



International Journal of Natural Resources and Environment

Journal home page: <https://ijnre.univ-adrar.dz>

ISSN 2710-8724



I
J
N
R
E

Méthodes de l'insémination artificielle des reines d'abeille : Revue

Hadjer Kouas ¹, Noureddine Adjlane ^{2*}

¹ Département d'Agronomie, Faculté des Sciences, Université M'hamed Bougara de Boumerdes. Algérie

² Département d'Agronomie, Faculté des Sciences, Université M'hamed Bougara de Boumerdes. Laboratoire de Bioinformatique, Microbiologie Appliquée et Biomolécules (BMAB), Université M'Hamed Bougara de Boumerdes

* Corresponding author: noureddine.adjlane@univ-boumerdes.dz (N. Adjlane)

Article details: Received: 14 October 2022, Revised: 10 December 2022, Accepted: 18 December 2022

Résumé:

L'insémination artificielle des reines d'abeilles (*Apis mellifera*) est devenue une méthode de routine importante dans l'élevage des abeilles. La technique a été utilisée pour la première fois en 1947. Depuis plusieurs années, l'insémination instrumentale est devenue accessible à grande échelle par des éleveurs de reines d'abeilles dans le monde entier. L'avantage de l'insémination artificielle à des fins de reproduction est évident. Dans l'accouplement naturel les reines d'abeilles s'accouplent avec plusieurs drones de génotype inconnu. Inséminé artificiellement les reines assurent des accouplements vraiment contrôlés. Par conséquent, le progrès génétique dans la sélection des programmes avec les abeilles peuvent être obtenus beaucoup plus rapidement qu'avec les accouplements naturels.

L'article fait l'objet d'une revue succincte des travaux les plus marquants concernant les progrès récents de l'insémination artificielle instrumentale des reines d'abeilles, ainsi qu'une description détaillée de la méthode de travail.

Mots clés : Abeille mellifère, insémination artificielle, reines, reproduction.

Abstract:

Artificial insemination of queen honeybees (*Apis mellifera*) has become an important routine method in honeybee rearing. In 1947, the technique was used for the first time.. For several years, instrumental insemination has become widely applied on queen honeybee by honeybee breeders around the world.

The benefit of artificial insemination for reproductive purposes is clear. In nature, queen flights honeybees mates with several unknown genotype drones. The artificially insemination of the queen honeybees guarantee a controlled mating. Therefore, genetic progress in breeding programs with honeybees can be achieved much faster than with natural mating.

The article is a brief review of the most significant works concerning recent advances in instrumental artificial insemination of queen honeybees, as well as a detailed description of the working method.

Keywords: Honey bee, artificial insemination, queens, reproduction.

1- Introduction

L'importance de l'abeille domestique pour l'environnement et l'humanité est indéniable. Une pollinisation efficace des plantes permet le maintien de la diversité et assure une qualité de mise à fruit optimale des cultures. L'abeille procure également à l'Humain des produits de la ruche comme le miel, le pollen, la propolis et la gelée royale, qui présentent des vertus nutritionnelles importantes. L'Apiculture a connu un développement considérable par la modernisation des moyens d'élevage et une amélioration des méthodes de conduite du rucher par l'introduction de nouvelles techniques d'élevages pour l'accroissement des rendements des produits de la ruche. Néanmoins plusieurs contraintes freinent l'essor de l'activité apicole comme celles liées au climat, mais aussi les problèmes liés à l'abeille. Cependant, la reproduction chez l'abeille, ne peut être contrôlée en raison des accouplements qui se passent loin de la ruche en vol nuptial, on ne connaîtra jamais l'origine ou le nombre des mâles qui ont fécondé la reine, de ce fait, le seul moyen permettant d'effectuer une sélection fiable, est la pratique de l'insémination artificielle. Les premiers succès de la technique de l'insémination appliquée aux reines d'abeilles remontent à 1927, elle consiste à prélever du sperme de faux bourdons sélectionnés et d'inséminer la reine sélectionnée au laboratoire [1]. A partir de cette date, plusieurs chercheurs dans le monde ont inventés et essayé plusieurs modèles d'insémination afin d'assurer au maximum la formation d'une reine fécondée.

Cette technique qui commence à promouvoir en Algérie grâce à certains apiculteurs et associations apicoles. A travers des formations et des essais sur des colonies locales dans quelques zones d'Algérie. La présence de deux races d'abeilles locales *Apis intermissa* et *Apis sahariensis* constituent une autre motivation pour le développement de cette technique afin de préserver et de protéger les races locales.

L'objectif de notre travail est d'élaborer une revue bibliographique sur cette technique, toute en présentant les méthodes d'inséminations et les étapes à suivre par un apiculteur pour la réussite de cette opération.

2. Matériels et Méthodes

2.1. Buts recherchés de l'insémination artificielle

Guth (2008)[2], a indiqué que par l'insémination, on peut garantir une fécondation sûre et renouvelable de reines porteuses des propriétés recherchées par des mâles d'une descendance dont les aptitudes sont également connues. L'insémination n'est que le moyen d'atteindre ce but. Le véritable travail réside dans la sélection des reines et des mâles qui doivent être reproduits. Les résultats de ces fécondations sont à vérifier par rapport aux caractéristiques d'élevage recherchées [1].

