



**HAL**  
open science

## MOSAR -Méthodes et Outils pour la Sélection d'Abeilles Résistantes à Varroa

Benjamin B. Basso, Sonia E. Eynard, Alain Vignal, Maxime Beguin,  
Anne-Laure Guirao, Yves Le Conte, Bertrand Servin, Axel Decourtye, Fanny  
Mondet

► **To cite this version:**

Benjamin B. Basso, Sonia E. Eynard, Alain Vignal, Maxime Beguin, Anne-Laure Guirao, et al.. MOSAR -Méthodes et Outils pour la Sélection d'Abeilles Résistantes à Varroa. Innovations Agronomiques, 2021, 82, pp.229-245. 10.15454/zna6-4g12 . hal-03159732

**HAL Id: hal-03159732**

**<https://hal.inrae.fr/hal-03159732>**

Submitted on 4 Mar 2021

**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.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0  
International License

## MOSAR – Méthodes et Outils pour la Sélection d'Abeilles Résistantes à Varroa

Basso B.<sup>1,2,4</sup>, Eynard S.<sup>3</sup>, Vignal A.<sup>3</sup>, Béguin M.<sup>1,4</sup>, Guirao A-L.<sup>1-4</sup>, Le Conte Y.<sup>2,4</sup>,  
Servin B.<sup>3</sup>, Decourtye A.<sup>1-4</sup>, Mondet F.<sup>2,4</sup>

<sup>1</sup> ITSAP, Site Agroparc, F-84914 Avignon Cedex 9

<sup>2</sup> INRAE, UR 406 Abeilles et Environnement, INRAE Avignon, Site Agroparc, F-84914 Avignon Cedex 9

<sup>3</sup> INRAE, UMR 1388 Génétique, Physiologie et Systèmes d'Élevage, F-31326 Castanet-Tolosan

<sup>4</sup> UMT PRADE, Site Agroparc, F-84914 Avignon Cedex 9

**Correspondance** : benjamin.basso@inrae.fr

### Résumé

L'acarien *Varroa destructor* est l'un des principaux parasites de l'abeille domestique *Apis mellifera*, causant d'importantes pertes de colonies à l'échelle mondiale. Des traitements chimiques sont disponibles afin de freiner la progression de l'infestation mais ils connaissent actuellement des limites significatives. Ainsi, la sélection et l'élevage d'abeilles naturellement résistantes au Varroa apparaît comme une solution très prometteuse.

Plusieurs critères de sélection pour la résistance au Varroa ont été développés par des laboratoires de recherche. Le premier objectif de ce projet était donc de fournir à la filière des références techniques afin de mettre en œuvre ces mesures de manière pertinente dans des conditions de production. Pour autant, actuellement, il n'existe pas de méthode pour estimer le potentiel de résistance d'une colonie de manière simple, fiable, rapide et sans un taux de parasitisme élevé. MOSAR avait donc également comme objectif d'avancer dans la mise au point de nouveaux outils à destination des techniciens et des apiculteurs : le développement d'un système de phénotypage simple du comportement VSH et la recherche de marqueurs génétiques de résistance.

Ce travail a démarré par l'évaluation dans des conditions de production apicole classiques des méthodes permettant d'évaluer la résistance des colonies au Varroa, mises au point et validées dans des conditions expérimentales. Le suivi et le phénotypage de 120 colonies sur l'ensemble du projet a permis d'identifier les avantages et les inconvénients de chaque méthode pour une mise en œuvre à grande échelle. L'expertise acquise a également permis d'optimiser ces méthodes en vue d'une utilisation par les apiculteurs tout en conservant la fiabilité indispensable en vue d'une utilisation en sélection. Des fiches techniques présentant ces différents critères en détaillant le matériel et les compétences nécessaires ainsi que les différentes étapes et les points critiques ont été diffusées largement.

En parallèle, la mise au point d'une méthode utilisant des composés chimiques pour estimer la résistance d'une colonie au Varroa a nettement progressé. De même, la recherche de marqueurs génétiques de la résistance à Varroa s'est appuyée sur le projet MOSAR pour progresser sur plusieurs aspects méthodologiques.

Ce projet a déjà ouvert la voie à l'intégration de critères de résistance au Varroa dans les programmes de sélection utilisés en apiculture et les travaux complémentaires en cours devraient amplifier cet impact à terme.

**Mots-clés** : Abeilles domestiques, Varroa, sélection, résistance, parasite, apiculture.

### Abstract: Methods and tools for the selection of varroa resistant honeybees

*Varroa destructor* is one of the main pests of the honeybee *Apis mellifera*, causing severe colony losses worldwide. Chemical treatments are available to reduce infestation, but they are currently experiencing

significant limits. Thus, breeding and selection of bees naturally resistant to Varroa appears as a very promising solution.

Several selection criteria for Varroa resistance have been developed and validated by research laboratories. The first objective of this project was therefore to provide technical references to professional beekeepers in order to implement these measures in a relevant manner under production conditions. However, until now, there is no method to estimate the resistance potential of a colony with a simple, reliable, rapid way and without a high rate of parasitism. MOSAR therefore also had the objective of developing new tools for technicians and beekeepers: the development of a simple phenotyping system of VSH behavior and the search for genetic markers of resistance.

This work began with the evaluation under conventional beekeeping production conditions of methods for evaluating the resistance of colonies to Varroa mite developed and validated under experimental conditions. The monitoring and phenotyping of 120 colonies throughout the project identified all the advantages and disadvantages of each method for large-scale implementation. The expertise acquired also made it possible to optimize these methods for use by beekeepers while maintaining the reliability essential for use in breeding. Technical sheets presenting these different criteria, detailing the equipment and skills required, as well as the different stages and critical points were widely distributed.

At the same time, the development of a method using chemical compounds to estimate the resistance of a colony to Varroa has made significant progress. Likewise, the search for genetic markers of Varroa resistance relied on the MOSAR project to progress on several methodological aspects.

This project has already paved the way for the integration of resistance criteria to Varroa in breeding programs used in beekeeping and the additional work in progress should amplify this impact over time.

