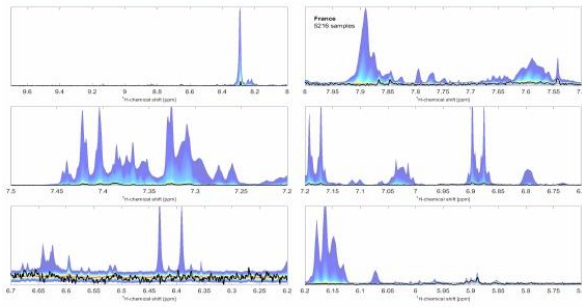
En cas d'absence de réglementation disponible, aucune déclaration de conformité n'est apposée.



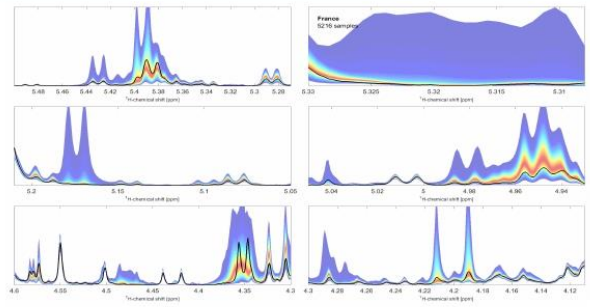
Accréditation ESSAIS n°1-7001

Portée d'accréditation  
disponible  
sur [www.cofrac.fr](http://www.cofrac.fr)

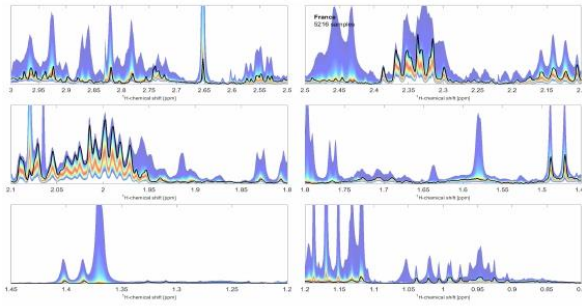




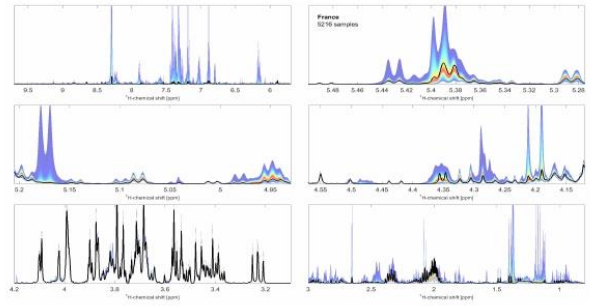
ANNEXE 50 686 : quantiles\_1\_G00117490001.png



ANNEXE 50 703 : quantiles\_2\_G00117490001.png



ANNEXE 50 720 : quantiles\_3\_G00117490001.png



ANNEXE 50 737 : quantiles\_4\_G00117490001.png

LEGENDE : (\*s) analyse sous-traitée, (\*a) analyse couverte par l'accréditation COFRAC, (MI) Méthode interne,  
 LOD (limit of detection) Limite de détection, LOQ (limit of quantification) Limite de quantification  
 ND : Non détecté ou Absence pour les résultats d'analyses microbiologiques

■ Conforme

■ Non conforme

En cas d'absence de réglementation disponible, aucune déclaration de conformité n'est apposée.



Accréditation ESSAIS n°1-7001  
 Portée d'accréditation  
 disponible  
 sur [www.cofrac.fr](http://www.cofrac.fr)

Votre référence : 6 - Abeille Noire Calvados - Toutes fleurs /été - Ile de France

Echantillon : G00117490002

Etat à réception : Conditionnement conforme aux exigences du laboratoire

ANALYSES PHYSICOCHIMIQUES				
<p>(1) La déclaration de conformité s'appuie sur la directive 2001/110/CE et la directive 2014/63/UE</p> <p>(2) La déclaration de conformité s'appuie sur la directive 2001/110/CE - 2014/63/UE ainsi que sur la littérature existante et sur les cahiers des charges spécifiques aux appellations florales.</p>				
Analyse	Résultat	Unité	Spécifications	Conformité
<b>Taux d'hydroxyméthylfurfural (2)</b>				
Description méthode: HPLC UV - ETENDUE DE MESURE: 2 À 40 MG/KG (MI) (MI)				
HMF	7.36 (+/-14%)	mg/kg	x <= 40,00	■
<b>Amylase (1)</b>				
Description méthode: ENZYMATIQUE PLAGE DE 2.5 À 35 INDICE DE SHADE (MI) (MI)				
Activité diastasique	> 35	DZ Schade	x >= 8	■
<b>Taux d'humidité (2)</b>				
Description méthode: RÉFRACTOMÈTRE À 20°C - ETENDUE DE MESURE: 14 À 22.2% (MI) (MI)				
Humidité	16.80 (+/-2%)	%	x <= 20	■
<b>Conductivité électrique</b>				
Description méthode: CONDUCTIMÈTRE - ETENDUE DE MESURE : 80 À 1550µS/CM - ARRÊTÉ DU 15/02/77 P.3 (MI)				
Conductivité électrique	312 (+/-3%)	µS/cm		
<b>Couleur</b>				
Description méthode: COULEUR (MI)				
Couleur	45	mm Pfund		
<b>pH</b>				
Description méthode: PH MÉTRIE - ETENDUE DE MESURE 3.1 À 4.9 - ARRÊTÉ DU 15/02/77 P.3 (MI)				
pH	3.85 (+/-3%)			

ANALYSES DE RÉSIDUS				
<p>(12) La déclaration de conformité s'appuie sur les règlements (CE) n°470/2009 et n°37/2010, et le CRL Guidance paper 2007 pour les miels français.</p> <p>(18) La déclaration de conformité s'appuie sur le règlement (CE) n°396/2005.</p>				
Analyse	Résultat	Unité	Spécifications	Conformité
<b>Analyse Anti Microbial Array II (12)</b>				
Description méthode: RANDOX - QUINOLONES - CCS : 4µG/KG - ERREUR 6 5% / STREPTOMYCINES LOD : 3µG/KG / TYLOSINE - CCS : 2 µG/KG - ERREUR 6 5% / TÉTRACYCLINES - CCS : 9 PPB - ERREUR 6 5% MOLECULES ACCRÉDITÉES : <a href="https://lab-labo.com/cofrac">HTTPS://LAB-LABO.COM/COFRAC</a> (MI)				
Quinolones (*a)	Non détecté	µg/kg	Non détecté	■
Streptomycines	Non détecté	µg/kg	Non détecté	■
Tylosine (*a)	Non détecté	µg/kg	Non détecté	■
Tétracyclines (*a)	Non détecté	µg/kg	Non détecté	■
<b>Glyphosate (18)</b>				
Description méthode: ELISA - CCS : 25 PPB - ERREUR 6 5% (MI)				
Glyphosate	Non détecté	mg/kg	x < 0,05	■

AUTHENTICITÉ				
(9) La déclaration de conformité s'appuie sur la directive 2001/110/CE et 2014/63/UE, ce dans la limite de détection de la méthode.				
Analyse	Résultat	Unité	Spécifications	Conformité
<b>IRMN (9)</b>				
Description méthode: RMN-1H (MODÈLE STAT. D'INTERPRÉTATION V3.0 SOUS-TRAITÉ À BRUKER BIOSPIN ACCRÉDITATION D-PL-19229-01-00) ETENDUE DE MESURE: F 31.2 À 45.2% G 23.5 À 39.9% SAC 1.9 À 5.7% MAL 1 À 4.8% TUR 1.4 À 2.6% MÈL 3.7 À 6.7% FNG 53.6 À 75.2% FVG 0.94 À 1.75 (MI)				

LEGENDE : (\*s) analyse sous-traitée, (\*a) analyse couverte par l'accréditation COFRAC, (MI) Méthode interne,  
 LOD (limit of detection) Limite de détection, LOQ (limit of quantification) Limite de quantification  
 ND : Non détecté ou Absence pour les résultats d'analyses microbiologiques

■ Conforme

■ Non conforme

En cas d'absence de réglementation disponible, aucune déclaration de conformité n'est apposée.