2.2. Matériel d'insémination artificielle

D'après Cobey et al (2013)[3], la technique de base de l'insémination artificielle n'a pas beaucoup changé depuis son développement dans les années 50. La compétence exige de la pratique, de la précision, et les conditions sanitaires. Les compétences apicoles spécialisées et soins appropriés des reines et des mâles sont essentiels au contrôle de la qualité [4]. Plusieurs options d'instrumentation sont actuellement disponibles, qui offrent le choix mais peuvent varier en qualité et manquent de standardisation. L'instrument de base se compose d'un support, un ensemble de crochets, un ensemble de support de reine, une seringue avec un aiguille, un crochet dorsal et ventral (figure 01). Le support de microscope doit être compatible avec l'instrument et fournir une profondeur de champ et d'instrument suffisante (figure 02). Une source de lumière froide est également recommandée pour éviter chauffage et séchage. Une source de dioxyde de carbone avec régulateur de débit et des tubes flexibles vers l'instrument sont également nécessaires [5].

H. Kouas et al.

Les exigences en matière d'équipement comprennent :

- Instrument d'insémination complet, y compris un instrument support, manipulateurs, seringue et accessoires (disponibles par le biais de sociétés d'approvisionnement spécialisées en abeilles), microscope binoculaire stéréozoom, (10X à 20X), et lumière froide
 - Source de dioxyde de carbone avec régulateur de débit et tube
 - Sérum physiologique
 - Flacons stériles
 - Pipettes et ampoule ou seringues
 - Eau distillée
 - 95% d'éthanol
 - Hypochlorite de sodium
 - Autoclave ou autocuiseur (pour stérilisation)
 - Cages royales
 - Cages de retenue et une boîte de vol de faux bourdons.

Les cages de maintien de mâles sont faites de matériau d'exclusion de reine pour les abeilles ouvrières peuvent s'en occuper lorsqu'elles sont détenues dans des pépinières. Les cages peuvent varier en taille, bien qu'elles doivent être dimensionnées pour s'adapter à un cadre placé dans les colonies de pépinière et s'intègre facilement dans une boîte de vol. Les faux bourdons sont libérés dans la boîte de vol pour un accès facile pendant la collecte de sperme [6].

2.3 Procédure générale de l'insémination artificielle

La procédure proposée par Büchler et al (2013)[7], consiste à anesthésier et immobiliser une reine des abeilles, en ouvrant manuellement sa chambre de piqûre et en injectant le sperme prélevé du bourdon dans son orifice vaginal avec une seringue.

Au-delà de la maîtrise des techniques d'insémination, les étapes nécessaires pour mener avec succès l'insémination artificielle chez les abeilles mellifères nécessitent de :

- Appliquer la connaissance des principes de sélection.
- Comprendre les défis uniques de travailler avec un super-organisme diploïde-haploïde.
- Sélectionner pratiquement les méthodes appropriées et tenir des registres.
- Acquérir les ressources, la main-d'œuvre et un engagement envers un programme de sélection.
- Apprendre des compétences avancées en apiculture, comme l'élevage des reines et la production des faux bourdons.

2.4. Formules de diluant salin (le sérum physiologique)

Le sérum physiologique est un diluant salin sert à :

- La nutrition des spermatozoïdes.
- Remplissage et fonctionnement de la seringue.
- Empêcher la dessiccation du sperme dans la pointe capillaire par l'aspiration d'une goutte d'obturation [8].

H. Kouas et al.

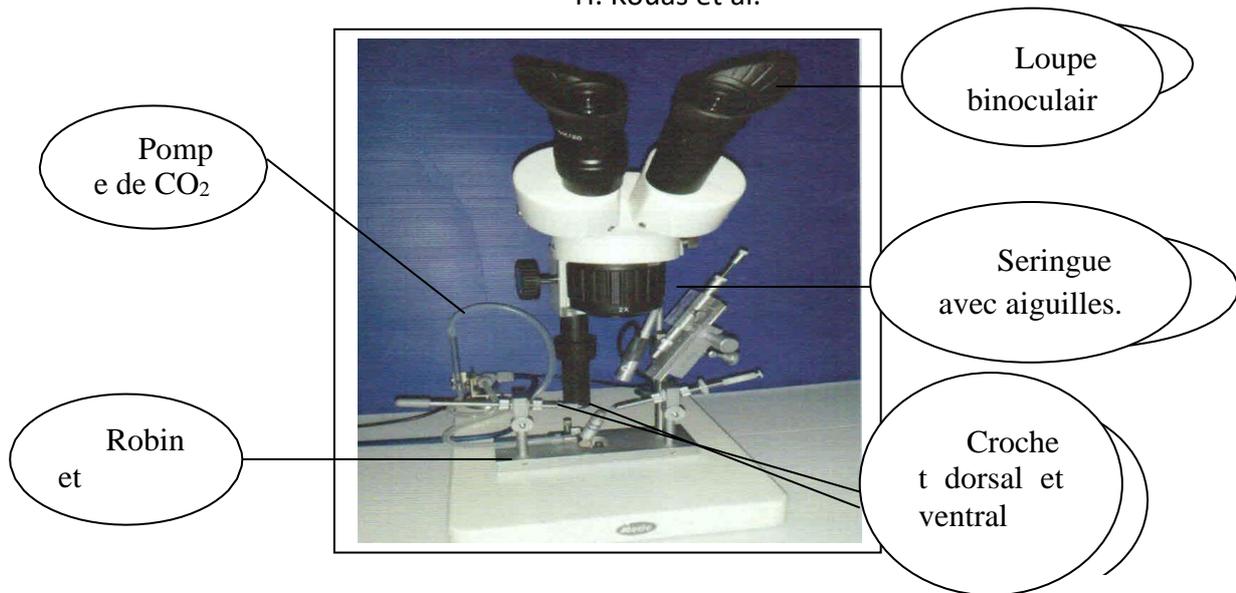


Figure 1. Appareil d'insémination [9]. (BATY, 2014)