**Keywords:** Honeybee, Varroa, selection, beekeeping production, parasite, resistance.

## Introduction

- *Contexte*

Depuis plusieurs années, les apiculteurs font face à des pertes importantes de colonies d'abeilles domestiques (en hiver comme en saison). Ces difficultés représentent une menace pour la filière et pour le maintien d'un service de pollinisation des cultures. De 2008 à 2012, le taux de pertes hivernales a été estimé entre 17 % et 30 % selon les années (Holzmann, 2012 ; Basso, 2013). En février 2013, le Ministère de l'Agriculture a lancé un Plan de Développement Durable de l'Apiculture (PDDA) visant à augmenter le nombre d'apiculteurs professionnels en France, afin de faire progresser la production. En effet, les estimations récentes de la production française de miel montrent une nette diminution en dix ans (Audit GEM – Viniflor, 2005 ; Audit Protéis+ – FranceAgriMer, 2012). La production globale française était estimée ainsi à 25 500 tonnes en 2004 contre seulement 11 000 en 2014.

Plusieurs facteurs ont été proposés pour expliquer les mortalités anormales, dont les principaux sont le développement de pathogènes et l'intensification des pratiques agricoles (Henry *et al.*, 2012 ; Oldroyd, 2007). S'il est aujourd'hui unanime que l'origine de l'affaiblissement des populations d'abeilles est multifactorielle (Alaux *et al.*, 2010), le parasite *Varroa destructor* constitue une des principales menaces qui pèsent sur l'apiculture à l'échelle mondiale (Rosenkranz *et al.*, 2010 ; Le Conte *et al.*, 2010). L'acarien Varroa, qui infeste les colonies européennes depuis une trentaine d'années, vit dans les colonies, se nourrit du « sang » des abeilles et leur transmet également des virus. La plupart des colonies meurent en quelques mois en cas d'infestation par le Varroa, et en l'absence de traitement appliqué contre le parasite (Le Conte *et al.*, 2010). Pour faire face à ce fléau, plusieurs traitements « anti-Varroa » ont été développés. Il s'agit principalement de traitements chimiques à base d'acaricides, d'huiles essentielles ou encore d'acides organiques. Cependant, la lutte contre le Varroa connaît ces dernières années des limites significatives. En effet, l'acarien devient résistant à certains acaricides comme le tau fluvalinate

(Milani, 1999 ; Elzen *et al.*, 2000), l'amitraze (Elzen *et al.*, 2000), le coumaphos (Pettis *et al.*, 2004). Ces molécules peuvent également contaminer les produits de la ruche tels que le miel ou les cires et l'environnement direct des abeilles (Mullin *et al.*, 2010 ; Johnson *et al.*, 2013).

Dans ce contexte alarmant, la filière apicole manifeste un besoin urgent de développement de nouvelles solutions pour lutter contre le parasite Varroa. L'existence de colonies d'abeilles capables de développer naturellement des stratégies de défense contre le Varroa, et donc de survivre à une infestation de l'acarien, représente l'espoir le plus prometteur. En prenant l'orientation de sélectionner des lignées d'abeilles capables de lutter naturellement contre le parasite, la filière apicole pourrait ainsi s'engager dans une stratégie durable limitant l'emploi de pesticides comme solution de traitement chimique contre le Varroa. Cette opportunité apparaît fortement pertinente puisque certaines populations d'abeilles domestiques en font naturellement la démonstration (Le Conte *et al.*, 2007 ; Fries *et al.*, 2006).

La survie de quelques colonies face au parasite semble dépendre d'adaptations comportementales chez les abeilles ouvrières, qui permettent aux colonies de limiter la progression de l'infestation par le Varroa au cours de la saison (Mondet *et al.*, 2020). Le comportement hygiénique spécifique au Varroa (VSH – Varroa Sensitive Hygiene), qui consiste en la détection, la désoperculation et le nettoyage des alvéoles contenant du couvain parasité, a été identifié comme un mécanisme central permettant aux colonies de maintenir l'infestation par le Varroa sous contrôle (Harbo et Harris, 2005 ; Harris *et al.*, 2010). Par ailleurs, il est connu que le mécanisme de nettoyage par VSH limite le succès reproducteur des femelles Varroa contenu dans les alvéoles ciblées. Ce dernier caractère, nommé SMR (Suppressed Mite Reproduction), peut également résulter d'autres mécanismes conduisant à un échec de reproduction des Varroas dans la colonie d'abeilles. Si le lien entre les caractères VSH et SMR est acquis, seule l'origine mécanistique du VSH est clairement identifiée. Le comportement VSH apparaît donc actuellement comme un caractère candidat idéal pour sélectionner des colonies capables de se défendre naturellement contre le Varroa.

La sélection de colonies basée sur des caractères d'intérêt nécessite de disposer de méthodes pour évaluer l'expression de ce caractère dans la colonie. A l'heure actuelle, les méthodes de phénotypage de la résistance au Varroa sont toutes très lourdes à mettre en œuvre. Par exemple, la mesure VSH nécessite des colonies « donneuses » de Varroa et peut prendre jusqu'à une journée à une personne pour phénotyper une seule colonie (Buchler, communication personnelle). Elle est donc difficilement applicable sur le terrain à un grand nombre de colonies, ce qui est indispensable à la réussite d'un schéma de sélection. L'attente des acteurs de la filière sur ces critères de résistance au Varroa est telle qu'ils tentent aujourd'hui d'appliquer des méthodes sans référentiels techniques sur leur mise en œuvre ou leur efficacité. La diffusion de tels référentiels est donc nécessaire pour les appuyer et pour permettre aux apiculteurs désireux de conserver une totale autonomie sur leur exploitation d'appliquer ces critères de sélection de manière optimale.

- *Objectifs généraux du projet*

La finalité de ce projet était de créer une série d'innovations allant de la conception de référentiels techniques sur les méthodes actuellement disponibles, jusqu'au développement de deux nouvelles méthodes, chimique et génomique.