Accréditation ESSAIS n°1-7001  
 Portée d'accréditation  
 disponible  
 sur [www.cofrac.fr](http://www.cofrac.fr)

Votre référence : 6 - Abeille Noire Calvados - Toutes fleurs /été - Ile de France

Echantillon : G00117490002

AUTHENTICITÉ				
<small>(1) La déclaration de conformité s'appuie sur la directive 2001/110/CE et 2014/63/UE, ce dans la limite de détection de la méthode.</small>				
Analyse	Résultat	Unité	Spécifications	Conformité
<b>IRMN (1)</b>				
<small>Description méthode: IRMN-IPH/MOÛLE STAT. D'INTERPRÉTATION V.S.O SOUS-TRAITÉ À BRUKER BIOSPIN ACCRÉDITATION D-PL-19229-01-00JEUENQUE DE MESURE: F 31.2 À 45.2% G 23.5 À 39.9% SAC 1.9 À 5.7% MAL 1 À 4.8% TUR 1.4 À 2.6% MÉL 3.7 À 8.7% FKG 53.6 À 75.2% FVG 0.94 À 1.75 (MI)</small>				
Compatibilité zone *s	N/A		In-Model	■
Compatibilité pays *s	consistant		In-Model	■
Compatibilité florale *s	N/A		In-Model	■
Présence de sucres exogènes *s	no		No	■
Somme Glucose + Fructose (*a)	71.5 (+/-2%)	%		
Rapport Fructose / Glucose (*a)	1.23 (+/-2%)	%		
Fructose (*a)	39.4 (+/-3%)	%		
Glucose (*a)	32.1 (+/-2%)	%		
Saccharose (*a)	< 1.9	%	x <= 5	■
Turanose (*a)	1.40 (+/-8%)	%		
Maltose (*a)	2.3 (+/-11%)			
Mélezitose (*a)	< 3.7			
Empreinte spectrale (*a)	cf. annexe			
ANALYSES SENSORIELLES				
<small>(2) La déclaration de conformité s'appuie sur la directive 2001/110/CE - 2014/63/UE ainsi que sur la littérature existante et sur les cahiers des charges spécifiques aux appellations florales.</small>				
Analyse	Résultat	Unité	Spécifications	Conformité
<b>Analyses sensorielles (2)</b>				
<small>Description méthode: ANALYSE SENSORIELLE (MI)</small>				
Texture	en voie de cristallisation			
Odeur	Boisée, avec des notes de végétal sec acide Intensité élevée Persistance moyenne			
Saveur	astringence en fin de bouche Sucrosité assez élevée Intensité forte Persistance soutenue			
Profil organoleptique	Typique		Typique	■

LEGENDE : (\*s) analyse sous-traitée, (\*a) analyse couverte par l'accréditation COFRAC, (MI) Méthode interne, LOD (limit of detection) Limite de détection, LOQ (limit of quantification) Limite de quantification  
ND : Non détecté ou Absence pour les résultats d'analyses microbiologiques



Conforme



Non conforme

En cas d'absence de réglementation disponible, aucune déclaration de conformité n'est apposée.



Accréditation ESSAIS n°1-7001

Portée d'accréditation disponible

sur [www.cofrac.fr](http://www.cofrac.fr)

Votre référence : 6 - Abeille Noire Calvados - Toutes fleurs /été - Ile de France

Echantillon : G00117490002

ANALYSES MICROSCOPIQUES			
Analyse	Résultat	Spécifications	Conformité
<b>Analyse pollinique qualitative</b>			
Description méthode : microscopie (MI) (*)			
Densité	Moyenne		
	présence de particules d'origine végétale		
Pollens > 45%	/		
Pollens 15 <= 45%	Castanea (Châtaignier) Fagopyrum (Sarrasin) Apiaceae (Apiacées)		
Pollens < 15%	Medicago sativa (Luzerne) Centaurea jacea (Centaurée jacée) Phacelia (Phacélie) Trifolium repens (Trèfle blanc) Parthenocissus (Vigne-vierge) Brassicaceae (Brassicacées)		
<b>Appellation florale</b>			
Appellation florale	Le spectre analysé associé à l'examen sensoriel correspond à un miel de fleurs d'été.		
<b>Appellation géographique</b>			
Appellation géographique	Le spectre analysé est compatible avec une origine France.		

LEGENDE : (\*) analyse sous-traitée, (\*\*) analyse couverte par l'accréditation COFRAC, (MI) Méthode interne,  
LOD (limit of detection) Limite de détection, LOQ (limit of quantification) Limite de quantification  
ND : Non détecté ou Absence pour les résultats d'analyses microbiologiques

■ Conforme

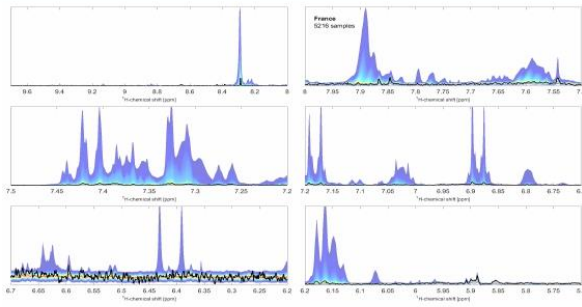
■ Non conforme

En cas d'absence de réglementation disponible, aucune déclaration de conformité n'est apposée.