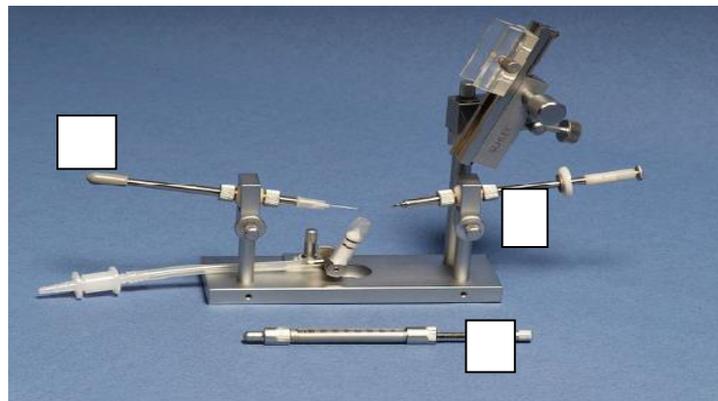


Figure 2. Crochets dorsal et ventral, seringue [10].

A : crochet ventral ; B : crochet dorsal ; C : seringue

2.4.1. La formule simple (Tampon)

Elle est recommandée pour l'insémination avec du sperme frais collecté et utilisé pour l'insémination le même jour. D'après Verma (1978) [11] et Harbo et Williams (1982) [12], elle est composée de :

- 1.11g NaCl
- 0.10 g Glucose
- 0.01g L-Arginine
- 0.35 g Trizma HCl
- 0.01g L-Lysine

Avec les additifs :

- 0,02g de Sulfate-Dyhydrostreptogycine
- 0,012g de Pénicilline-C-Sodium dilué dans 100ml d'eau distillée à un pH 8.7.

2.4.2. La formule complexe (KIEV)

Elle est recommandée lors du mélange et de la conservation du sperme, y compris le stockage à des températures supérieures à zéro et dans un liquide azote.

Cette formule est l'association de ces constituants :

- 2.43g citrate de sodium hydrate
- 0.21g bicarbonate de sodium hydrate
- 0.04g chlorure de potassium
- 0.30g sulfanilamide
- 0.30g glucoses
- Solution diluée à 90°C dans 100ml d'eau distillée.

2.5. Principales étapes d'insémination artificielle

2.5.1 Réglage de l'appareil d'insémination

D'après Ruttner (1977) [13], il est très important avant de mettre en place la reine de vérifier les paramètres suivants :

- Réglage de l'inclinaison du système de contention par rapport au plan horizontal Inclinaison 70°, une fois réglée à l'aide d'un gabarit, serrer la vis pour la fixer.
- Réglage de la seringue : pointe du capillaire positionné sur l'ouverture du tube de contention, seringue bien fixée.
- Réglage de tout le système sous la binoculaire : position bien centrée.
- Réglage des crochets : la position des crochets doit être horizontale par rapport à la reine ouverte.
- Réglage de la luminosité permet de bien viser l'orifice vaginal.
- Débit de CO₂ ne doit pas être régulier, lent ni rapide. on vérifie que le CO₂ atteint le tube de contention, les bulles d'air et leur bruit émis permettent de contrôler le débit.
- Un appareil non ou mal réglé avant la mise en place de la reine, risque la blessure et la perte de celle-ci et l'échec de l'insémination.

2.5.2 Transfert des mâles au laboratoire

La récolte des mâles matures se fait par le moyen d'une hausse déposée sur la ruche à mâles. Le trou de vol est fermé, ce qui les empêche de quitter leur ruche. Selon Cobey (2013)[3], les mâles matures peuvent être capturés la veille ou le jour d'insémination en capturant des mâles revenant d'un accouplement raté aux vols, ou les collecter au niveau de la colonie et les stocker dans une chambre de vol (figure 3). En outre, ils peuvent être collectés immédiatement après l'émergence (c'est-à-dire capturer des mâles nouvellement enfermés) et stockés dans des cages placées dans une colonie de banque (une autre colonie d'abeilles mellifères qui s'occupera des mâles [7]).

La récolte des mâles doit être abondante. En théorie 08 mâles fournissent la dose suffisante de sperme pour inséminer une reine, cependant en pratique, il faut un nombre important de mâles pour la simple raison que ces derniers peuvent être tantôt immatures, tantôt souillés, tantôt stériles. Les meilleurs mâles utilisés sont ceux âgés entre 16 et 23 jours [12]

2.5.3. Prélèvement du sperme

Henri (2011)[14], a considéré le prélèvement du sperme comme l'une des difficultés de l'insémination. Cette récolte se fait sur des mâles prélevés dans des ruches sélectionnées, âgés de 10 à 20 jours. Au-delà, ils sont considérés comme trop âgés. On aspire, dans le capillaire, du sérum physiologique sur une longueur d'environ 20mm à l'aide de la pompe seringue qui doit être stérilisée auparavant, puis on introduit une petite bulle d'air de 2 à 3mm, qui isole le sperme du sérum physiologique [15].