Ce projet poursuivait donc plusieurs objectifs :

- Concevoir de référentiels techniques (mise en œuvre pratique et pertinence) sur les méthodes de mesure du potentiel de défense des abeilles contre le Varroa, à destination des acteurs de la filière apicole (apiculteurs, sélectionneurs, scientifiques et techniciens) ;
- Rechercher une méthode de phénotypage du caractère VSH (Varroa Sensitive Hygiene), fiable et facile à mettre en œuvre (rapidité de mesure et observation hors infestation forte) par application de composés chimiques naturels ;
- Rechercher des marqueurs moléculaires du comportement VSH.

Ce projet s'inscrit dans une stratégie à long terme de sélection d'abeilles résistantes au Varroa tout en maintenant un maximum de diversité génétique au sein des populations françaises, en offrant la possibilité d'intégrer ce caractère de résistance dans tous les programmes de sélection existants.

Les partenaires de ce projet étaient l'ITSAP – Institut de l'abeille, l'unité Abeilles et Environnement d'INRAE Avignon et l'unité GenPhyse d'INRAE Toulouse.

## **1. Acquisition et diffusion de références techniques sur les différentes méthodes de mesure du potentiel de résistance au Varroa**

Afin de s'appropriier les méthodes développées dans des laboratoires de recherche, l'ITSAP – Institut de l'abeille a mis en œuvre celles-ci sur un grand nombre de colonies dans des conditions s'approchant d'avantage des conditions de production apicole classiques.

Ce travail a permis d'identifier les avantages et les contraintes de chacune des méthodes et ainsi de fournir par la suite des recommandations précises pour une mise en œuvre pertinente et fiable sur le terrain.

### *1.1 Phénotypage de 120 colonies*

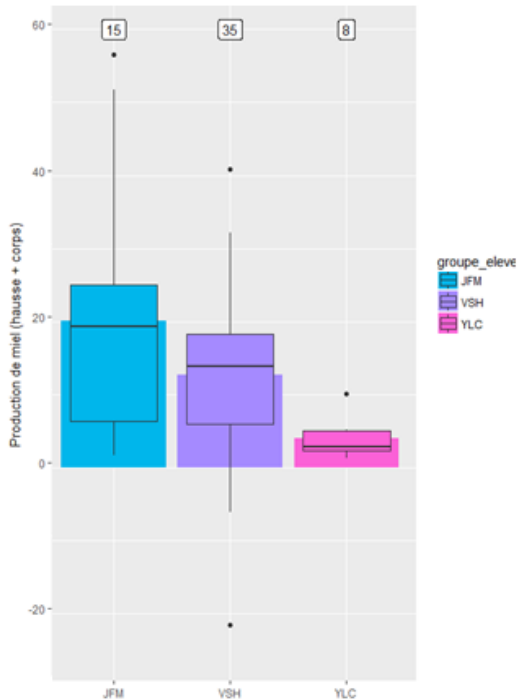
Une soixantaine de colonies a été mise en place spécifiquement sur la station de contrôle de performances de l'ITSAP – Institut de l'abeille d'Avignon au démarrage de ce projet. Cette opération a été répétée sur la 2<sup>ème</sup> année afin de tester 120 reines au total. La moitié de ces reines a été sélectionnée dans des populations réputées pour leur aptitude à la résistance au Varroa (origines VSH, en partie issues de sélection USDA ; et YLC, issues de sélection au centre INRAE d'Avignon) ; l'autre moitié provenait de sélectionneurs ne prenant pas en compte la résistance à Varroa (origine JFM).

#### **1.1.1 Suivi apicole**

Les colonies ont suivi un parcours apicole proche des pratiques des apiculteurs professionnels : hivernage et printemps à proximité des installations, puis transhumance sur la miellée de lavandes durant l'été.

Afin de conserver au maximum les reines en testage, les colonies ont été régulièrement contrôlées pour l'essaimage et le remérage. En cas de remérage, à l'exception des quelques semaines nécessaires à la mise en ponte de la nouvelle reine, la colonie demeure dans l'expérimentation et reste donc suivie sur les mêmes paramètres.

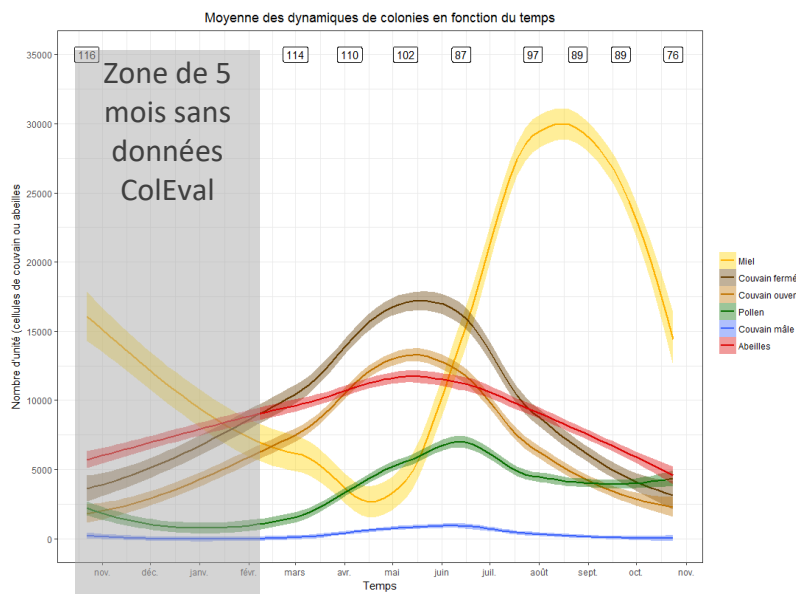
L'application du protocole standard de testage national de l'ITSAP – Institut de l'abeille a encadré la mesure d'un certain nombre de caractères : production, douceur, tenue au cadre, essaimage et comportement hygiénique. Les différentes origines ont obtenu des résultats très différents, comme sur la production illustrée ci-après (Figure 1).



**Figure 1 :** Production de miel (en kg) par origine des colonies en 2016. La barre représente la moyenne par groupe de colonies et les boxplots la distribution des valeurs intra-origine génétique.