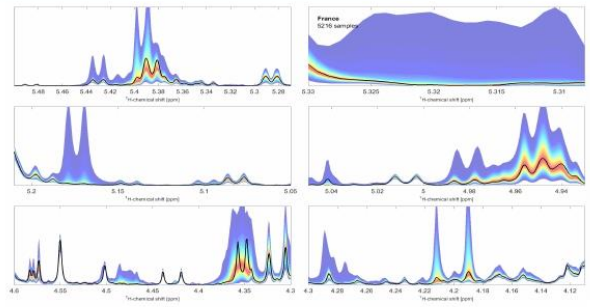


Accréditation ESSAIS n°1-7001

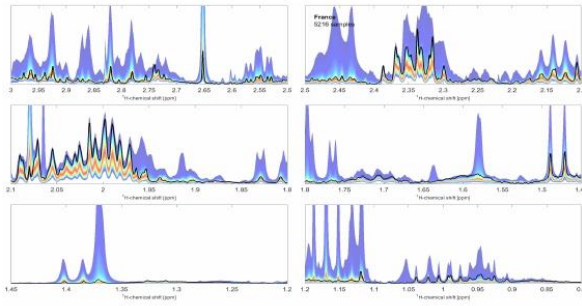
Portée d'accréditation  
disponible  
sur [www.cofrac.fr](http://www.cofrac.fr)



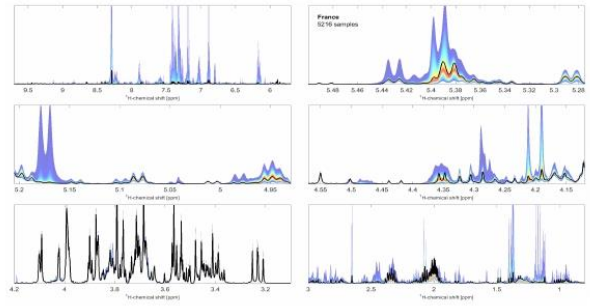
ANNEXE 50 687 : quantiles\_1\_G00117490002.png



ANNEXE 50 704 : quantiles\_2\_G00117490002.png



ANNEXE 50 721 : quantiles\_3\_G00117490002.png



ANNEXE 50 738 : quantiles\_4\_G00117490002.png

LEGENDE : (\*s) analyse sous-traitée, (\*a) analyse couverte par l'accréditation COFRAC, (MI) Méthode interne,  
 LOD (limit of detection) Limite de détection, LOQ (limit of quantification) Limite de quantification  
 ND : Non détecté ou Absence pour les résultats d'analyses microbiologiques

■ Conforme

■ Non conforme

En cas d'absence de réglementation disponible, aucune déclaration de conformité n'est apposée.



Accréditation ESSAIS n°1-7001  
 Portée d'accréditation  
 disponible  
 sur [www.cofrac.fr](http://www.cofrac.fr)



Votre référence : 7 - Abeille Noire Bretagne - Toutes fleurs /été - Ile de France

Echantillon : G00117490003

Etat à réception : Conditionnement conforme aux exigences du laboratoire

ANALYSES PHYSICOCHIMIQUES				
<p>(1) La déclaration de conformité s'appuie sur la directive 2001/110/CE et la directive 2014/63/UE</p> <p>(2) La déclaration de conformité s'appuie sur la directive 2001/110/CE - 2014/63/UE ainsi que sur la littérature existante et sur les cahiers des charges spécifiques aux appellations florales.</p>				
Analyse	Résultat	Unité	Spécifications	Conformité
<b>Taux d'hydroxyméthylfurfural (2)</b>				
Description méthode: HPLC UV - ETENDUE DE MESURE : 2 À 40 MG/KG (MI) (1a)				
HMF	6.61 (+/-14%)	mg/kg	x <= 40,00	■
<b>Amylase (1)</b>				
Description méthode: ENZYMATIQUE PLAGE DE 2.5 À 35 INDICE DE SHADE (MI) (1a)				
Activité diastasique	> 35	DZ Schade	x >= 8	■
<b>Taux d'humidité (2)</b>				
Description méthode: RÉFRACTOMÈTRE À 20°C - ETENDUE DE MESURE: 14 À 22.2% (MI) (1a)				
Humidité	18.20 (+/-2%)	%	x <= 20	■
<b>Conductivité électrique</b>				
Description méthode: CONDUCTIVIMÈTRE - ETENDUE DE MESURE : 80 À 1550µS/CM - ARRÊTÉ DU 15/02/77 P.3 (1a)				
Conductivité électrique	310 (+/-3%)	µS/cm		
<b>Couleur</b>				
Description méthode: COUVISONO (MI)				
Couleur	45	mm Pfund		
<b>pH</b>				
Description méthode: PH MÉTRIE - ETENDUE DE MESURE 3.1 À 4.9 - ARRÊTÉ DU 15/02/77 P.3 (1a)				
pH	3.92 (+/-3%)			

ANALYSES DE RÉSIDUS				
<p>(12) La déclaration de conformité s'appuie sur les règlements (CE) n°470/2009 et n°37/2010, et le CRL Guidance paper 2007 pour les miels français.</p> <p>(18) La déclaration de conformité s'appuie sur le règlement (CE) n°396/2005.</p>				
Analyse	Résultat	Unité	Spécifications	Conformité
<b>Analyse Anti Microbial Array II (12)</b>				
Description méthode: RANDOX - QUINOLONES COC : 4µG/KG - ERREUR 6 5% / STREPTOMYCINES LOD : 3µG/KG / TYLOSINE COC : 2 µG/KG - ERREUR 6 5% / TÉTRACYCLINES COC : 9 PPB - ERREUR 6 5% MOLECULES ACCRÉDITÉES : HTTP://JAB-LABO.COM/COFRAC (MI)				
Quinolones (*a)	Non détecté	µg/kg	Non détecté	■
Streptomycines	Non détecté	µg/kg	Non détecté	■
Tylosine (*a)	Non détecté	µg/kg	Non détecté	■
Tétracyclines (*a)	Non détecté	µg/kg	Non détecté	■
<b>Glyphosate (18)</b>				
Description méthode: ELISA - COC : 25 PPB - ERREUR 6 5% (MI)				
Glyphosate	Non détecté	mg/kg	x < 0,05	■

AUTHENTICITÉ				
(9) La déclaration de conformité s'appuie sur la directive 2001/110/CE et 2014/63/UE, ce dans la limite de détection de la méthode.				
Analyse	Résultat	Unité	Spécifications	Conformité
<b>IRMN (9)</b>				
Description méthode: RMN-1H (MODÈLE STAT. D'INTERPRÉTATION V3.0 SOUS-TRAITÉ À BRUKER BIOSPIN ACCRÉDITATION D-PL-19229-01-00) ETENDUE DE MESURE: F 31.2 À 45.2% G 23.5 À 39.9% SAC 1.9 À 5.7% MAL 1 À 4.8% TUR 1.4 À 2.6% MÈL 3.7 À 6.7% FNG 53.6 À 75.2% FVG 0.94 À 1.75 (MI)				

LEGENDE : (\*s) analyse sous-traitée, (\*a) analyse couverte par l'accréditation COFRAC, (MI) Méthode interne,  
 LOD (limit of detection) Limite de détection, LOQ (limit of quantification) Limite de quantification  
 ND : Non détecté ou Absence pour les résultats d'analyses microbiologiques

■ Conforme

■ Non conforme

En cas d'absence de réglementation disponible, aucune déclaration de conformité n'est apposée.



