

Utilisation de puces RFID pour le suivi des abeilles

Pierrick Aupinel¹, Mickaël Henry², Axel Decourtye³

Résumé. La technologie RFID (radio frequency identification) est aujourd'hui largement utilisée pour identifier des objets ou des animaux à un endroit donné. La miniaturisation des tags transpondeurs permet le marquage d'organismes de plus en plus petits, tels que les abeilles. Depuis 2008, l'Unité expérimentale d'Entomologie de l'INRA du Magneraud (Centre Poitou-Charentes) collabore avec l'ACTA (Association de coordination technique agricole) pour développer cette technique afin de rendre possible l'enregistrement des comportements individuels d'entrée et de sortie de ruche d'un grand nombre d'individus dans diverses conditions. Cette technique est aujourd'hui opérationnelle et a fait l'objet de travaux originaux. Elle est en cours de standardisation dans le cadre des procédures d'homologation des pesticides.

Mots clés : marquage individuel, radio frequency identification, abeille

Introduction

Le suivi spatiotemporel des animaux fournit des informations utiles pour mieux connaître leurs traits d'histoire de vie, qui renseignent sur des fonctions importantes telles que leur mode d'alimentation ou de reproduction. A cette fin, beaucoup de techniques ont été développées ou adaptées à la morphologie de l'organisme étudié et à son milieu. La technique du « radio tracking » qui consiste à fixer sur un animal un microémetteur puis de suivre ses déplacements sur son territoire à l'aide d'une antenne mobile est probablement le dispositif le plus ancien et le plus utilisé. Plus récemment, les scientifiques ont adapté des balises Argos pour suivre les déplacements des espèces migratrices à l'échelle mondiale. Bien que ces systèmes soient très performants et renseignent en temps réel sur la position d'un organisme dans l'espace, ils utilisent des dispositifs embarqués actifs, c'est-à-dire nécessitant une batterie, ce qui limite de ce fait leur usage à des animaux de taille respectable, et les rend donc inadaptés aux organismes de petite taille tels que les insectes. Pour ces derniers, il convient d'utiliser des systèmes moins encombrants, et surtout légers dès lors qu'il s'agit d'étudier des insectes volants. Le radar harmonique, utilisé notamment pour enregistrer les déplacements de l'abeille domestique *Apis mellifera* dans l'espace (Carreck et al., 1999), répond à ces exigences. Le réflecteur fixé sur le thorax des individus est dépourvu d'alimentation et d'un poids relativement faible (entre 10 et 15 mg). Bien que ce dispositif permette une localisation précise, il présente quelques inconvénients. Tout d'abord son encombrement et son poids (environ 10 % du poids d'une abeille ouvrière) peuvent induire des biais comportementaux non négligeables. Sa détection est sensible à la présence d'obstacle, ce qui limite son usage à des environnements particuliers (ex : absence d'arbres). Enfin, ce système permet le suivi d'un seul individu sur un pas de temps assez court (quelques heures). Bien que ne permettant pas de localiser à chaque instant les individus, la technique RFID (radio frequency identification) offre de multiples avantages pour étudier les traits d'histoire de vie des insectes, et en particulier de l'abeille domestique. Son faible poids (moins de 3 mg), sa taille réduite (environ 2 mm²), et la possibilité d'enregistrer automatiquement sur plusieurs semaines les allées et venues de groupes de plusieurs centaines d'individus nous ont conduit dès 2008, en partenariat avec l'ACTA (Association de coordination des techniques agricoles) à opter pour cette technologie.

Matériel et méthodes

Principe du RFID

La RFID (radio frequency identification) est une technologie qui permet de récupérer et mémoriser des données à distance en utilisant des marqueurs appelés tags (étiquettes) ou transpondeurs. Ces tags peuvent être collés, incorporés dans des objets, ou implantés dans des animaux. Ils sont constitués d'une antenne associée à une puce électronique qui leur permet de recevoir et de répondre aux requêtes radios émises depuis un émetteur-

1 Entomologie, INRA, 17700 Surgères, France

2 Abeille et Environnement, INRA, 84914 Avignon, France

3 Association de Coordination technique agricole, Site Agroparc, 84914 Avignon, France
pierrick.aupinel@inra.fr

récepteur. Cet émetteur est lui-même relié à un ordinateur chargé de stocker les données lues et d'alimenter des bases de données (Figure 1).