### 1.1.2 Dynamique de populations

Pour suivre la dynamique des colonies, chacune d'entre elles a été évaluée selon la méthode ColEval® 8 fois au cours chacune des saisons, soit environ une fois par mois de mars à octobre plus un ColEval à l'automne précédent. Lors de ces mesures, les expérimentateurs évaluent la surface de chacune des composantes (couvain fermé, couvain ouvert, couvain de mâle, miel, pollen) ainsi que le nombre d'abeilles sur chaque face de cadre. On obtient ainsi un état global de dynamique de l'ensemble des colonies (Figure 2).



**Figure 2 :** Dynamique moyenne de l'ensemble des colonies en testage (hors YLC) en fonction du temps en 2016

La courbe rouge, correspondant aux nombre d'abeilles dans la colonie, augmente de mars à mi-mai pour atteindre un sommet de cloche (d'environ 5000 à 12 000 abeilles) avec environ 2,4 fois plus d'abeilles qu'au début de l'hiver 2015. Ensuite elle diminue progressivement pour atteindre en fin octobre 2016 une population comparable à celle d'octobre 2015. Cette courbe de population d'abeilles est à mettre en

parallèle avec les deux courbes marrons foncé et clair représentant le couvain d'ouvrières, bien qu'elles ne soient pas à la même échelle (couvain exprimé en nombre de cellules). En effet, avant d'émerger et d'être comptabilisée dans la population d'une ruche, une abeille passera par le stade couvain ouvert (marron clair), puis fermé (marron foncé). Il est attendu que ces trois courbes aient une même évolution en cloche au cours du temps.

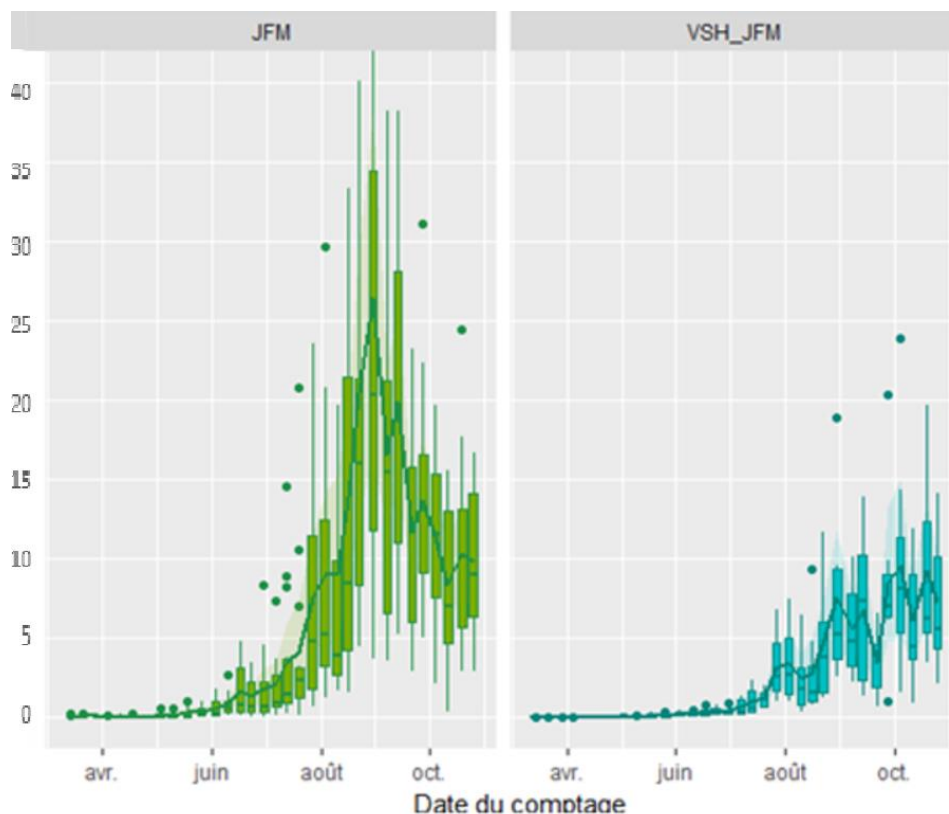
La courbe jaune correspond aux réserves (miel et nectar confondus), qui diminuent lentement tout au long de la période hivernale ce qui peut être interprété par la consommation hivernale des abeilles. Ces réserves sont ensuite multipliées par 12 durant la période de mi-avril à août (de 2 500 cellules environ à 30 000 soit 4 cadres de miel). Cette augmentation importante peut s'expliquer par la saison de butinage pour les abeilles.

Le deuxième lot expérimental présente une dynamique très similaire en 2017.

### 1.1.3 Suivi d'infestation Varroa

Le suivi d'infestation en Varroa des colonies peut être réalisé avec 3 méthodes différentes et complémentaires.

Le suivi des chutes naturelles consiste à compter les Varroas morts qui tombent de la colonie en plaçant des langes sous le plancher des ruches, séparées de la colonie par un grillage. Au total 35 comptages de Varroas sur lange ont été réalisés tout au long de chaque saison pour chaque colonie (en moyenne 1 comptage tous les 7 jours) (Figure 3).