Accréditation ESSAIS n°1-7001  
 Portée d'accréditation  
 disponible  
 sur www.cofrac.fr

Votre référence : 7 - Abeille Noire Bretagne - Toutes fleurs /été - Ile de France

Echantillon : G00117490003

AUTHENTICITÉ				
(9) La déclaration de conformité s'appuie sur la directive 2001/110/CE et 2014/63/UE, ce dans la limite de détection de la méthode.				
Analyse	Résultat	Unité	Spécifications	Conformité
<b>IRMN (9)</b>				
<small>Description méthode: IRMN-IP (MODÈLE STAT. D'INTERPRÉTATION V.S.O SOUS-TRAITÉ À BRUKER BIOSPIN ACCRÉDITATION D-PL-19229-01-00) ETendue de mesure: F 31.2 À 45.2%, G 23.5 À 39.9%, SAC 1.9 À 5.7%, MAL 1 À 4.8%, TUR 1.4 À 2.6%, MÈL 3.7 À 8.7%, FKG 53.6 À 75.2%, FVG 0.94 À 1.75 (µg)</small>				
Compatibilité zone *s	N/A		In-Model	■
Compatibilité pays *s	consistant		In-Model	■
Compatibilité florale *s	N/A		In-Model	■
Présence de sucres exogènes *s	no		No	■
Somme Glucose + Fructose (*a)	70.4 (+/-2%)	%		
Rapport Fructose / Glucose (*a)	1.26 (+/-2%)	%		
Fructose (*a)	39.2 (+/-3%)	%		
Glucose (*a)	31.2 (+/-2%)	%		
Saccharose (*a)	< 1.9	%	x <= 5	■
Turanose (*a)	1.50 (+/-8%)	%		
Maltose (*a)	2.0 (+/-11%)			
Mélezitose (*a)	< 3.7			
Empreinte spectrale (*a)	cf. annexe			

ANALYSES SENSORIELLES				
(2) La déclaration de conformité s'appuie sur la directive 2001/110/CE - 2014/63/UE ainsi que sur la littérature existante et sur les cahiers des charges spécifiques aux appellations florales.				
Analyse	Résultat	Unité	Spécifications	Conformité
<b>Analyses sensorielles (2)</b>				
<small>Description méthode: ANALYSE SENSORIELLE (MI)</small>				
Texture	en voie de cristallisation			
Odeur	Boisée, avec des notes florales de fleurs séchées acide Intensité élevée Persistance soutenue			
Saveur	Boisée, avec des notes fruitées de type fruits cuits astringence en fin de bouche Intensité forte Persistance moyenne			
Profil organoleptique	Typique		Typique	■

LEGENDE : (\*s) analyse sous-traitée, (\*a) analyse couverte par l'accréditation COFRAC, (MI) Méthode interne, LOD (limit of detection) Limite de détection, LOQ (limit of quantification) Limite de quantification  
ND : Non détecté ou Absence pour les résultats d'analyses microbiologiques

■ Conforme

■ Non conforme

En cas d'absence de réglementation disponible, aucune déclaration de conformité n'est apposée.



Accréditation ESSAIS n°1-7001  
Portée d'accréditation disponible sur [www.cofrac.fr](http://www.cofrac.fr)

Votre référence : 7 - Abeille Noire Bretagne - Toutes fleurs /été - Ile de France

Echantillon : G00117490003

ANALYSES MICROSCOPIQUES			
Analyse	Résultat	Spécifications	Conformité
<b>Analyse pollinique qualitative</b>			
Description méthode : Microscopie (MI) (*)			
<b>Densité</b>	<b>Moyenne</b>		
Pollens > 45%	/		
Pollens 15 <= 45%	Brassica napus (Colza) Trifolium repens (Trèfle blanc)		
Pollens < 15%	Fagopyrum (Sarrasin) Vicia (Vesce) Parthenocissus (Vigne-vierge) Melilotus (Méliot) Phacelia (Phacélie) Rosaceae (Rosacées) Castanea (Châtaignier) Robinia pseudo-acacia (Robinier faux-acacia) Asteraceae type S (Asteracées type S)		
<b>Appellation florale</b>			
Appellation florale	Le spectre analysé associé à l'examen sensoriel correspond à un miel de fleurs.		
<b>Appellation géographique</b>			
Appellation géographique	Le spectre analysé est compatible avec une origine France.		

LEGENDE : (\*) analyse sous-traitée, (\*) analyse couverte par l'accréditation COFRAC, (MI) Méthode interne,  
 LOD (limit of detection) Limite de détection, LOQ (limit of quantification) Limite de quantification  
 ND : Non détecté ou Absence pour les résultats d'analyses microbiologiques

■ Conforme

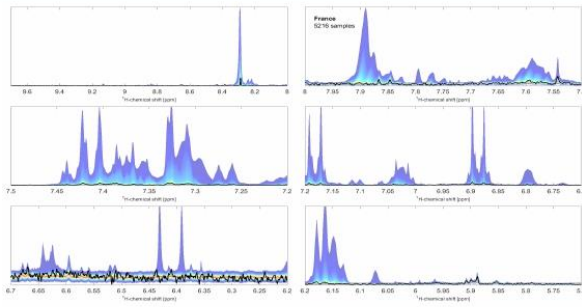
■ Non conforme

En cas d'absence de réglementation disponible, aucune déclaration de conformité n'est apposée.

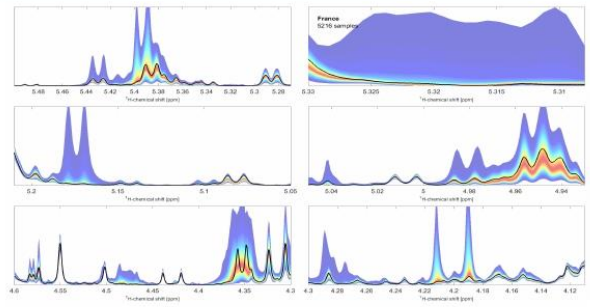


Accréditation ESSAIS n°1-7001  
 Portée d'accréditation  
 disponible  
 sur [www.cofrac.fr](http://www.cofrac.fr)

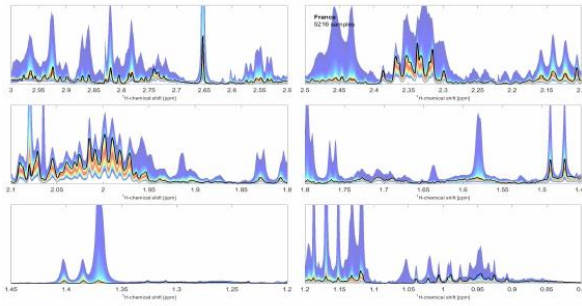




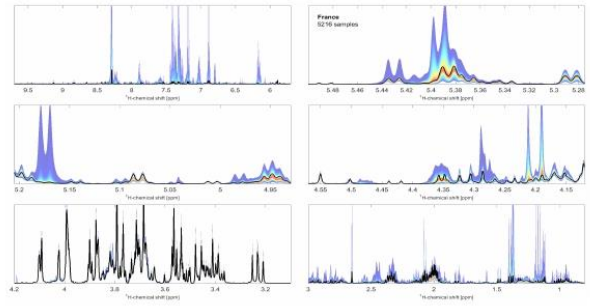
ANNEXE 50 688 : quantiles\_1\_G00117490003.png



ANNEXE 50 705 : quantiles\_2\_G00117490003.png



ANNEXE 50 722 : quantiles\_3\_G00117490003.png



ANNEXE 50 739 : quantiles\_4\_G00117490003.png

LEGENDE : (\*s) analyse sous-traitée, (\*a) analyse couverte par l'accréditation COFRAC, (MI) Méthode interne,  
 LOD (limit of detection) Limite de détection, LOQ (limit of quantification) Limite de quantification  
 ND : Non détecté ou Absence pour les résultats d'analyses microbiologiques

■ Conforme

■ Non conforme

En cas d'absence de réglementation disponible, aucune déclaration de conformité n'est apposée.