H. Kouas et al.

Le pompage du sperme peut alors commencer. Afin d'obtenir l'érection de l'appareil génital du mâle, on presse légèrement l'abdomen entre les doigts (le pouce et l'index). L'éjaculation fait apparaître, à l'extrémité de l'endophallus, le sperme de couleur crème, qui se distingue très bien du mucus (blanc) (voir figure 1).

Lors du pompage, la difficulté consiste à prélever le sperme sans aspirer le mucus susceptible de boucher le capillaire. Les 8 à 10 ml de sperme nécessaires pour inséminer une reine devront être pompés sur 10 à 20 mâles, suivant leur maturité [16]. Selon Cobey et al., (2013)[3], l'évaluation de la maturité du faux bourdon et de la qualité du sperme doit être déterminée instantanément : tout faux bourdon qui ne se réveille pas correctement ou qui ne présente pas suffisamment de sperme sur l'ampoule doit être jeté. Sachant que, chaque faux bourdon produira environ 1 μ l de sperme. Le volume standard de sperme pour inséminer une reine est d'environ 8 à 12 μ l. Il est recommandé de garder les mâles au chaud et bien nourris jusqu'à ce qu'ils soient utilisés [17].

2.5.4. Méthode de conservation de sperme

On peut mettre à profit une technique de conservation de sperme de mâles, mise au point par plusieurs chercheurs. Ainsi, l'époque d'élevage des mâles par rapport à celle des reines n'a plus d'importance. En 1980, la station expérimentale apicole de Baton-Rouge, en Louisiane, utilisait les méthodes de conservation de sperme suivantes :

Pour de courtes durées (deux semaines) : à 15°C dans des capillaires de verre fermes aux extrémités par de la vaseline.

Pour de longues périodes : à 196°C dans l'azote liquide. Le sperme est récolté et additionné d'une solution saline de sulfoxyde de diméthyle et mis dans des capillaires en plastique bouchés aux deux bouts par de la vaseline, puis refroidi à la vitesse de 5°C, par minute ; la solution contient 60 % de sperme, 10 % de sulfoxyde de diméthyle et 30 % d'eau salée (0,85 % de NaCl). Paillard et al (1979) [18] avait déjà décrit cette méthode de congélation et de conservation de sperme et il y spécifiait que l'on utilise une micro-seringue hydraulique reliée à un compteur pour mesurer exactement le volume de sperme prélevé, sa dilution et son débit, et un micro-thermocouple introduit dans le liquide [19, 20, 21,22,23].

2.5.5 . Manipulation des reines

a. Préparation des reines à l'insémination

Les reines naissent dans des petites ruches dont le trou de vol est fermé par une grille à reine, pour les empêcher de s'échapper. La maturité sexuelle varie selon les auteurs (6 à 9 jours) et son importance est primordiale pour la sélection des reines [3]. La reine doit être capturée 24 heures avant l'insémination (Figure 3), et transférée au laboratoire dans une cagette à reine et anesthésiée, puis réintroduite dans sa ruchette, cette opération est nécessaire pour faciliter l'ouverture des organes de la reproduction le jour suivant ou accélérer sa maturité [24].

b. Anesthésie et mise en place de la reine

Une dizaine de minutes avant l'insémination, selon Woyke et Jasinski (1992)[25], la reine est de nouveau capturée, elle est introduite la tête la première dans un tube de contention relié au CO₂ quatre à cinq secondes suffisent pour qu'elle cesse de bouger. Le crochet ventral écarte le sternite, puis l'aiguillon est enfilé dans le crochet dorsal perforé (Figure 4). Une simple traction de quelques millimètres sur ce crochet permet de libérer la chambre vaginale de la reine (figure 5 et 6).

La pointe du capillaire contenant le sperme doit être humidifiée pour en faciliter le glissement.

Les voies de la reine étant ouvertes, on introduit le capillaire sur environ 1.5 mm dans le vagin en poussant la valvule vaginale, et on injecte les 8 à 10 ml de sperme [26] .

H. Kouas et al.

D'après Ruttner (1966), le système d'anesthésie comprend (figure 7) :

- Une bouteille de CO₂ ;
 - Un dispositif relié au tube de contention avec réglage du débit ;
- Une fiole reçoit le CO₂ et le renvoie à travers un autre tuyau vers le tube de contention.

Grâce à ce système, un contrôle du débit visuel et auditif est effectué à travers l'observation des bulles d'air émises dans la fiole et de leur rythme.

c. Remplissage de la spermathèque

D'après Henri (2011)[14] et Cobey et al (2013)[3], on propose la procédure suivante :

La seringue et le porte-reine doivent être alignés sur l'instrument en tenant un angle de 30 ° à 45 ° (en fonction de l'instrument utilisé) pour faciliter le contournement de la valvofold (la valvule vaginale).