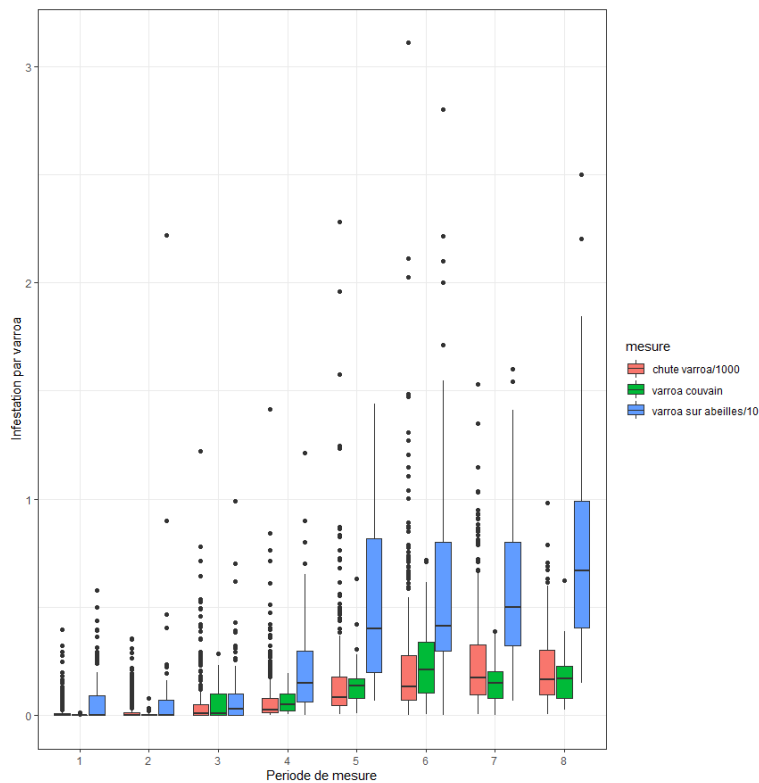


**Figure 3** : Comparaison des chutes naturelles par groupe d'éleveurs (nombre moyen de varroas sur lange par jour selon la date de comptage)

On peut noter que les colonies avec des reines d'origines supposées résistantes (VSH) présentent des chutes naturelles beaucoup moins importantes que les origines non sélectionnées (JFM). Avec 125 Varroas tombés par jour, le pic de chutes naturelles en septembre de JFM est presque 3 fois supérieur à celui des colonies VSH (environ 50 Varroas tombés par jour) et Résistantes (un peu moins de 50 en moyenne).

Le suivi des Varroas phorétiques consiste à estimer la proportion de Varroas sur abeilles adultes (Figure 4). Le nombre de Varroas présents sur les abeilles adultes est estimé en prélevant environ 30 g d'abeilles par ruche, directement sur les cadres. Chaque échantillon est pesé puis rincé au Teepol® afin de détacher les Varroas des abeilles. Le nombre de Varroas comptés est ramené au poids de l'échantillon. Les ruches ont été suivies sur ce paramètre à chaque ColEval, soit 8 fois par saison.

Le suivi des Varroas dans le couvain (Figure 4) est réalisé en désoperculant environ 200 cellules de couvain pour compter le nombre de cellules infectées par rapport au nombre de cellules ouvertes. Cette mesure est également réalisée lors de chaque ColEval mais seule la moitié des colonies, soit une trentaine au total, issue des différentes origines, a été évaluée car cette mesure est extrêmement chronophage (environ 15 min par colonie).



**Figure 4** : Boxplots de l'évolution de l'infestation par Varroa au cours du temps pour les colonies MOSAR pour les trois mesures d'infestation disponibles

#### 1.1.4 Critères de sélection pour la résistance à Varroa

Chaque colonie devait être évaluée sur les 3 critères possibles pour estimer la résistance à Varroa :

- **Le taux d'augmentation de la population de Varroa** se calcule en prenant en compte l'évolution du taux d'infestation au fil du temps. Les données ont donc été obtenues mais des analyses complémentaires sont nécessaires pour optimiser au mieux la prise en compte des différents paramètres (chutes naturelles, proportion sur abeilles, dans le couvain, taille de la population...).
- **Le critère SMR (Supressed Mite Reproduction)** consiste à estimer le taux de Varroas en échec de reproduction au sein d'une colonie. Ces échecs de reproduction peuvent s'expliquer par un problème propre au Varroa mais aussi par une action des abeilles qui limiterait sa reproduction ou qui éliminerait spécifiquement les Varroas qui se reproduisent. Ce critère dont les résultats sont présentés en Figure 5 a été mesuré de 0 à 5 fois sur chaque colonie.



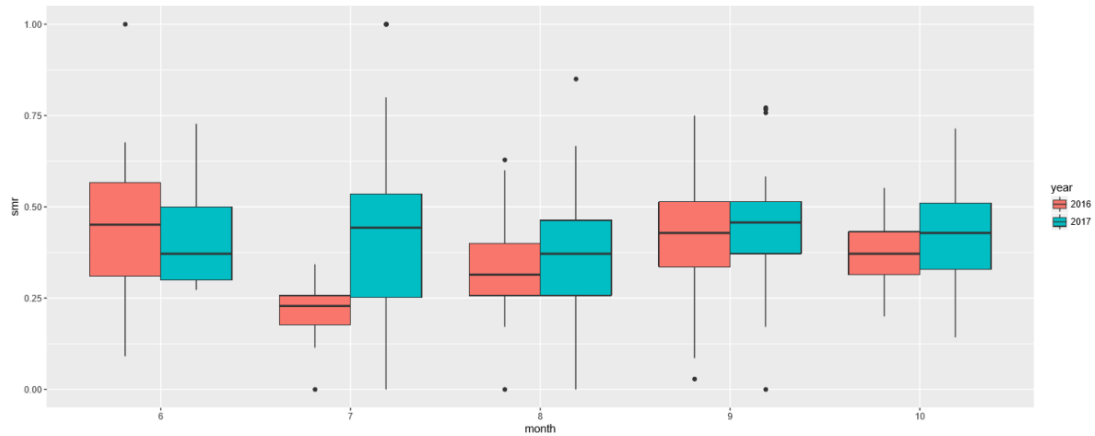


Figure 5 : Score SMR (% de Varroa en échec de reproduction) par mois pour les 2 années

- **Le critère VSH (Varroa Sensitive Hygiene)** a été évalué en regardant à quel point la colonie testée a réduit ou non l'infestation d'un cadre issue d'une colonie fortement infestée 7 jours après son introduction (Villa *et al.*, 2009). 55 colonies ont pu être correctement évaluées en 2017 sur ce critère.

## 1.2 Identification des points critiques et optimisation des méthodes

### 1.2.1 Taux d'augmentation de la population de Varroa

Le comptage des Varroas sur lange est le plus précis pour estimer le taux d'infestation d'une colonie quelle que soit la période (CIReine, projet CASDAR 2014-2017). Mais le nombre de Varroas à compter en période de forte infestation rend la mesure très fastidieuse en été. Par ailleurs, cette mesure nécessite d'avoir des ruches équipées de planchers spécifiques.

