

Lutte contre le varroa

Étude de sensibilité/résistance à l'amitraze chez *Varroa destructor*

par Yann SANDON, apiculteur professionnel, formateur FNOSAD

Depuis l'apparition de *Varroa destructor* en 1982 dans nos ruchers, la problématique reste la même : sans intervention suffisamment efficace pour faire chuter la pression de l'acarien sur chaque colonie, celle-ci est vouée à disparaître à plus ou moins long terme.

Pour parvenir à ses fins, l'apiculteur dispose de différents moyens d'action. Si des mesures biotechniques (division, blocage de ponte, retrait de couvain mâle...) peuvent soulager la colonie, l'utilisation de médicaments possédant une AMM reste à ce jour le meilleur moyen de sauvegarder son cheptel d'un impact trop fort du parasite.

Depuis 2007 la FNOSAD réalise des tests d'efficacité annuels sur deux à trois cents colonies visant à vérifier le pourcentage d'efficacité de la plupart de ces médicaments, leur vitesse d'action, et le nombre de varroas résiduels après traitement. Pourtant, que devient l'efficacité d'un médicament si la population de parasites acquiert une résistance à la substance acaricide qui entre dans sa composition ? On se souvient des phénomènes de résistance observés avec le médicament Apistan (Tau-fluvalinate)

alors que le médicament s'était montré très efficace auparavant [1, 2], ou encore avec le Coumaphos [3]. Concernant Apivar, des remontées d'observations de terrain par des apiculteurs chevronnés pouvaient suggérer, pour certains lots de médicaments, des défauts d'efficacité, ou des phénomènes de résistance sans qu'aucune étude ne puisse venir infirmer ou confirmer ces impressions...

Apivar® est aujourd'hui le médicament avec AMM le plus utilisé en France, et pourtant peu d'études visant à tester la sensibilité/résistance des populations de varroas à l'amitraze n'avaient été menées, et encore leurs résultats étaient controversés.

Pour pallier ce manque, la FNOSAD a coordonné une étude réalisée par le Laboratoire Départemental d'Analyses du Jura dont les résultats vous sont résumés ici.

Pour l'aider à financer les prestations du laboratoire et la coordination de ce projet, la FNOSAD a bénéficié d'une aide de la part de deux sponsors, l'association *Bee My Friend* et la Fondation Lune de Miel (voir encadré page suivante).

Coût et financement du projet

1/ Coût

Année	Nature des frais	Montant En euros
2015	Prestation du laboratoire*	1 920,00
	Coordination FNOSAD	Non chiffré
	Envois d'échantillons de couvain	87,00
	SOUS-TOTAL	1 978,00
2016	Prestation du laboratoire*	27 120,00
	Coordination FNOSAD	1 021,50
	Envois d'échantillons de couvain	508,50
	SOUS-TOTAL	28 650,00
2015 et 2016	TOTAL	30 628,00

* En 2015, le laboratoire a mis au point le dispositif qui a servi en 2016 à réaliser les tests sur les 17 populations de varroas. Chaque année, la prestation comprend l'achat de matériel pour la fabrication de dispositifs spécifiques, la réalisation des essais et la rédaction d'un rapport.

2/ Financement

Année	Montant global En euros	Financement (détail) En euros
2015	1978,00	FNOSAD : 1 978,00 + salaire pour coordination
2016	30 628	Fondation Lune de Miel : 5 000,00 Association Bee my Friend : 10 000,00 FNOSAD : 15 628,00

**Coût global pour la FNOSAD du projet sur les deux ans :
17 606,00 euros + coordination de l'année 2015.**

Présentation de la méthode

L'étude de la résistance consiste à déterminer la concentration létale à 50 % (CL50) pour une population de varroas suspectée d'être résistante et de la comparer avec une CL50 de référence déterminée pour une population de varroas non résistante ou sensible. La méthode utilisée dans cette étude est celle préconisée par le *Coloss Beebook* [4,5] pour les molécules liposolubles agissant par contact.