Accréditation ESSAIS n°1-7001  
 Portée d'accréditation  
 disponible  
 sur [www.cofrac.fr](http://www.cofrac.fr)

Votre référence : 8 - Hybrides - Toutes fleurs /été - Ile de France

Echantillon : G00117490004

Etat à réception : Conditionnement conforme aux exigences du laboratoire

ANALYSES PHYSICOCHIMIQUES				
<p>(1) La déclaration de conformité s'appuie sur la directive 2001/110/CE et la directive 2014/63/UE</p> <p>(2) La déclaration de conformité s'appuie sur la directive 2001/110/CE - 2014/63/UE ainsi que sur la littérature existante et sur les cahiers des charges spécifiques aux appellations florales.</p>				
Analyse	Résultat	Unité	Spécifications	Conformité
<b>Taux d'hydroxyméthylfurfural (2)</b>				
Description méthode: HPLC UV - ETENDUE DE MESURE : 2 À 40 MG/KG (MI) (MI)				
HMF	4.44 (+/-14%)	mg/kg	x <= 40,00	■
<b>Amylase (1)</b>				
Description méthode: ENZYMATIQUE PLAGE DE 2.5 À 35 INDICE DE SHADE (MI) (MI)				
Activité diastatique	> 35	DZ Schade	x >= 8	■
<b>Taux d'humidité (2)</b>				
Description méthode: RÉFRACTOMÉTRIE À 20°C - ETENDUE DE MESURE: 14 À 22.2% (MI) (MI)				
Humidité	17.70 (+/-2%)	%	x <= 20	■
<b>Conductivité électrique</b>				
Description méthode: CONDUCTIVIMÉTRIE - ETENDUE DE MESURE : 80 À 1550µS/CM - ARRÊTÉ DU 15/02/77 P.3 (MI)				
Conductivité électrique	484 (+/-3%)	µS/cm		
<b>Couleur</b>				
Description méthode: COUVISONO (MI)				
Couleur	45	mm Pfund		
<b>pH</b>				
Description méthode: PH MÉTRIE - ETENDUE DE MESURE 3.1 À 4.9 - ARRÊTÉ DU 15/02/77 P.3 (MI)				
pH	4.10 (+/-3%)			

ANALYSES DE RÉSIDUS				
<p>(12) La déclaration de conformité s'appuie sur les règlements (CE) n°470/2009 et n°37/2010, et le CRL Guidance paper 2007 pour les miels français.</p> <p>(18) La déclaration de conformité s'appuie sur le règlement (CE) n°396/2005.</p>				
Analyse	Résultat	Unité	Spécifications	Conformité
<b>Analyse Anti Microbial Array II (12)</b>				
Description méthode: RANDOX - QUINOLONES - COC : 4µG/KG - ERREUR 6 5% / STREPTOMYCINES LOD : 3µG/KG / TYLOSINE - COC : 2 µG/KG - ERREUR 6 5% / TÉTRACYCLINES - COC : 9 PPB - ERREUR 6 5% MOLECULES ACCRÉDITÉES : <a href="https://lab-labo.com/cofrac">HTTPS://LAB-LABO.COM/COFRAC</a> (MI)				
Quinolones (*a)	Non détecté	µg/kg	Non détecté	■
Streptomycines	Non détecté	µg/kg	Non détecté	■
Tylosine (*a)	Non détecté	µg/kg	Non détecté	■
Tétracyclines (*a)	Non détecté	µg/kg	Non détecté	■
<b>Glyphosate (18)</b>				
Description méthode: ELISA - COC : 25 PPB - ERREUR 6 5% (MI)				
Glyphosate	Non détecté	mg/kg	x < 0,05	■

AUTHENTICITÉ				
(9) La déclaration de conformité s'appuie sur la directive 2001/110/CE et 2014/63/UE, ce dans la limite de détection de la méthode.				
Analyse	Résultat	Unité	Spécifications	Conformité
<b>IRMN (9)</b>				
Description méthode: RMN-1H (MODÈLE STAT. D'INTERPRÉTATION V3.0 SOUS-TRAITÉ À BRUKER BIOSPIN ACCRÉDITATION D-PL-19229-01-00) ETENDUE DE MESURE: F 31.2 À 45.2% G 23.5 À 39.9% SAC 1.9 À 5.7% MAL 1 À 4.8% TUR 1.4 À 2.6% MÈL 3.7 À 6.7% FNG 53.6 À 75.2% FVG 0.94 À 1.75 (MI)				

LEGENDE : (\*s) analyse sous-traitée, (\*a) analyse couverte par l'accréditation COFRAC, (MI) Méthode interne,  
 LOD (limit of detection) Limite de détection, LOQ (limit of quantification) Limite de quantification  
 ND : Non détecté ou Absence pour les résultats d'analyses microbiologiques

■ Conforme

■ Non conforme

En cas d'absence de réglementation disponible, aucune déclaration de conformité n'est apposée.



Accréditation ESSAIS n°1-7001  
 Portée d'accréditation  
 disponible  
 sur [www.cofrac.fr](http://www.cofrac.fr)

Votre référence : 8 - Hybrides - Toutes fleurs /été - Ile de France

Echantillon : G00117490004

AUTHENTICITÉ				
<small>(1) La déclaration de conformité s'appuie sur la directive 2001/110/CE et 2014/63/UE, ce dans la limite de détection de la méthode.</small>				
Analyse	Résultat	Unité	Spécifications	Conformité
<b>IRMN (9)</b>				
<small>Description méthode: IRMN-IPH/MODÈLE STAT. D'INTERPRÉTATION V.S.O SOUS-TRAITÉ À BRUKER BIOSPIN ACCRÉDITATION D-PL-19229-01-00JEUENQUE DE MESURE: F 31.2 À 45.2% G 23.5 À 39.9%, SAC 1.9 À 5.7%, MAL 1 À 4.8%, TUR 1.4 À 2.6%, MÊL 3.7 À 6.7%, FKG 53.6 À 75.2%, FVG 0.94 À 1.75 (MI)</small>				
Compatibilité zone *s	N/A		In-Model	■
Compatibilité pays *s	consistant		In-Model	■
Compatibilité florale *s	N/A		In-Model	■
Présence de sucres exogènes *s	no		No	■
Somme Glucose + Fructose (*a)	68.9 (+/-2%)	%		
Rapport Fructose / Glucose (*a)	1.31 (+/-2%)	%		
Fructose (*a)	39.1 (+/-3%)	%		
Glucose (*a)	29.8 (+/-2%)	%		
Saccharose (*a)	< 1.9	%	x <= 5	■
Turanose (*a)	1.70 (+/-8%)	%		
Maltose (*a)	1.9 (+/-11%)			
Mélezitose (*a)	< 3.7			
Empreinte spectrale (*a)	cf. annexe			
ANALYSES SENSORIELLES				
<small>(2) La déclaration de conformité s'appuie sur la directive 2001/110/CE - 2014/63/UE ainsi que sur la littérature existante et sur les cahiers des charges spécifiques aux appellations florales.</small>				
Analyse	Résultat	Unité	Spécifications	Conformité
<b>Analyses sensorielles (2)</b>				
<small>Description méthode: ANALYSE SENSORIELLE (MI)</small>				
Texture	en voie de cristallisation			
Odeur	Fruitée, avec de légères notes florales Intensité moyenne Persistance moyenne			
Saveur	Boisée, avec des notes fruitées de type fruits cuits astringence en fin de bouche Intensité forte Persistance soutenue			
Profil organoleptique	Typique		Typique	■

LEGENDE : (\*s) analyse sous-traitée, (\*a) analyse couverte par l'accréditation COFRAC, (MI) Méthode interne, LOD (limit of detection) Limite de détection, LOQ (limit of quantification) Limite de quantification  
ND : Non détecté ou Absence pour les résultats d'analyses microbiologiques

■ Conforme

■ Non conforme

En cas d'absence de réglementation disponible, aucune déclaration de conformité n'est apposée.