- Avant la descente du capillaire, il convient d'éliminer, en refoulant sur un coton-tige stérile, la goutte de diluant fermant le capillaire, ainsi que la bulle d'air qui sépare le sperme du diluant.

Agir par la suite, sur le micro vis de la pompe jusqu'à ce que le sperme apparaisse à la pointe du capillaire.

- Descendre ensuite lentement ce dernier jusqu'à toucher les téguments de l'orifice vaginal (0.5 à 1 mm), en agissant sur les micros vis de commande. En est-ouest ou en nord-sud, pour bien centrer le capillaire.

- Utiliser la pointe de la seringue par la suite pour soulever le pli de la valvule vaginale, en appliquant un mouvement en zigzag.

- La main droite reste à la commande du capillaire, en appliquant une légère pression sur le piston de la pompe, et livrer une quantité mesurée de sperme (8 à 12µl) directement dans le oviducte médian (figures 8 et 9).

- Après l'insémination, couper le CO₂, retirer l'embout de la seringue, et libérer ensuite la reine en enlevant d'abord le crochet ventral pour détendre la reine, puis le dorsal.

- Faire sortir la reine du tube de contention, en la secouant au-dessus de la main en évitant de la toucher ou d'appuyer sur son abdomen

- Il convient de prélever un petit espace aérien et petite goutte de solution saline, (~ 0,5 µl) pour précéder à la prochaine insémination et éviter tout résidu du sperme.

- Au cours des 24 heures qui suivent, le sperme, refluant par l'oviducte médian pénètre dans la spermathèque par le Ductus spennaticus. On ne connaît pas encore exactement les détails de ce phénomène. Il est évident que la reine y contribue activement en exerçant une pression. Le rôle de la valvule vaginale consiste, dans cette phase, à empêcher que le sperme soit expulsé vers l'extérieur au lieu de migrer vers la spermathèque [27]. Cette obturation du vagin n'est cependant qu'incomplète. De grandes quantités de sperme sont évacuées dans la chambre de l'aiguillon, d'où elles sont bientôt éjectées sous forme de « bâtonnets » desséchés. On considère, en général, que seulement 10 % de la quantité de sperme introduite dans les oviductes atteignent la spermathèque, tant par l'insémination artificielle que par copulation naturelle [28].

d. Clippage et marquage de la reine

La reine est ensuite marquée et clippée (on lui coupe une aile). En effet, même inséminée, elle conserve l'instinct du vol de fécondation. Pour déclencher rapidement la ponte, une seconde anesthésie est faite vingt

H. Kouas et al.

quatre heures après. La prolificité de ces reines inséminées ne marque pas de différence par rapport aux reines fécondées naturellement [29].

e. Dissection de champ de la spermathèque

Lors de l'apprentissage de la procédure d'insémination, il est utile de vérifier la spermathèque pour déterminer le degré de réussite de l'insémination. Pour cela, Cobey et al (2013)[3], ont proposé la procédure suivante :

1. Sacrifiez la reine en lui écrasant la tête et le thorax.
2. Saisissez les segments abdominaux terminaux de la reine, dorsalement et ventralement.
3. Tirez et séparez les segments terminaux du reste du corps de la reine, avec vos ongles ou des pinces.
4. Sortez la spermathèque de la cavité corporelle avec votre vignette ou forceps.
5. Pour retirer le filet trachéal, faites doucement rouler la spermathèque entre vos doigts. Le filet s'effondrera en une petite masse blanche.

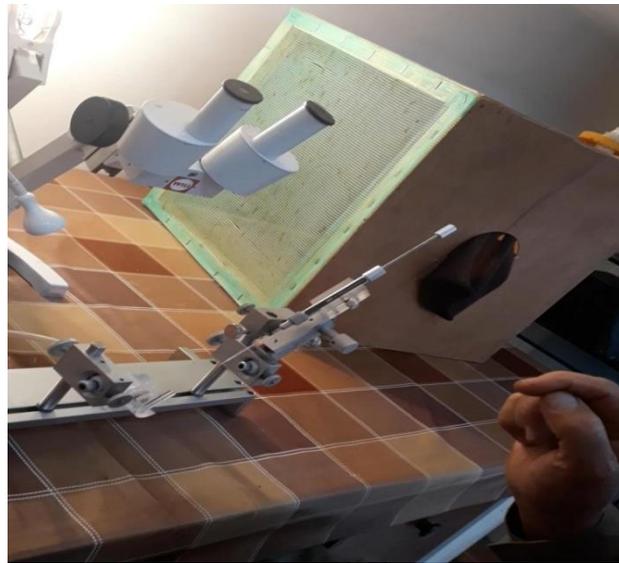


Figure 3. La chambre de vol pour faux- bourdons (photo personnelle).



Figure 4. Prélèvement du sperme



Figure 5. La mise en place de la reine .