L'amitraze est incorporée à différentes concentrations dans des capsules de paraffine. La gamme de concentrations retenues s'échelonne de 0,1 ppm

(partie par million) à 5 000 ppm. Les acariens sont ensuite mis en contact avec la paraffine traitée, puis après une durée déterminée, les mortalités sont comptabilisées.

Les varroas ont été prélevés sur des cadres de couvain (l'équivalent de deux cadres de couvain par envoi, en privilégiant le couvain mâle) fournis par des apiculteurs volontaires et provenant de 18 ruchers dispersés sur tout le territoire (voir Fig. 1). Les prélèvements, réalisés entre le 21 mai 2016 et le 2 août 2016, et accompagnés d'une fiche de commémoratifs, ont été envoyés par courrier postal rapide. Le jour même, ou le len-

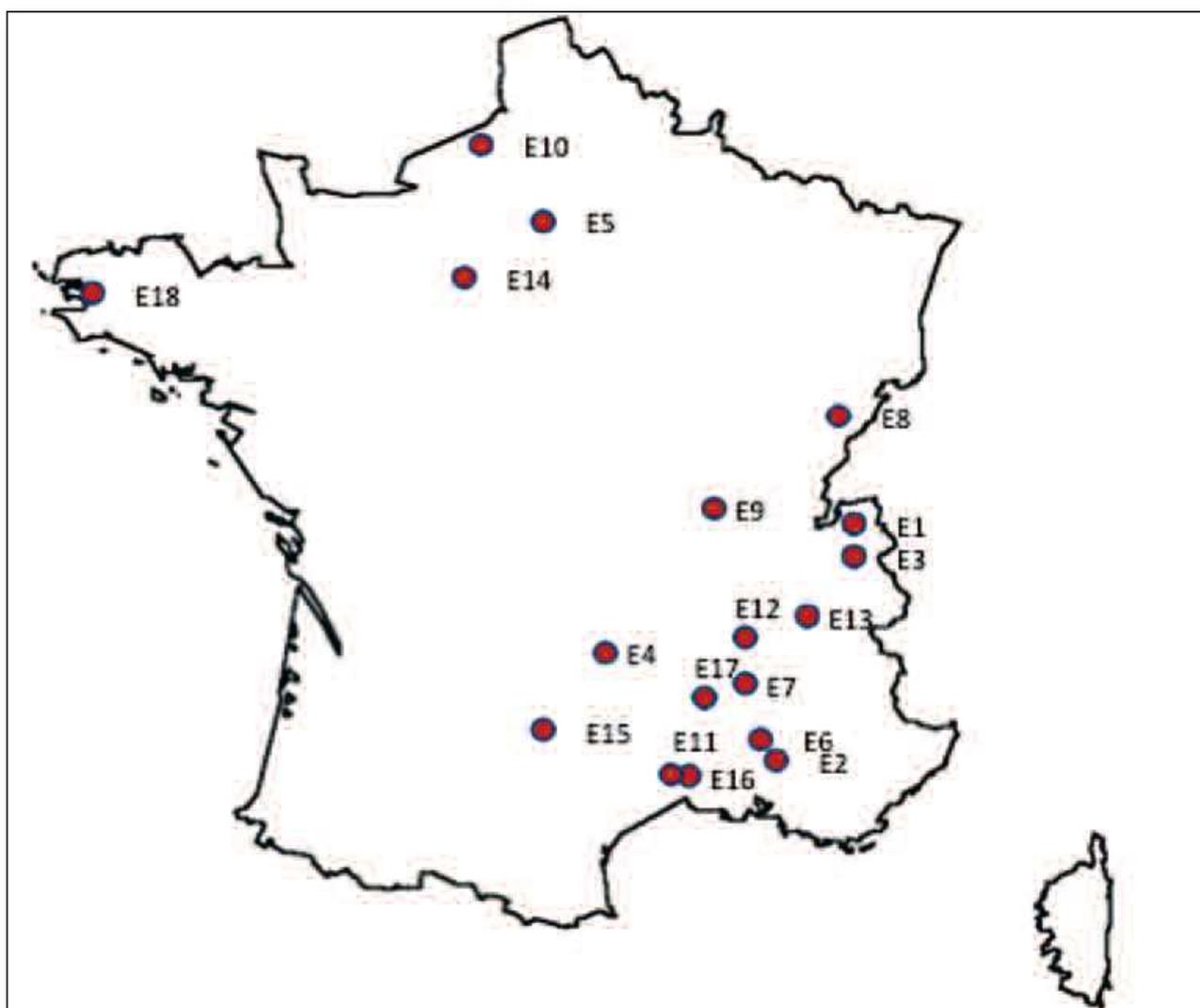


Fig. 1 : Emplacement des différents ruchers ayant fourni des échantillons de couvain.

E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E9	E11	E12	E14	E15	E16	E17	E18
320	120	116	84	330	110	240	110	170	400	170	178	370	370	250

Tableau 1 : Nombre de varroas présents par échantillon exploité.

demain de la réception, les varroas ont été récoltés au pinceau après désoperculation à la pince fine des cellules de couvain. Sur les 18 ruchers échantillonnés, 17 ont reçu un traitement de fin d'été (2015) à base d'amitrazé, et un à base de tau-fluvalinate. Trois ruchers seulement ont reçu un traitement hivernal (2015/2016) complémentaire à base d'acide oxalique.

Le tableau 1 présente le nombre total de varroas présents dans les 15 échantillons exploitables (les 3 autres échantillons de couvain étaient trop pauvres en varroas ou en étaient totalement dépourvus).