Le comptage des Varroas phorétiques par lavage d'abeilles est une mesure simple et rapide à mettre en œuvre. Le comptage des Varroas peut se faire à des périodes creuses en congelant les échantillons d'abeilles et le matériel nécessaire est très basique. En revanche, cette mesure est très imprécise lorsque l'infestation est faible. En effet, dans ce cas, l'échantillon d'abeilles prélevé ne permet pas d'obtenir un nombre de Varroas suffisant pour discriminer les colonies entre elles (cas du printemps par exemple).

Le comptage des Varroas dans le couvain, bien qu'apportant une information complémentaire très intéressante, demeure beaucoup trop complexe à mettre en œuvre de manière rapide et fiable. Il faut en effet pouvoir disposer d'un poste de comptage fermé pour pouvoir travailler sans être perturbé par les abeilles, une lampe afin d'observer correctement le fond des cellules et être entraîné à repérer rapidement les Varroas présents sur les nymphes ou dans les cellules. De plus, il faut compter environ 15 minutes pour mesurer cette infestation pour une colonie.

En suivant ces constats, la recommandation pour estimer le taux d'augmentation de la population de Varroa est de mesurer l'infestation initiale via les chutes naturelles et l'infestation finale avec les Varroas phorétiques. Si la mesure des chutes naturelles est trop complexe à mettre en œuvre, des mesures de Varroas phorétiques seules peuvent convenir si celles-ci sont réalisées à une période où l'infestation commence à être importante.

### 1.2.2 Critère VSH

Le point très critique pour mettre en œuvre ce test est la disponibilité d'un cadre de couvain avec des larves du bon stade et homogène (éviter l'émergence de couvain âgé du cadre infesté dans la colonie testée notamment) ayant un fort niveau d'infestation.

En 2016, malgré la mise à disposition d'un rucher spécialement dédié à la conservation d'une vingtaine de ruches infestées, il s'est avéré impossible de disposer de suffisamment de cadres pour mesurer les 60 colonies même en répartissant les mesures sur la saison.

Pour parvenir à mesurer une soixantaine de colonies, il faut compter une cinquantaine de colonies dites « pourvoyeuses de Varroa » mises en place uniquement avec l'objectif de fournir des cadres avec un niveau d'infestation en Varroa suffisant et des patchs de couvain de taille suffisante. L'utilisation de cages (Figure 6) permet également de s'assurer du stade du couvain qui est prélevé dans la colonie pourvoyeuse mais nécessite un travail de recherche des reines et d'encagement supplémentaire.



**Figure 6** : Cage pour encagement d'une reine sur un cadre

### 1.2.3 Critère SMR

Cette mesure s'est révélée très complexe à mettre en œuvre, y compris pour une station expérimentale. Tout d'abord, sa réalisation nécessite une formation assez poussée pour que le personnel technique la réalise correctement. Il faut en effet être capable de distinguer des stades très proches de nymphes d'abeilles et de parasites. De plus, le temps nécessaire à l'analyse d'une colonie par une personne formée et efficace est très important : 2 à 4 h, en plus de la recherche du cadre permettant la mesure. Enfin, elle nécessite certaines conditions souvent délicates à obtenir : stade de couvain précis en surface suffisante, infestation assez élevée (minimum de 2 % dans le couvain).

### 1.3 Diffusion de fiches techniques

L'expérience acquise a démontré l'importance de la maîtrise d'une multitude de détails techniques, la sous-évaluation du temps de travail nécessaire et l'extrême importance des compétences à acquérir. Au final, MOSAR permet à l'ensemble des acteurs de la filière intéressés par ce sujet d'éviter les écueils que l'équipe de l'ITSAP – Institut de l'abeille a rencontrés puis surmontés. Pour cela, les fiches techniques mettent avant tout en avant les aspects pratiques de mise en œuvre des mesures et du temps à y consacrer.

Trois fiches techniques ont ainsi été rédigées et diffusées via les supports de l'ITSAP – Institut de l'abeille (Figure 7). Chaque fiche reprend la mesure d'un des critères de sélection possible pour la résistance au Varroa : SMR (Suppressed Mite Reproduction), VSH (Varroa Sensitive Hygiene) et taux de croissance de la population de Varroa.



Figure 7 : Fiches techniques pour les critères de sélection pour la résistance au Varroa

## 2. Méthodes de mesures de la résistance à Varroa : facteurs affectant les différentes méthodes et lien entre eux

Le phénotypage réalisé pour le projet MOSAR est inédit par le nombre de colonies mesurées sur un nombre important de critères liés à la résistance à Varroa. Ce jeu de données, complété par d'autres projets complémentaires est encore en cours d'analyse mais plusieurs résultats intéressants ont déjà été communiqués.

### 2.1 Mesure SMR

#### 2.1.1 Variance de la mesure

Le protocole utilisé dans le cadre de MOSAR pour estimer le score SMR prévoit de se baser sur un échantillonnage de 35 cellules infestées par une fondatrice Varroa pour estimer le taux de reproduction de Varroa. Cela n'est pas toujours possible à atteindre, par exemple si l'infestation par Varroa est trop faible sur cette colonie. Le jeu de données MOSAR comporte donc une variation autour de cette valeur de 35 : 26 % des données sont mesurées sur moins de 35 cellules et 3 % sur plus de 35 cellules. Le nombre de cellules à une fondatrice disséquées est un paramètre critique du score SMR : plus ce nombre est faible, plus la variance du score SMR est élevée (Figure 8).

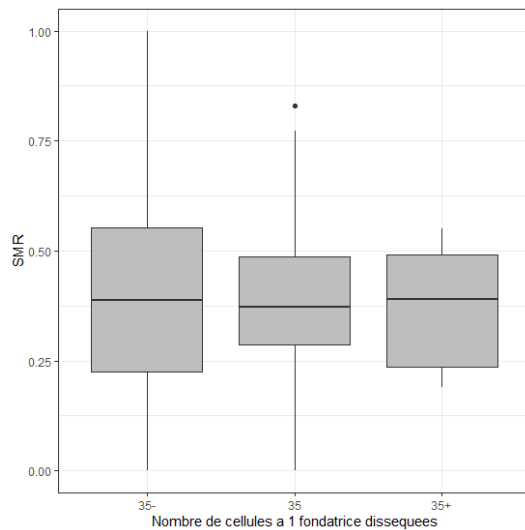


Figure 8 : Variance de la mesure de SMR selon le nombre de cellules à une fondatrice disséquées.