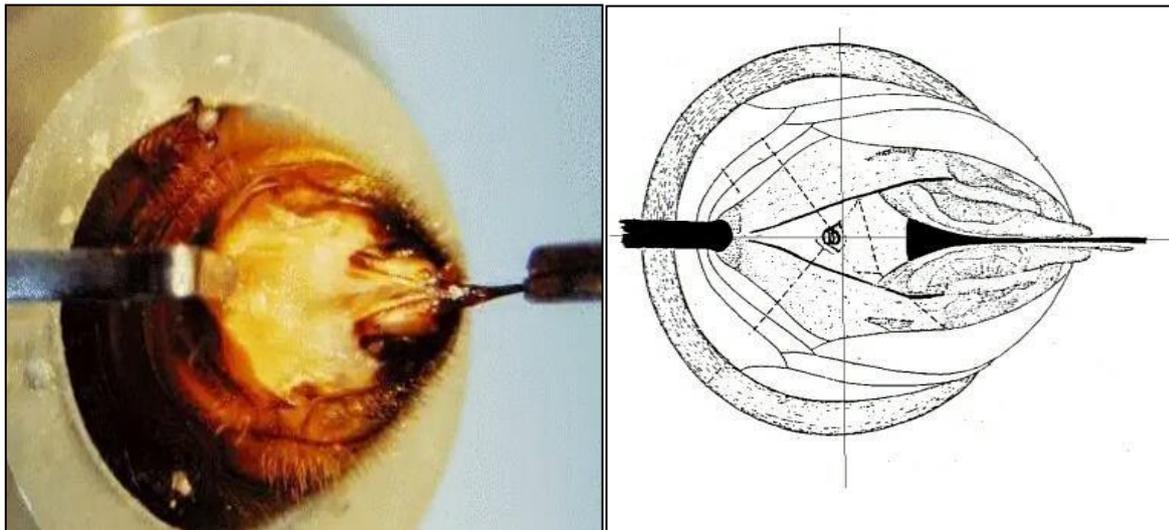


Figure 6. Photo et Schéma représentent la chambre vaginale après l'écartement des deux crochets ventral et dorsal [30].

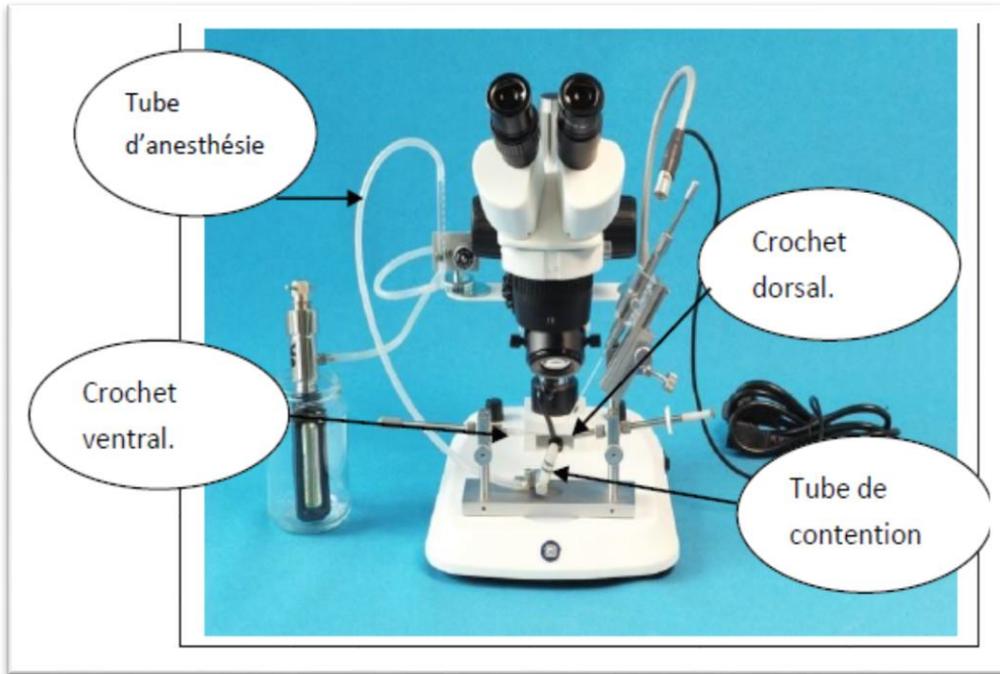


Figure 7. Système d'anesthésie [31]