Seuls les individus femelles matures ont été conservés pour l'étude. Dix acarions ont été placés dans chaque capsule (correspondant à chaque concentration en amitrazé à tester) pendant quatre heures : c'est la phase de contamination pendant laquelle les varroas sont mis en contact avec de la paraffine imprégnée d'amitrazé. Ils sont ensuite observés à la loupe binoculaire avant d'être transférés dans des boîtes de Pétri. Lors de l'observation sous loupe binoculaire, les varroas étaient classés en trois catégories : mobiles, paralysés ou morts. Les observations ont été renouvelées après 24 h et 48 h. Les varroas ont été nourris avec des larves/nymphes d'abeilles pendant toute la durée de l'expérience.

Pour chaque concentration testée, le pourcentage d'effet de l'acaricide est calculé de la façon suivante : (nb varroas paralysés + nb varroas morts – nb varroas perdus ou morts accidentellement) / (nb varroas initial – nb varroas perdus ou morts accidentellement).

Résultats

Sur les 18 échantillons reçus, les résultats des tests pratiqués n'ont finalement pu être exploités que sur 13 d'entre eux. Seulement cinq d'entre eux détenaient suffisamment de varroas pour tester les 32 concentrations retenues. Pour les autres échantillons, les concentrations supérieures à 10 ppm n'ont pas été testées et le nombre de réplicats pour les concentrations inférieures a été diminué.

Pour toutes les populations de varroas, l'effet (paralysie ou mortalité) est total à t0 + 4h pour toutes les concentrations supérieures ou égales à 100 ppm. Et après 24 h, l'effet est total pour toutes les concentrations supérieures ou égales à 10 ppm.

Pour les 13 populations étudiées, les CL50 obtenues varient entre 0,08 et 1,66 ppm (voir Fig. 2), la moyenne se situant à 0,49 ppm.

Cette figure nous montre que les 13 Intervalles de Confiance se chevauchent et donc qu'il n'existe pas de différence significative de sensibilité à l'amitrazé pour ces 13 populations de varroas testées.