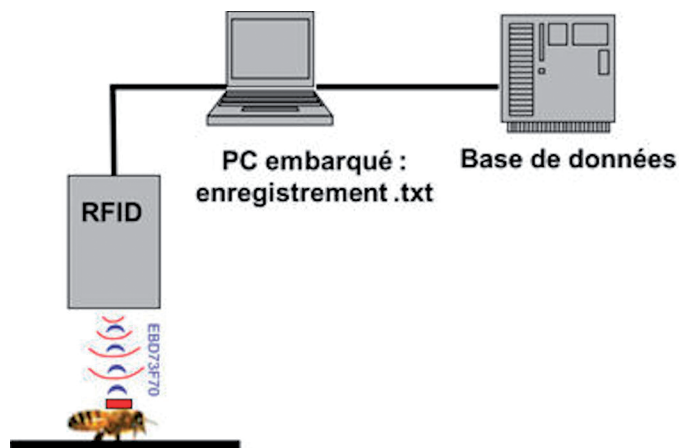


Figure 1. Principe du RFID (Streit et al., 2003).

Les tags RFID

Les fabricants de tags ont développé divers modèles selon les domaines d'application. On classe les RFID en quatre catégories de fréquence : basses fréquences (BF), hautes fréquences (HF), ultra hautes fréquences (UHF) et super hautes fréquences (SHF) (Tableau 1).

Tableau 1. Fréquences RFID et exemples d'utilisation

Fréquence	BF < 135 kHz	HF 13.56 MHz	UHF 850 - 960 MHz	SHF 2.4 - 2.5 GHz
Type de Tag	Passif	La plupart passif	Passif, semi-passif, semi-actif, actif	Actif, semi-actif
Distance de lecture	Courte ~ 50 cm	Moyenne ~ 1 m	Longue 6-8 m	Longue > 10 m
Exemples d'applications	Contrôle d'accès, identification de biens ou d'animaux, antivol	Contrôle d'accès, smart cards, transport public, bibliothèque, ePass	Monitoring du trafic, logistique, bagages transport aérien, magasins, EPC	Péage, tracking de containers, voitures, wagons

Les distances de lecture indiquées dans le **Tableau 1** relèvent d'applications courantes pour lesquelles la taille des tags ne constitue pas une contrainte particulière. La miniaturisation des transpondeurs interdisant toute possibilité d'utiliser des systèmes actifs, avec de plus un effet sur la puissance du signal émis, réduit significativement cette caractéristique.

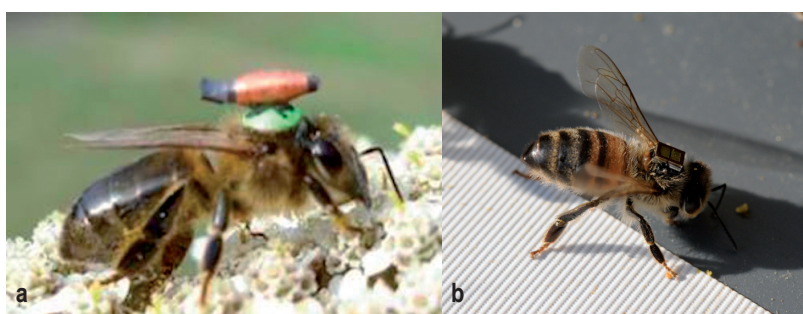


Figure 2. Tags RFID sur abeille a) 1^{re} génération ; b) 2^e génération (photos : ACTA).

Du fait de leur encombrement (5,5 x 1,7 mm) et de leur poids (28 mg), les premiers tags que nous avons testés ne pouvaient pas être dénués d'effet sur le comportement des individus marqués (**Figure 2a**). De plus, leur forme ovoïde nécessitait l'usage d'une pastille intermédiaire pour un collage efficace, alourdissant encore le dispositif. Ces tags appartenant à la catégorie des basses fréquences (134,2 kHz) étaient lisibles par une antenne à une distance de l'ordre de 1 cm. D'une dimension plus réduite (1,6 x 1 mm), d'un moindre poids (2,4 mg) et d'une forme mieux adaptée, la seconde génération de tags (**Figure 2b**) lisibles dans le domaine des hautes fréquences (13,56 MHz) constitue un encombrement moindre pour l'abeille. Toutefois cette miniaturisation induit une réduction de la distance de lecture à seulement 2 mm. La réduction de cette distance peut être une source de perte de données dans la mesure où seules les abeilles positionnées correctement par rapport à l'antenne pourront être lues. Chaque tag comporte un identifiant unique composé de 16 caractères alpha numériques.