Accréditation ESSAIS n°1-7001

Portée d'accréditation disponible

sur [www.cofrac.fr](http://www.cofrac.fr)

Votre référence : 8 - Hybrides - Toutes fleurs /été - Ile de France

Echantillon : G00117490004

ANALYSES MICROSCOPIQUES			
Analyse	Résultat	Spécifications	Conformité
<b>Analyse pollinique qualitative</b>			
Description méthode : Microscopie (MI) (*)			
Densité	Faible		
	présence de particules d'origine végétale		
Pollens > 45%	Castanea (Châtaignier)		
Pollens 15 <= 45%	/		
Pollens < 15%	Brassica napus (Colza) Helianthus annuus (Tournesol) Robinia pseudo-acacia (Robinier faux-acacia) Vicia (Vesce) Type Rubus (Type Ronce) Phacelia (Phacélie) Rosaceae (Rosacées) Parthenocissus (Vigne-vierge) Salix (Saule) Apiaceae (Apiacées) Fagopyrum (Sarrasin)		
<b>Appellation florale</b>			
Appellation florale	Le spectre analysé associé à l'examen sensoriel correspond à un miel de fleurs d'été.		
<b>Appellation géographique</b>			
Appellation géographique	Le spectre analysé est compatible avec une origine France.		

LEGENDE : (\*) analyse sous-traitée, (\*) analyse couverte par l'accréditation COFRAC, (MI) Méthode interne,  
 LOD (limit of detection) Limite de détection, LOQ (limit of quantification) Limite de quantification  
 ND : Non détecté ou Absence pour les résultats d'analyses microbiologiques

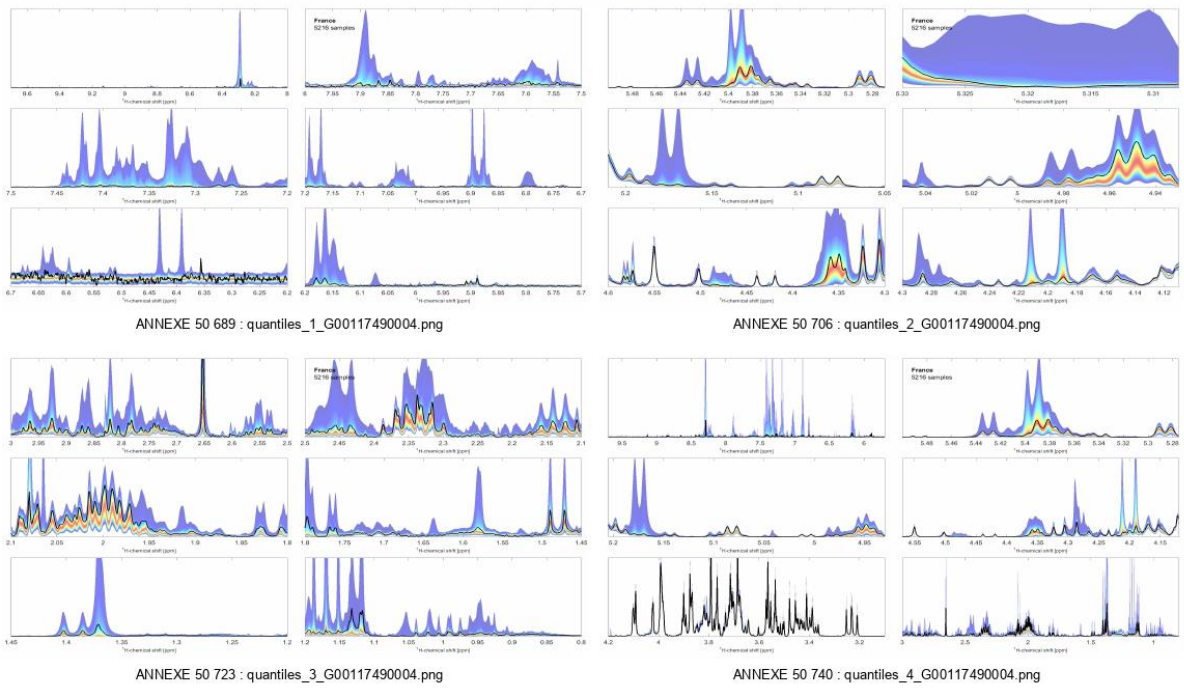
■ Conforme

■ Non conforme

En cas d'absence de réglementation disponible, aucune déclaration de conformité n'est apposée.



Accréditation ESSAIS n°1-7001  
 Portée d'accréditation  
 disponible  
 sur [www.cofrac.fr](http://www.cofrac.fr)



Dossier revu et approuvé par : Régine LURDOS  
 signataire des rapports d'analyses externes  
 23/11/2022

Les conclusions ne font pas partie de la portée d'accréditation COFRAC.  
 Pour déclarer ou non la conformité à la spécification, il n'a pas été tenu compte de l'incertitude associée au résultat.  
 Les résultats d'analyses ne concernent que l'échantillon soumis à l'analyse, tel qu'il a été reçu, et les déterminations présentées.  
 Les clients ne sont pas autorisés à utiliser la référence à l'accréditation du laboratoire AB LABO, à l'exception de la reproduction de ce rapport d'analyse sous la forme de fac-similé photographique intégral. Le laboratoire AB LABO prendra toute action appropriée en cas d'usage erroné.



Domaine Saint-Georges - Chemin de Berdoulou - 64290 Gan - FRANCE  
 TEL : +33(0)5 59 21 91 34 - contact@ab-labo.com

www.ab-labo.com

LEGENDE : (\*s) analyse sous-traitée, (\*a) analyse couverte par l'accréditation COFRAC, (MI) Méthode interne,  
 LOD (limit of detection) Limite de détection, LOQ (limit of quantification) Limite de quantification  
 ND : Non détecté ou Absence pour les résultats d'analyses microbiologiques

■ Conforme

■ Non conforme

En cas d'absence de réglementation disponible, aucune déclaration de conformité n'est apposée.