Extrait du chapitre MATÉRIEL ET MÉTHODE du rapport
« Étude de la résistance des varroas à l'acaricide amitraze –
essais en laboratoire » du LDA du Jura

Auteur : Alain Viry

Capsules de paraffine

Les capsules sont formées à l'aide de 2 disques de verre Na-Ca (62 mm de diamètre) et d'1 anneau en inox (56 mm de diamètre intérieur – 2 mm d'épaisseur - 5 mm de hauteur). L'intérieur de ces capsules est recouvert par une fine couche de paraffine (Merck réf. 1.07151.1000 – point de fusion 46-48 °C) contenant une concentration connue en amitraze.

Pour chacune des concentrations, dix grammes de paraffine sont mis à fondre dans un cristalliseur placé dans un bain-marie à 60 °C auxquels on ajoute la quantité requise d'amitraze (Amitraz Pestanal® Sigma-Aldrich – réf. 45323-250MG) dissoute dans 2 ml d'hexane (n-Hexane – VWR – réf. 24577.323). Pour les témoins négatifs, de l'hexane seul est ajouté. Le mélange est remué de manière continue pendant 1 minute puis régulièrement pendant au moins 10 minutes pour laisser s'évaporer l'hexane. Les anneaux métalliques sont plongés dans la paraffine fondue et un côté des disques de verre est recouvert en abaissant le disque sur la paraffine fondue. Trois capsules sont préparées pour chacune des concentrations. Les capsules sont identifiées sur chacun des 2 disques de verre. Les capsules mal recouvertes ou dont le poids de paraffine est en dehors de l'intervalle [1,6 – 2 g] sont écartées de l'expérimentation. Les capsules recouvertes de paraffine sont gardées ouvertes (disque + anneau d'un côté, 2^e disque seul de l'autre) pendant 24 heures à température ambiante pour permettre aux résidus d'hexane de s'évaporer puis sont refermées et maintenues à température ambiante. Elles sont placées en étuve à 32,5 °C avant l'essai.

Une même capsule n'est pas utilisée pour plus de 3 essais différents.

Suite aux travaux préliminaires entrepris en 2015, une gamme de concentrations allant de 0,1 ppm jusqu'à 5 000 ppm a été retenue (0,1 – 0,2 – 0,5 – 1 - 2 – 5 – 10 – 20 - 50 – 100 – 200 - 500 – 1 000 – 2 000 et 5 000 ppm). L'approximation de la CL50 de référence obtenue lors des premiers travaux se situant à des concentrations très basses autour de 0,5 ppm, le nombre de réplicats minimal pour les concentrations situées entre 0,1 et 5 ppm et pour les témoins négatifs a été fixé à 3, et 2 réplicats pour les concentrations de 10 et 20 ppm. Pour les concentrations supérieures pour lesquelles on pouvait s'attendre à une mortalité de 100 %, on a retenu 1 seule capsule par concentration

1. Préparation des capsules



Préparation des capsules contenant la paraffine et les diverses concentrations d'amitraz pour les tests.

2. Récolte des varroas



Récolte des varroas d'un échantillon de couvain.



3. En capsule



Capsules contenant les varroas en test, placées dans une enceinte thermostatée.

4. Sortie des capsules



Comptages des varroas morts et placement des varroas vivants sur des nymphes d'abeilles dans une boîte de Petri.

5. En boîtes de Pétri



Boîtes de Pétri contenant les varroas et les nymphes, maintenues dans une enceinte thermostatée.

6. Comptage des varroas



Observation sous loupe binoculaire des varroas mobiles, paralysés ou morts.