Marquage des abeilles

Les tags sont collés sur le thorax, entre les points d'insertion des ailes. Nous utilisons une colle ciment dentaire bi composants (marque TEMPOSIL®) qui est totalement dénuée de toxicité et qui a la faculté de durcir en quelques secondes. Le marquage d'abeilles naissantes de moins de 24 h ne nécessite pas de précautions particulières. Du fait que ces dernières sont inaptes au vol et incapables de piquer, il est facile de les manipuler à l'aide d'une pince souple pour insectes ou à main nue. Lorsqu'il s'agit d'abeilles butineuses, donc âgées de quelques jours, il est nécessaire pour des raisons de sécurité de contenir les insectes dans des dispositifs adaptés. Pour cela, nous utilisons des cages à piston (**Figure 3a**), matériel normalement dédié au marquage des reines. L'ouvrière est ensuite plaquée contre la grille de la cage, et positionnée de façon à ce qu'il soit possible de déposer une goutte de ciment dentaire sur son thorax (**Figure 3b**). Le tag est ensuite positionné sur le thorax à l'aide d'une pince (**Figures 3c et 3d**).



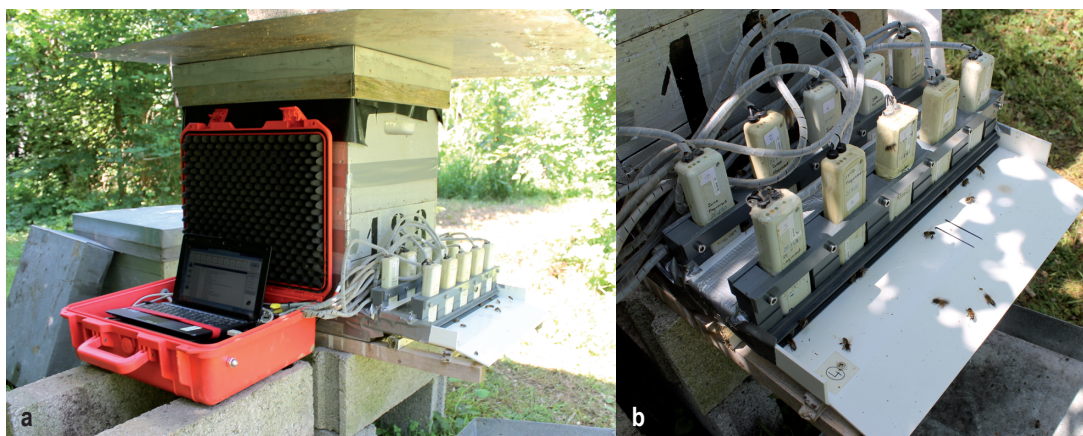
Figure 3. Pose des tags RFID sur abeille.

a) introduction d'une abeille dans une cage à piston ; **b)** dépose de colle dentaire sur le thorax ; **c)** pose du tag ; **d)** abeille en contention avec son tag collé (photos : INRA).



Les lecteurs RFID

Notre dispositif comporte deux rangées parallèles de cinq lecteurs chacune, chaque lecteur étant indépendant et possédant sa propre capacité de stockage (**Figure 4a et 4b**). Cette propriété est intéressante dans la mesure où, en cas de panne informatique, les lecteurs peuvent continuer à enregistrer et stocker sous réserve qu'ils soient alimentés. Sachant que durant la phase d'interrogation des lecteurs ces derniers sont inopérants, il est possible de choisir et de programmer la période et la fréquence de transfert des données des lecteurs vers l'ordinateur en fonction de l'activité des abeilles. Ainsi une interrogation toutes les 24 h à minuit n'induit pas de pertes de données. Du fait de l'identité et de l'indépendance des lecteurs, le dispositif en deux rangs permet de déterminer le sens de passage d'une abeille. On peut ainsi déterminer si une séquence de lectures successives par deux lecteurs correspond à une entrée ou une sortie de la ruche. L'ensemble du dispositif est alimenté par une batterie de 12 V (115 AH) qui doit être remplacée 2 fois par semaine.