Accréditation ESSAIS n°1-7001  
 Portée d'accréditation disponible sur www.cofrac.fr

# Annexe 12 : Données brutes issues de la méthode ColEval©

Variable	Colonies hybridées	Colonies noires	p
<b>Population en</b>			
Mai	8,8182 ± 0,5607	9,8182 ± 0,5607	NS
Juin	9,8182 ± 0,5607	9,1364 ± 0,5607	NS
Juillet	10,1364 ± 0,5607	9,3636 ± 0,5607	NS
Août	10,9091 ± 0,5607	9,7273 ± 0,5607	NS
<b>Total</b>	<b>9,9205 ± 0,2803</b>	<b>9,5114 ± 0,2803</b>	<b>NS</b>

Variable	Colonies hybridées	Colonies noires	p
<b>Surface de miel operculé en</b>			
Mai	5204,44 ± 764,46	4029,34 ± 764,46	NS
Juin	6267,62 ± 764,46	5562,98 ± 801,77	NS
Juillet	5750,68 ± 764,46	5741,21 ± 801,77	NS
Août	11936 ± 764,46	11340 ± 801,77	NS
<b>Total</b>	<b>7289,64 ± 382,23</b>	<b>382,23 ± 396,30</b>	<b>NS</b>

Variable	Colonies hybridées	Colonies noires	p
<b>Surface de nectar en</b>			
Mai	5491,56 ± 527,83	4573,96 ± 527,83	NS
Juin	592,16 ± 527,83	683,40 ± 553,60	NS
Juillet	5221,40 ± 527,83	5676,69 ± 553,60	NS
Août	3756,56 ± 527,83	3448,89 ± 553,60	NS
<b>Total</b>	<b>3765,42 ± 263,92</b>	<b>3595,73 ± 273,63</b>	<b>NS</b>

Variable	Colonies hybridées	Colonies noires	p
<b>Surface de pollen en</b>			
Mai	2181,61 ± 247,12	1002,22 ± 247,12	NS
Juin	1056,15 ± 247,12	226,63 ± 259,18	NS
Juillet	1787,51 ± 247,12	1362,28 ± 259,18	NS
Août	1585,92 ± 247,12	1186,42 ± 259,18	NS
<b>Total</b>	<b>1652,80 ± 123,56</b>	<b>944,39 ± 128,11</b>	<b>&lt;0,001</b>

Variable	Colonies hybridées	Colonies noires	p
<b>Surface de couvain ouvert d'ouvrières en</b>			
Mai	995,50 ± 220,36	1776,60 ± 220,36	NS
Juin	1463,27 ± 220,36	1327,01 ± 231,12	NS
Juillet	2006,41 ± 220,36	2128,37 ± 231,12	NS
Août	433,30 ± 220,36	743,59 ± 231,12	NS
<b>Total</b>	<b>1224,62 ± 110,18</b>	<b>1493,89 ± 114,24</b>	<b>&lt;0,1</b>

Variable	Colonies hybridées	Colonies noires	p
<b>Surface de couvain fermé d'ouvrières en</b>			
Mai	3612,92 ± 398,06	4185,15 ± 398,06	NS
Juin	3510,74 ± 398,06	4281,97 ± 417,48	NS
Juillet	3782,55 ± 398,06	3483,80 ± 417,48	NS
Août	2183,22 ± 398,06	1723,43 ± 417,48	NS
<b>Total</b>	<b>3272,36 ± 199,03</b>	<b>3418,59 ± 206,36</b>	<b>NS</b>

Variable	Colonies hybridées	Colonies noires	p
<b>Surface de couvain ouvert de mâles en</b>			
Mai	172,07 ± 43,1449	196,25 ± 43,1449	NS
Juin	107,86 ± 43,1449	14,4985 ± 45,2508	NS
Juillet	56,1041 ± 43,1449	58,9283 ± 45,2508	NS
Août	0	0	NS
<b>Total</b>	<b>112,01 ± 24,9097</b>	<b>89,8932 ± 25,7267</b>	<b>NS</b>

Variable	Colonies hybridées	Colonies noires	p
<b>Surface de couvain fermé de mâles en</b>			
Mai	736,64 ± 102,53	265,24 ± 102,53	NS
Juin	290,82 ± 102,53	522,55 ± 107,54	NS
Juillet	217,55 ± 102,53	119,80 ± 107,54	NS
Août	8,3620 ± 102,53	31,6364 ± 107,54	NS
<b>Total</b>	<b>313,34 ± 51,2658</b>	<b>234,81 ± 53,1535</b>	<b>NS</b>

Variable	Colonies hybrides	Colonies noires	p
<b>Couvain total en</b>			
Mai	5517,13 ± 669,24	5517,13 ± 669,24	NS
Juin	5372,69 ± 669,24	5587,30 ± 669,24	NS
Juillet	6062,61 ± 669,24	5264,46 ± 669,24	NS
Août	2624,88 ± 669,24	2498,66 ± 701,91	NS
<b>Total</b>	<b>4894,33 ± 334,62</b>	<b>4716,89 ± 338,78</b>	<b>NS</b>

Variable	Colonies hybridées	Colonies noires	p
<b>Surface de vide en</b>			
Mai	4258,81 ± 807,86	6651,24 ± 807,86	NS
Juin	9391,39 ± 807,86	10061 ± 847,30	NS
Juillet	3857,80 ± 807,86	4108,93 ± 847,30	NS
Août	2776,83 ± 807,86	4238,28 ± 893,13	NS
Total	5071,21 ± 403,93	6264,85 ± 424,72	<0,05

Variable	Colonies hybridées	Colonies noires	p
<b>Surface de miel en</b>			
Partie 1	2943,00 ± 181,66	2641,94 ± 187,64	NS
Partie 2	1381,94 ± 181,66	1072,07 ± 187,64	NS
Partie 3	2829,29 ± 181,66	2598,49 ± 187,64	NS

Variable	Colonies hybridées	Colonies noires	p
<b>Surface de nectar en</b>			
Partie 1	1401,70 ± 123,66	1311,33 ± 128,13	NS
Partie 2	1131,94 ± 123,66	791,00 ± 128,13	NS
Partie 3	1095,26 ± 123,66	1292,94 ± 128,13	NS

Variable	Colonies hybridées	Colonies noires	p
<b>Surface de pollen en</b>			
Partie 1	438,04 ± 67,0279	199,27 ± 69,4823	NS
Partie 2	543,93 ± 67,0279	337,51 ± 69,4823	NS
Partie 3	635,77 ± 67,0279	349,60 ± 69,4823	NS

Variable	Colonies hybridées	Colonies noires	p
<b>Surface de couvain ouvert d'ouvrières en</b>			
Partie 1	328,41 ± 58,9115	339,65 ± 60,9869	NS
Partie 2	521,89 ± 58,9115	784,78 ± 60,9869	<0,1
Partie 3	320,07 ± 58,9115	290,66 ± 60,9869	NS

Variable	Colonies hybridées	Colonies noires	p
<b>Surface de couvain fermé d'ouvrières en</b>			
Partie 1	889,28 ± 101,22	772,93 ± 104,83	NS
Partie 2	1501,74 ± 101,22	1824,78 ± 104,83	NS
Partie 3	794,22 ± 101,22	744,32 ± 104,83	NS