Pour prendre en compte ce biais d'échantillonnage il est possible de :

- Corriger le score SMR par la méthode Empirical Bayes, qui permet d'adapter la valeur des paramètres associés à la distribution des données disponibles et de corriger les mesures par ces paramètres, cette méthode est équivalente à une méthode de réduction par laquelle les valeurs extrêmes vont être rapprochées de la valeur moyenne des données disponibles (cette méthode est détaillée et utilisée dans deux articles scientifiques – Mondet, 2020 ; Eynard, 2020 - en lien avec l'analyse de SMR, dont un utilisant les données MOSAR) ;
- Mettre un poids lié au nombre de cellules infestées par une fondatrice sur le score SMR lors des analyses *a posteriori*.

### 2.1.2 Effet de différents paramètres

L'effet de multiples variables collectées au cours de MOSAR a été testé sur SMR. Il apparaît que le SMR est significativement influencé par la quantité de réserves de la colonie, la quantité de couvain et l'infestation par Varroa (effets négatifs) ainsi que par le comportement de réoperculation (effet positif). Moins de réserves, de couvain et d'infestation par Varroa et d'avantage de réoperculation sont liés à un plus haut score SMR. L'observateur et la période de mesure ont aussi un effet sur le score SMR.

Par contre, comme l'illustre la Figure 9 nous n'avons pas observé d'effet du groupe génétique (JFM, YLC et VSH) sur le score SMR.

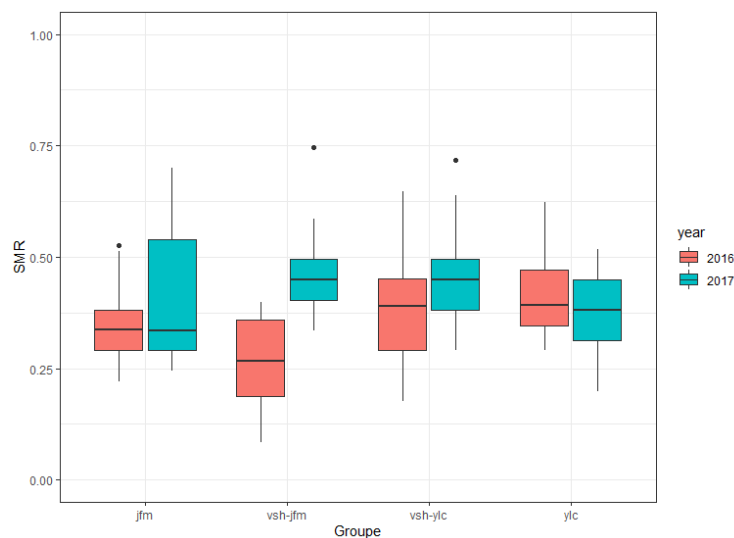
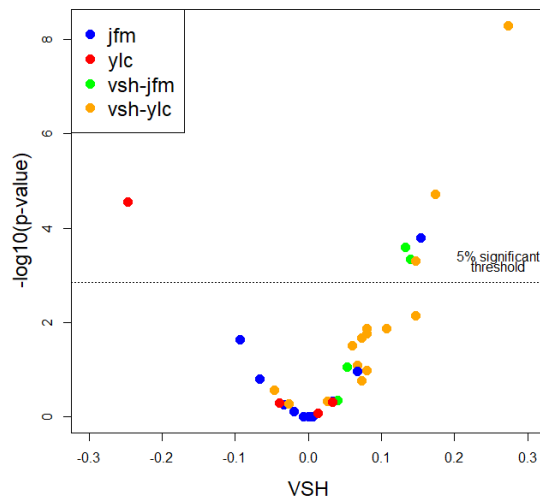


Figure 9 : Boxplots des mesures SMR des colonies MOSAR pour chacun des groupes génétiques, chaque année

## 2.2 Mesure VSH

### 2.2.1 Fiabilité de la mesure

Afin d'estimer la fiabilité de la mesure, la significativité de l'évolution de l'infestation entre J0 et J7 a été testée. Une colonie semble avoir une augmentation d'infestation significative, ce qui semble improbable et peut donc être considéré comme une erreur dans la mesure. Six colonies présentent une diminution significative de l'infestation par Varroa et peuvent donc être considérées comme hygiéniques vis-à-vis de Varroa (points le plus à droite sur la Figure 10). Ce résultat confirme la pertinence de la génétique utilisée dans le cadre du projet MOSAR comme l'USDA l'avait montré sur ses colonies sélectionnées (Danka, 2015).



**Figure 10** : Volcano plot représentant les  $\log_{10}(\text{p-values})$  estimées pour un test de changement du taux d'infestation entre J0 et J7 de l'expérience. Les points de couleur représentent les différents groupes génétiques utilisés dans MOSAR.

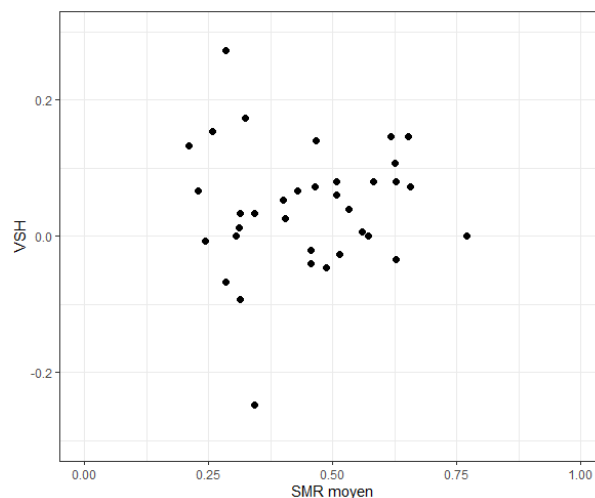
Ces données interrogent sur la précision de l'échantillonnage (150 cellules ouvertes pour mesurer le taux d'infestation initial et 150 autres pour le taux d'infestation final).