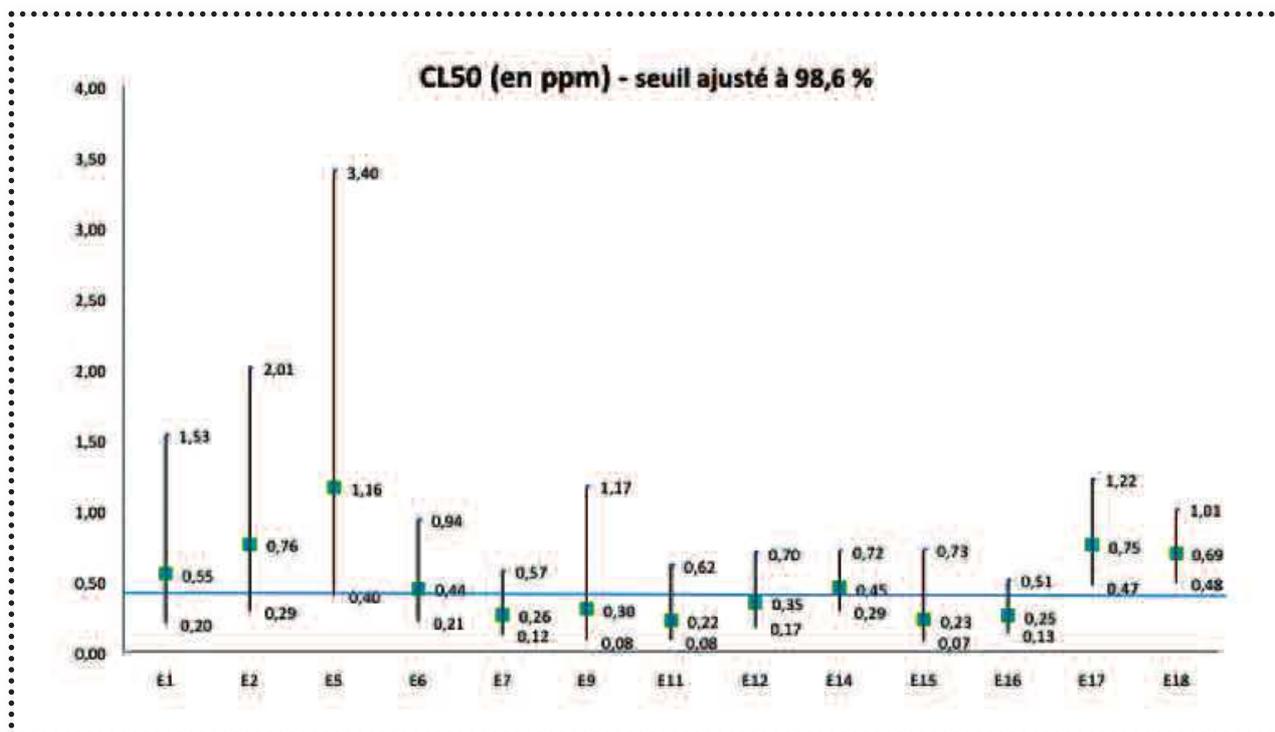


Fig. 2 : CL 50 obtenues pour chaque échantillon, avec Indice de Confiance à 98,6 %.

Discussion - Conclusion

Bien qu'issues de colonies d'abeilles présentant des niveaux d'infestation différents, **les 13 populations de varroas testées ne présentent pas de différence marquée de sensibilité à l'amitraze.**

Le résultat obtenu pour l'ensemble des 13 échantillons pourrait constituer une CL50 de référence pour une population de varroas sensible aux alentours de 0,5 ppm, soit 15,5 ng/cm² de paraffine. À titre indicatif, les lanières du commerce possédant une AMM présentent une teneur en amitraze comprise entre 4,2 et 6,4 x10⁶ ng/cm², (soit environ 30 000 fois plus que la valeur de CL50 pour une population de varroas sensibles déterminée par cette étude).

Afin de rendre cette valeur de CL50 encore plus robuste, il faudrait multiplier

les essais dans la zone des 0,5 ppm. Mais pour cela il faut disposer de davantage de varroas. Or si la méthode de prélèvement des couvains et leur acheminement par voie postale au laboratoire se sont montrés satisfaisants, la récolte des varroas à l'intérieur des cellules de couvain est fastidieuse et très chronophage...

Il s'agit de la première étude ayant pour objectif de rechercher une éventuelle résistance de varroas à l'amitraze réalisée selon une des méthodes préconisées par le *Coloss Beebook*. Elle permet donc d'obtenir pour la première fois une valeur de CL50 de référence pour une population de varroas sensibles.