Variable	Colonies hybridées	Colonies noires	p
<b>Surface de couvain ouvert mâles en</b>			
Partie 1	36,6736 ± 13,9981	31,8390 ± 14,4345	NS
Partie 2	33,1097 ± 13,9981	10,6601 ± 14,4345	NS
Partie 3	39,6318 ± 13,9981	46,4928 ± 14,4345	NS

Variable	Colonies hybridées	Colonies noires	p
<b>Surface de couvain fermé de mâles en</b>			
Partie 1	93,9407 ± 28,3119	120,74 ± 29,3457	NS
Partie 2	90,4355 ± 28,3119	40,9348 ± 29,3457	NS
Partie 3	122,15 ± 28,3119	67,6076 ± 29,3457	NS

Variable	Colonies hybrides	Colonies noires	p
<b>Nombre de varroas en</b>			
Mai	1,0909 ± 2,8338	2,4545 ± 2,8338	NS
Juin	3,5455 ± 2,8338	6,9091 ± 2,8338	NS
Juillet	9,1818 ± 2,8338	15,3636 ± 2,8338	NS
Août	16,0909 ± 2,8338	30,6364 ± 2,8338	NS
Total	7,4773 ± 2,1296	13,8409 ± 2,1296	<0,1

Variable	Colonies hybridées	Colonies noires	p
<b>Nombre de varroas à charge initiale identique</b>			
Mai	0	0	NS
Juin	2,8333 ± 3,9208	2,1667 ± 3,9208	NS
Juillet	7,0000 ± 3,9208	7,1667 ± 3,9208	NS
Août	12,8333 ± 3,9208	23,0000 ± 3,9208	NS
Total	5,6667 ± 1,9604	8,0833 ± 1,3862	NS

Variable	Colonies hybridées	Colonies noires	p
<b>Récolte en</b>			
Mai	17,2509 ± 2,8150	0	0,0050
Juin	13,0636 ± 2,8150	10,2609 ± 2,8150	NS
Juillet	19,9945 ± 2,8150	14,8382 ± 2,8150	NS
Total	16,7697 ± 1,6252	8,3664 ± 1,6252	<0,01

Variable	Colonies hybridées	Colonies noires	p
<b>Poids cumulés en</b>			
<b>Mai</b>	0,08364 ± 0,4768	0,3582 ± 0,4768	NS
<b>Juin</b>	2,9982 ± 0,4768	4,3264 ± 0,4768	NS
<b>Juillet</b>	0,9545 ± 0,4768	0,9309 ± 0,4768	NS
<b>Août</b>	-0,7382 ± 0,4768	0,1245 ± 0,4768	NS
<b>Total</b>	0,8245 ± 0,2494	1,4350 ± 0,2494	NS

Variable	Colonies hybrides	Colonies noires	p
<b>Poids cumulés en période de mauvais temps</b>			
<b>Période 1</b>	0,08364 ± 0,4768	0,3582 ± 0,4768	NS
<b>Période 2</b>	2,9982 ± 0,4768	4,3264 ± 0,4768	NS
<b>Période 3</b>	0,9545 ± 0,4768	0,9309 ± 0,4768	NS
<b>Période 4</b>	-0,7382 ± 0,4768	0,1245 ± 0,4768	NS
<b>Total</b>	0,8245 ± 0,2494	1,4350 ± 0,2494	<0,1

# Annexe 13 : Principaux partenaires scientifiques et sponsors

---





# EFFET DE L'HYBRIDATION SUR LES PERFORMANCES APICOLES ET LE COMPORTEMENT D'*APIS MELLIFERA MELLIFERA* EN APICULTURE SÉDENTAIRE

---

**AUTEUR : Adrien PELLETIER**

## **RÉSUMÉ :**

L'hybridation de l'abeille noire est un des facteurs menaçant sa conservation. La compréhension de l'impact de l'hybridation sur les populations d'abeilles noires françaises nécessite une caractérisation de ses conséquences sur les performances apicoles des colonies. Nous avons donc comparé des colonies d'abeilles noires à des colonies d'abeilles hybridées dont l'origine génétique a été déterminée sur les plans moléculaire et morphométrique. Les colonies recrutées, qui étaient en bonne santé, ont été placées dans le même environnement et étudiées sur les principaux mois de la saison apicole.

Nos résultats montrent que l'hybridation n'améliore pas les performances apicoles de l'abeille noire, sauf pour le rendement en pollen. Au contraire, les colonies hybridées sont plus hétérogènes et semblent décorréliées du niveau de disponibilité des ressources nectarifères et polliniques de l'environnement.

Les colonies noires ont par ailleurs montré une capacité d'adaptation remarquable à un nouvel environnement et un meilleur dynamisme en période de mauvais temps. La composition des miels polyfloraux des deux groupes était similaire, mais le miel de certaines souches d'abeilles noires pourrait présenter des propriétés intéressantes.

La validation définitive des résultats de cette étude préliminaire nécessitera de recruter un échantillon de colonies de plus grand effectif et de répéter les mesures sur plusieurs saisons apicoles.

## **MOTS CLÉS :**

- APIS MELLIFERA MELLIFERA
- ABEILLE NOIRE
- HYBRIDATION
- PRODUCTION
- MIEL
- POLLEN
- COUVAIN
- PATHOGÈNE

## **JURY :**

Présidente : Pr Bénédicte Grimard-Ballif

Directeur de thèse : Pr Andrew Ponter

Examineur : Pr Radu Blaga

Invité co-encadrant : Lionel Garnery

Invité : Dr Nicolas Vidal-Naquet

# EFFET OF HYBRIDIZATION ON BEEKING PERFORMANCE AND BEHAVIOUR OF *APIS MELLIFERA MELLIFERA* IN SEDENTARY BEEKEEPING

---

**AUTHOR:** Adrien PELLETIER

## **SUMMARY:**

The hybridisation of the black honeybee is one of the factors threatening its conservation. To understand the impact of hybridisation on French black honeybee populations, it is necessary to characterise its consequences on the performance of colonies. We therefore compared colonies of black honeybees with colonies of hybridised honeybees whose genetic origin was determined on both molecular and morphometric characteristics. Twenty-two healthy colonies were used in the study and they were placed in the same environment and investigated over the main months of the beekeeping season.

Our results show that hybridisation did not improve the beekeeping performance of the black honeybee, except for the amount of pollen collected. On the contrary, the hybridised colonies were more heterogeneous and this seemed to be uncorrelated with the level of availability of nectar and pollen resources in the environment.

The black honeybee colonies also showed a remarkable capacity to adapt to a new environment and a better dynamism during bad weather. The composition of the polyfloral honeys of both groups was similar, but the honey of some strains of black honeybees might have interesting properties.

Definitive validation of the results of this preliminary study will require recruiting a larger sample of colonies and repeating the measurements over several beekeeping seasons.

## **KEYWORDS:**

- APIS MELLIFERA MELLIFERA
- BLACK BEE
- HYBRIDISATION
- PRODUCTION
- HONEY
- POLLEN
- BROOD
- PATHOGEN

## **JURY:**

Chairperson : Pr Bénédicte Grimard-Ballif

Thesis Director : Pr Andrew Ponter

Reviewer : Pr Radu Blaga

Co-supervisor guest : Lionel Garnery

Guest : Dr Nicolas Vidal-Naquet