*Figure 4. a) dispositif global lecteurs à l'entrée de la ruche + ordinateur ;
b) détail de la planche d'envol et des lecteurs (photos : INRA).*

Enregistrements

Les données sont enregistrées sous forme de fichiers .txt qui comportent quatre colonnes : le numéro du lecteur, le numéro du tag, la date et l'heure de passage. Ces éléments permettent d'enregistrer pour chaque abeille les heures de sortie et d'entrée à la ruche, la durée des sorties, la durée de séjour dans la colonie, ainsi que les nombres globaux d'entrées et sorties au cours du temps. Un individu qui n'est plus détecté est considéré comme mort ce qui permet de connaître la durée de vie des abeilles marquées. Compte tenu du nombre important de données « parasites » générées notamment par des abeilles qui séjournent durant plusieurs secondes sous le même lecteur, nous avons développé des algorithmes qui permettent un nettoyage des fichiers avant leur analyse.

Exemples de résultats acquis par cette méthode

Etude du comportement de vol en fonction de l'âge

Le polyéthisme des ouvrières est un phénomène connu qui se caractérise par un changement de fonction de chaque individu selon son âge. Les activités intra colonies telles que le soin au couvain, le nettoyage sont dévolues aux jeunes individus, qui au fur et à mesure verront leurs tâches évoluer vers l'extérieur, l'activité de butinage étant assurée par les plus vieilles abeilles. Le marquage d'individus naissants et leur introduction dans une colonie confirme bien cette évolution dans la mesure où ce dispositif permet de montrer une évolution croissante en nombre (**Figure 5a**) et en durée (**Figure 5b**) des sorties, et donc des vols, en fonction de l'âge des abeilles. Les durées de vols deviennent sensiblement plus longues à partir du 23^e jour qui correspond à l'âge des premières butineuses. Les sorties de courte durée observées avant cet âge correspondent à des vols de reconnaissance. En couplant

ces observations avec une courbe de température par exemple, on observe l'effet de ce paramètre sur l'activité de la colonie (**Figure 5a**). Au-delà de 29 jours, aucune donnée n'est enregistrée, mettant ainsi en évidence la durée de vie maximale d'une ouvrière. Ces éléments peuvent également être étudiés en faisant varier le contexte paysager, la nature des ressources, le climat... rendant possible l'observation de l'impact de divers paramètres sur l'évolution du polyéthisme dans le temps.

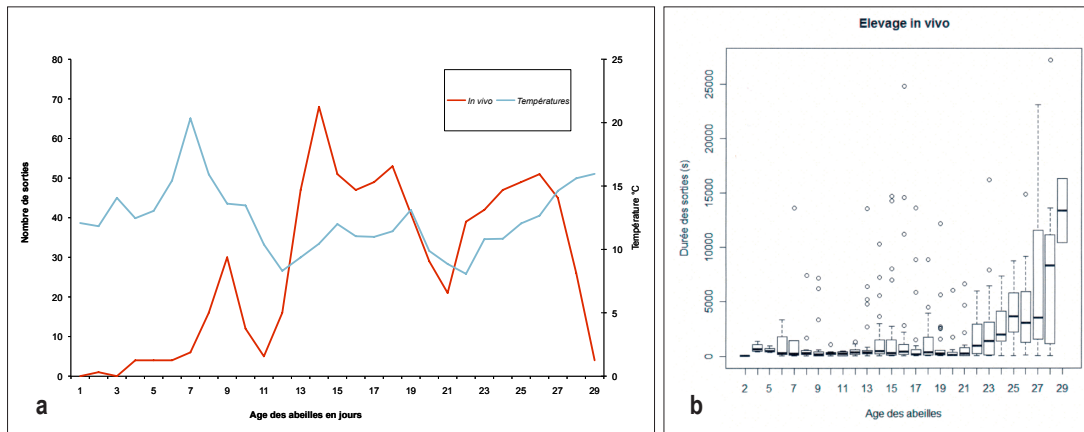


Figure 5. a) nombre de sorties de la ruche des abeilles en fonction de leur âge et de l'évolution de la température moyenne ambiante ; b) Boxplots représentant les médianes des durées des sorties de la ruche par jour des abeilles en fonction de leur âge (N = 807).

Effet d'un insecticide sur les capacités d'orientation spatiale

Certains insecticides sont connus pour produire des effets sub-létaux sur le comportement, notamment en perturbant les facultés d'orientation des abeilles dans l'espace. Les butineuses exposées à de telles substances deviennent incapables de rejoindre la colonie pour y déposer leur butin. A terme, et si un nombre important d'abeilles est intoxiqué, l'apport en nutriment, à savoir nectar et pollen se trouve affecté, avec un impact probable sur le développement du couvain et donc la survie de la colonie.