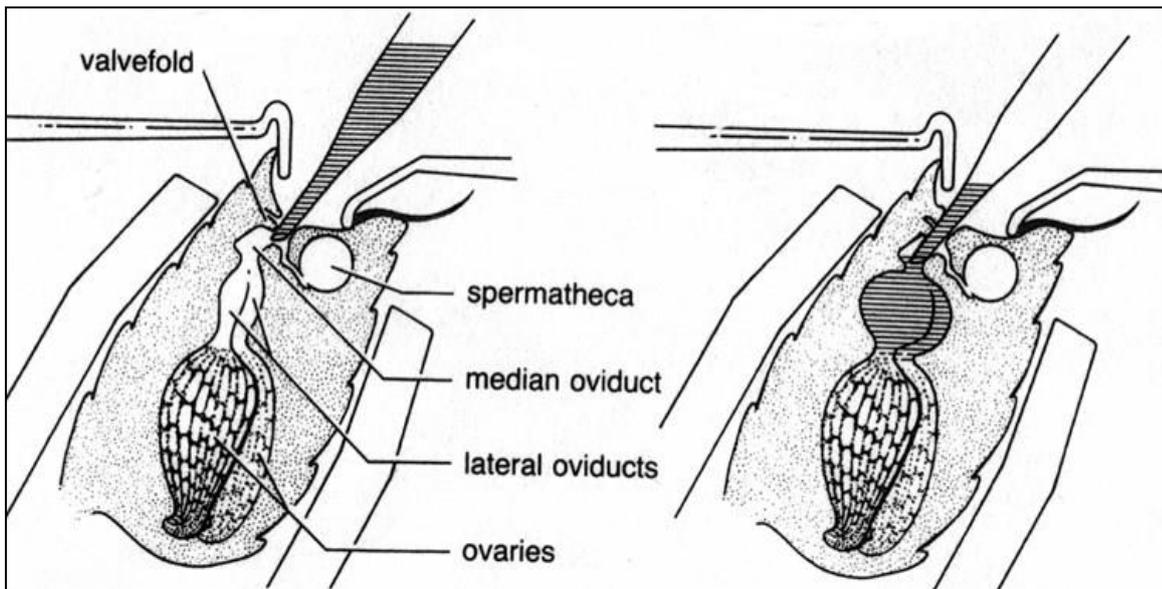


Figure 8. Remplissage des oviductes par le sperme.

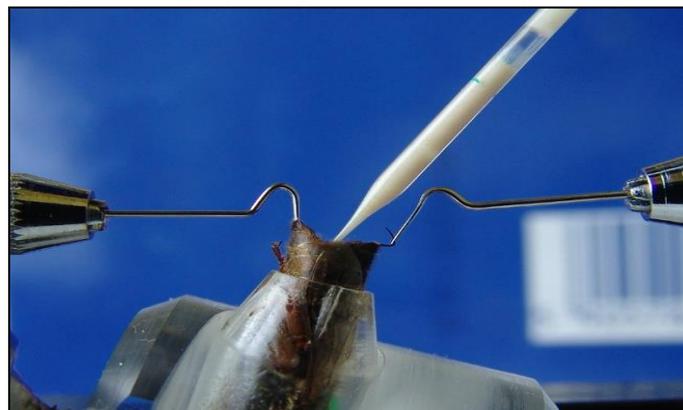


Figure 9. Dépôt de sperme dans la chambre vaginale [9].

Conclusion

La technique d'insémination nécessite la réunion de l'ensemble des conditions citées, une seule faille dans ce système mènerait à un échec certain. Le travail d'élevage est un travail programmé, commençant par la sélection des géniteurs parentaux, élevage des mâles, élevage des reines, et finissant par l'insémination de la nouvelle génération. De même, la récolte du sperme constitue le maillon principal dans cette chaîne, sa maîtrise demande beaucoup de pratique et de patience. Le succès de la technique d'insémination dépend d'une longue pratique, car malgré toutes les précautions prises, un pourcentage d'échec est toujours enregistré, seules la manipulation et l'expérience permettent la maîtrise de tous les paramètres, sa réussite par contre permettra de lancer une sélection plus efficace pour l'amélioration de l'abeille.

Les apiculteurs qui pratiquent l'insémination artificielle pour leur élevage de reines sont très rares bien qu'elle se démocratise...cette technique très couteuse sera peut-être utilisée dans le futur par les amateurs sur une large échelle. Pour l'instant elle est très peu pratiquée commercialement mais dans le cadre des travaux de sélection ; elle l'est couramment. Les abeilles peuvent avoir de nouveaux potentiels et un bel avenir avec leurs reines fécondées artificiellement. La généralisation de la technique d'insémination artificielle en Algérie nécessite des efforts des instituts de vulgarisation et des associations apicoles pour le développement de cette technique chez les apiculteurs. Il est très important aussi de programmer des journées de formations pour les zootechniciens afin de bien maîtriser cette technique.

Références bibliographiques

- [1] A.M. Collins, « Relationship between semen quality and performance of instrumentally inseminated honey bee queens ». *Apidologie*, vol. 31, n°3, pp. 421-429, 2000.
- [2] J. Guth, « Revue l'Insémination Artificielle des Reines d'Abeilles ». Les Annales de l'Abeille, INRA éditions, vol. 9, n° 3, pp. 251-263, 2008
- [3] S.W. Cobey, D.R. Tarpy, J. Woyke, "Standard methods for instrumental insemination of *Apis mellifera* queens." *Journal of Apicultural Research*, Vol. 52, n° 4, pp. 1-18, 2013
- [4] R.O. Stoian, C. Mălinaş, M. Botha and IV. Petrescu-Mag, « Technical, sanitary and environmental sequences to improve artificial insemination of honey bee, *Apis mellifera*. Part I.
- [5] A.M. Collins, A.M. Donoghue, « Viability assessment of honey bee, *Apis mellifera* sperm using dual fluorescent staining ». *Theriogenology*, vol. 51, n° 8, pp. 1513-1523, 1999.
- [6] A.M. Collins, « Sources of variation in the viability of honey bee, *Apis mellifera* L., semen collected for artificial insemination ». *Invertebrate Reproduction and Development*, Vol. 45, n° 3, pp. 231-237, 2004.
- [7] R. Büchler, S. Andonov, K. Bienefeld, C. Costa, F. Hatjina, N. Kezic, P. Kryger, M. Spivak, A. Uzunov and J. Wilde, « Standard methods for rearing and selection of *Apis mellifera* queens », *Journal of Apicultural Research*, vol. 52, n°1), 2013.
- [8] V. Dietemann, J.D. Ellis, P. Neumann, "The COLOSS BEEBOOK, Volume I: standard methods for *Apis mellifera* research. *Journal of Apicultural Research*, Vol 52, n°4, 2013, DOI 10.3896/IBRA.1.52.4.2.
- [9] G. Baty, Bulletin de l'Association Nationale des Eleveurs de Reines et des Centres d'Elevage Apicoles, 3eme trimestre n°107, 2014
- [10] J. Woyke, "Problems with queen banks". *American Bee Journal*, vol. 124, n°4, pp. 276-278, 1988.
- [11] L.R. Verma, "Biology of honeybee (*Apis mellifera* L.) spermatozoa. 1. Effect of different diluents on motility and survival." *Apidologie*, vol. 9, n°3, pp. 167-174, 1978.
- [12] J.R. Harbo, J.L. Williams, « Effect of above-freezing temperatures on temporary storage of honeybee spermatozoa ». *Journal of apicultural research*, vol. 26, n°1, pp. 53-55, 1987.
- [13] F. Ruttner, "selection—a basic problem for the progress of the present day apiculture." *Revue*