La résistance à l'amitraze a par contre été étudiée en utilisant d'autres méthodes. Signalons que, pour la plupart de ces études, les ratios de résistance (rapport

entre la CL50 d'une population résistante et la CL50 d'une population sensible) varient entre 2 et 5. Seule l'équipe de Kamler [6] obtient un ratio de 31.

Ces résultats intéressants malgré le relatif faible nombre d'échantillons étudiés donnent lieu à des interrogations quant aux défauts d'efficacité observés quelquefois avec les lanières du médicament. Certes la méthode de testage de la sensibilité/résistance a été effectuée ici par contact avec la substance amitraze et non suite à un contact direct avec les lanières du médicament. Ces divers éléments auraient tendance à nous amener à penser que les défauts d'efficacité observés seraient plutôt liés à des questions de formulation du médicament (galénique), médicament qui, on l'a vu, contient théoriquement en puissance suffisamment de substance active.

Remerciements

Qu'il nous soit permis ici de remercier vivement nos sponsors qui nous ont accordé leur confiance et sans qui cette étude n'aurait pas pu être réalisée. Nous adressons également nos remerciements à l'équipe de Laboratoire Départemental d'analyses du Jura (et en particulier à Alain Viry) qui a accueilli notre demande avec beaucoup de bienveillance, a manifesté immédiatement un vif intérêt pour conduire cette étude qu'il a ensuite menée avec le sérieux qu'on lui connaît. Merci pour ce partenariat enrichissant...

Enfin nous remercions les apiculteurs qui ont envoyé les échantillons de

couvain au laboratoire et qui ont ainsi contribué à la réalisation de cette étude.

Adresses des sites de nos sponsors :

- Fondation Lune de Miel
<http://fondation.lunedemiel.fr/>
- Bee my Friend
<http://www.beemyfriend.com/>

Le rapport complet de cette étude, rédigé par Alain Viry (responsable adjoint du secteur Santé Animale du LDA du Jura) est disponible sur demande auprès de la FNOSAD.

Bibliographie

1. Thompson H., Brown M., Ball R., Bew M. (2002) – First report of *Varroa destructor* resistance to pyrethroids in the UK. *Apidologie*, Springer Verlag (Germany), 2002, 33 (4), pp. 357–366. <10.1051/apido:2002027>. <hal-00891907>.
2. Lodesani M., Colombo M., Spreafico M. (1995) – Ineffectiveness of Apistan treatment against the mite *Varroa jacobsoni* Oud. in several districts of Lombardy (Italy). *Apidologie*, 26 (1): 67–72.
3. Spreafico M., Eördegh F. R., Bernardinelli I., Colombo M. (2001) – First detection of strains of *Varroa destructor* resistant to coumaphos. Results of laboratory test and field trials. *Apidologie*, Springer Verlag (Germany), 2001, 32 (1), pp. 49–55. <10.1051/apido:2001110>. <hal-00891760>.
4. Dietemann V., Ellis J. D., Neumann P. (EDS) (2013) – The COLOSS BEEBOOK, Volume I: standard methods for *Apis mellifera* research. International Bee Research Association; Cardiff, UK. 636 pp. ISBN 978-0-86098-274-6.
5. Dietemann V., Ellis J. D., Neumann P. (EDS) (2013) – The COLOSS BEEBOOK, Volume II: standard methods for *Apis mellifera* pest and pathogen research. International Bee Research Association; Cardiff, UK. 356 pp. ISBN 978-0-86098-275-3.
6. Kamler M., Nesvorna M., Stara J., Erban T., Hubert J. (2016) – Comparison of tau-fluvalinate, acrinathrin, and amitraz effects on susceptible and resistant populations of *Varroa destructor* in a vial test – Exp Appl Acarol. 2016 May; 69 (1): 1–9. DOI: [10.1007/s10493-016-0023-8](https://doi.org/10.1007/s10493-016-0023-8).