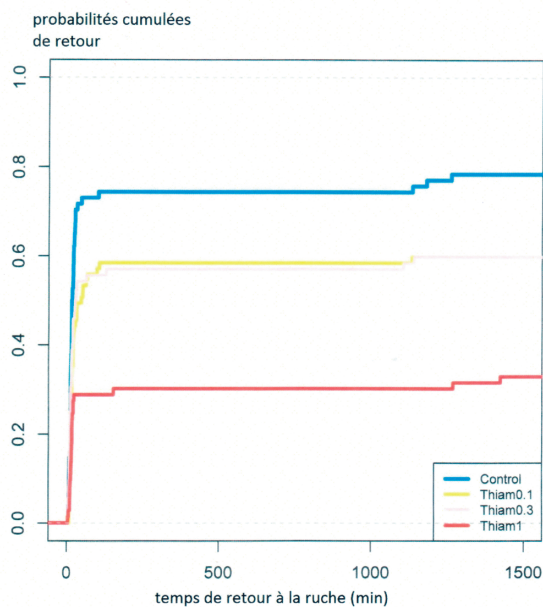



Figure 6. Taux de retour à la ruche d'ouvrières exposées à différentes doses de thiametoxam (0,1 ; 0,3 ; 1ng/abeille) puis relâchées à 1 km de la colonie.



Cet effet est mesurable à l'aide de la technologie RFID. Des abeilles équipées de tags, exposées en laboratoire à une dose connue de thiametoxam (insecticide de la famille des néonicotinoïdes) puis relâchées à une distance de 1 km de la ruche seront plus ou moins aptes à retrouver leur chemin selon qu'elles aient été exposées ou non (lot contrôle), et selon la dose d'exposition (de 0,1 à 1 ng/abeille) (**Figure 6**). Le taux de retour chez les abeilles témoin est de l'ordre de 80% alors qu'il n'est que de 30% pour la dose la plus forte, et de 60% pour les doses intermédiaires. Ce type de protocole a fait l'objet d'un travail publié dans la revue *Science* en 2012 (Henry et al., 2012) qui a conduit à l'interdiction de l'usage de cette molécule. Ce protocole fait aujourd'hui l'objet d'un test en cours de standardisation, dont la robustesse est mise à l'épreuve dans le cadre d'une procédure de tests inter laboratoires. Il sera soumis très prochainement à l'OCDE (Organisation de coopération et de développement économiques) pour être adopté et rejoindre les méthodes destinées à évaluer les risques non intentionnels liés à l'usage des pesticides sur les abeilles.

Conclusions et perspectives

Cette technologie, qui ouvre de nouvelles perspectives expérimentales, est en continuelle évolution. Aujourd'hui ces dispositifs sont commercialisés notamment par la Société allemande Microsensis® et disponibles « clé en main ». Contrairement aux prototypes que nous avons utilisés, ils sont plus fiables et résistent mieux aux contraintes de terrain (alimentation, humidité, surchauffe...). Ils sont ainsi rendus plus accessibles tant d'un point de vue pratique que financier, ce qui a contribué à ce que de plus en plus de laboratoires intègrent cette technologie à des fins expérimentales. Un meilleur accès à cette technologie nous permet par ailleurs de développer en collaboration avec l'ACTA, l'ITSAP Institut de l'abeille et l'unité GenPhyse de l'INRA de Toulouse une antenne moins coûteuse, mieux adaptée à nos besoins, et surtout dotée des propriétés anticollision, à savoir la possibilité de lire plusieurs tags en même temps.

Remerciements

Ces travaux ont bénéficié de fonds FEAGA d'aide à l'apiculture. Ils ont bénéficié du soutien technique de Dominique Fortini, Carole Moreau-Vauzelle, Colombe Chevallereau et Stéphane Grateau de l'UE d'entomologie INRA du Magneraud, Centre-Nouvelle-Aquitaine-Poitiers.

Références bibliographiques

- Carreck N, Osborne J, Capaldi E, Riley J (1999) Tracking bees with radar. *Bee World* **80** : 124-131.
- Henry M, Béguin M, Requier F, Rollin O, Odoux JF, Aupinel P, Aptel J, Tchamitchian S, Decourtye A (2012) A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. *Science* **6079** : 348-350.
- Streit S, Bock F, CWW Pirk, Tautz J (2003) Automatic life-long monitoring of individual insect behaviour now possible. *Zoology* **106** : 169-171.