mensuelle d'information et de techniques apicoles, 1977.

- [14] C. Henri, Le traité rustica de l'apiculture. France : rustica editions, 2011.
- [15] A.N. Payne, J. Rangel, « The effect of queen insemination volume on the growth of newly established honey bee (*Apis mellifera*) colonies ». *Apidologie*, vol. 49, n°5, pp. 594-605, 2018.
- [16] M. Lodesani, D. Balduzzi, A. Galli, « Functional characterisation of semen in honeybee queen (*Apis mellifera*) spermatheca and efficiency of the diluted semen technique in instrumental insemination ». *Italian Journal of Animal Science*, vol. 3, pp. 385-392, 2004.
- [17] J. Woyke, « Why the eversion of the endophallus of honey bee drone stops at the partly everted stage and significance of this ». *Apidologie* vol. 39, n° 6, pp. 627-636, 2008.
- [18] Paillard, M., Rousseau, A., Giovenazzo, P., & Bailey, J. L. Preservation of domesticated honey bee (Hymenoptera: Apidae) drone semen. *Journal of economic entomology*, 110(4), (2017). 1412- 1418.
- [19] J. Woyke, « Dynamics of entry of spermatozoa into the spermatheca of instrumentally inseminated queen honey bees ». *Journal of Apicultural Research*, vol. 22, pp. 150-154, 1983.
- [20] H.E.A. Schluns, J. Schluns, V. Praagh, R.F.A. Moritz, « Sperm numbers in drone honeybees (*Apis mellifera*) depend on body size ». *Apidologie*, vol. 34, n°6, pp. 577-584, 2003.
- [21] Z.S. Nur, B. Seven-Cakmak, I. Ustuner, M. Cakmak, Cl. Erturk, H. Abramson, M. Sagirkaya, K. Soylu, « The use of the hypo-osmotic swelling test, water test, and supravital staining in the evaluation of drone sperm ». *Apidologie*, vol. 43, n°1, pp. 31-38, 2012.
- [22] J.T. Pieplow, J. Brausse, J.P. van Praagh, R.F.A. Moritz, S. Erler, "A scientific note on using large mixed sperm samples in instrumental insemination of honeybee queens." *Apidologie*, vol. 48, n° 5, pp. 716-718, 2017.
- [23] M. Paillard, A. Rousseau, P. Giovenazzo and J.L. Bailey, « Preservation of domesticated honey bee (Hymenoptera: Apidae) drone semen ». *Journal of economic entomology*, vol. 110, n°4, pp. 1412-1418, 2017.
- [24] J. Woyke, « Problems with queen banks ». *American Bee Journal*, vol. 124, n°4, pp. 276-278, 1988
- [25] J. Woyke and Z. Jasinski, « Natural mating of instrumentally inseminated queen bees ». *Apidologie* Vol. 23, n° 3, pp. 225-230, 1992.
- [26] J. Prodělalová, E. Čukanová, R. Moutelíková and D. Titera, « Risk of honeybee viruses spreading during artificial insemination of queen bees ». *Veterinářství*, vol. 67, n°7, pp. 554-558, 2017.
- [27] J.L. Yániz, M.A. Silvestre and P. Santolaria, « Sperm quality assessment in honey bee Drones ». *Biology*, vol. 9, n°7, 174p, 2020.
- [28] S.J. Locke, Y.S. Peng, « The effects of drone age, semen storage and contamination on semen quality in the honey bee (*Apis mellifera*) ». *Physiological Entomology*, vol. 18, n° 2, pp. 144-148, 1993.
- [29] J. Woyke, « Three substances ejected by *Apis mellifera* drones from everted endophallus and during natural matings with queen bees ». *Apidologie*, vol. 41, n°6, pp. 613-621. 2010
- [30] S.W. Cobey, "Comparison studies of instrumentally inseminated queens and naturally mated queens and factors affecting their performance". *Apidologie*, vol. 38, pp. 390-410, 2007.
- [31] A. Khenfer, « élevage de reines », Institut Technique Des Elevages (ITELV), Baba Ali. 2007.