### 2.2.2 Effet de différents paramètres

L'infestation par *Varroa*, mesurée sous la forme du *Varroa* phorétique, a un effet négatif significatif sur VSH signifiant que plus l'infestation sur les abeilles adultes est forte plus VSH est faible et donc moins la colonie adopte un comportement hygiénique. De plus l'observateur et l'éleveur ont aussi un faible effet significatif sur VSH. On peut observer que les colonies croisées avec les colonies sélectionnées pour le caractère VSH semblent avoir des mesures légèrement plus élevées pour VSH.

### 2.3 Corrélations entre les mesures

Les mesures de SMR et VSH n'ayant pas été réalisées au même moment, la corrélation a été estimée entre le caractère VSH et le SMR moyen (à travers toutes les mesures effectuées sur la colonie). Sur le jeu de données MOSAR, il ne semble n'y avoir aucune relation entre les caractères VSH et SMR (Figure 11).



**Figure 11** : Mesures du caractère VSH en fonction du SMR moyen des colonies MOSAR

### 3. Vers des outils innovants plus accessibles au monde apicole

L'ensemble des méthodes développées par les laboratoires de recherche pour sélectionner la résistance à Varroa demeure trop complexe et coûteux à mettre en œuvre à grande échelle pour mettre en place une telle sélection à l'échelle de la filière. Le projet MOSAR a donc contribué à progresser dans deux pistes de solutions potentielles qui permettraient à un grand nombre d'apiculteurs de mettre en œuvre une mesure de la résistance de leurs colonies.

#### 3.1 Une méthode de phénotypage qui simule une infestation

Via des composés chimiques simulant une infestation du couvain par des Varroas reproducteurs, un test comportemental réalisable facilement sur le terrain par les apiculteurs permettrait d'évaluer la capacité des colonies à résister au Varroa.

L'intérêt d'une telle méthode, nommée Varestic, est qu'elle éviterait la plupart des contraintes très limitantes liées à la mesure VSH standard :

- Besoin d'une infestation forte qui implique une période de mesure très courte ;
- Nécessité de formation pointue pour détecter les différents stades de reproduction du Varroa ;
- Temps et matériel nécessaires à l'ouverture d'un nombre de cellules infestées significatif.

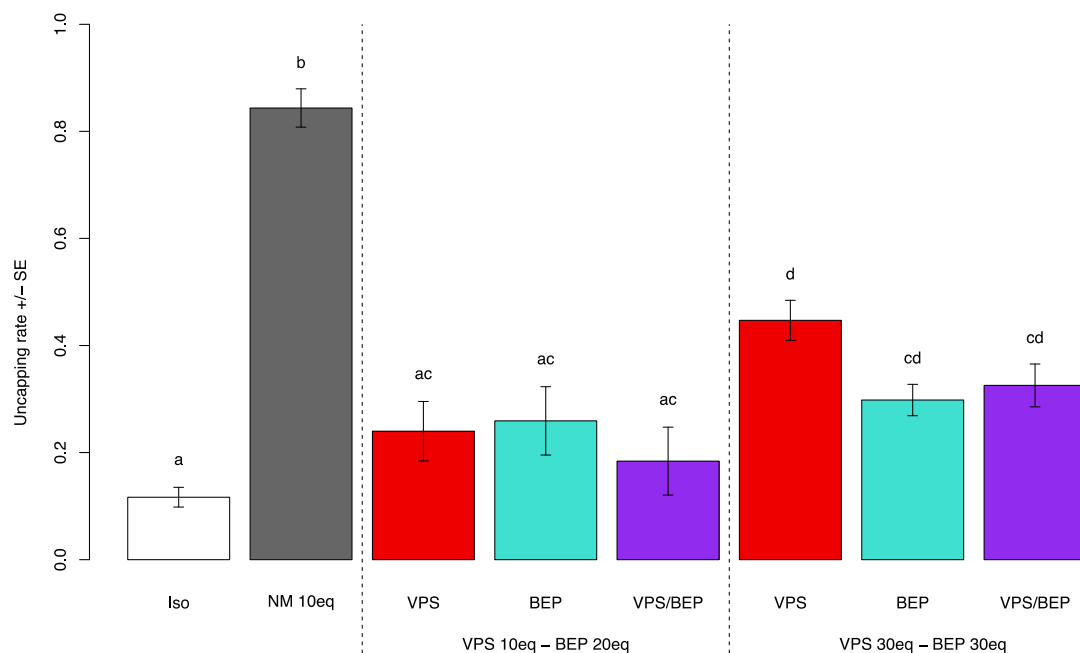
A partir de molécules candidates identifiées en 2014 (Mondet, 2015), des composés sémiocchimiques naturellement présents dans les alvéoles infestées, et capables de déclencher une activité de désoperculation au sein de la colonie ont pu être sélectionnés (composés VPS, Varroa Parasitised Specific, et BEP, Brood Ester Pheromone). La deuxième étape nécessite de mettre au point une procédure d'application des composés actifs au sein de la colonie qui puisse être utilisée comme proxy du comportement VSH, et qui soit facile et rapide à mettre en œuvre. Pour cela, différents modes d'application ont été testés et comparés. La validation de la méthode pour sa capacité à déterminer le niveau d'expression du caractère VSH d'une colonie a été étudiée via la corrélation entre la capacité des colonies à répondre à ces molécules et leur potentiel VSH.

#### 3.1.1 Validation des composés chimiques

Dans un premier temps, différentes concentrations du mélange VPS ont été testées, afin d'établir une courbe dose-réponse. A partir de ces résultats, les doses 10 et 30 équivalents ont été retenues pour tester les VPS individuellement.

Les 6 composés VPS ont été testés individuellement *versus* par paire ou en mélange. Il s'est avéré que toutes les molécules semblent actives.

Les mélanges de composés VPS ont été testés en comparaison du mélange BEP et du mélange global BEP/VPS. On observe également que les trois types de mélanges sont actifs (Figure 12), ce qui confirme dans un premier temps tous les candidats initialement retenus.

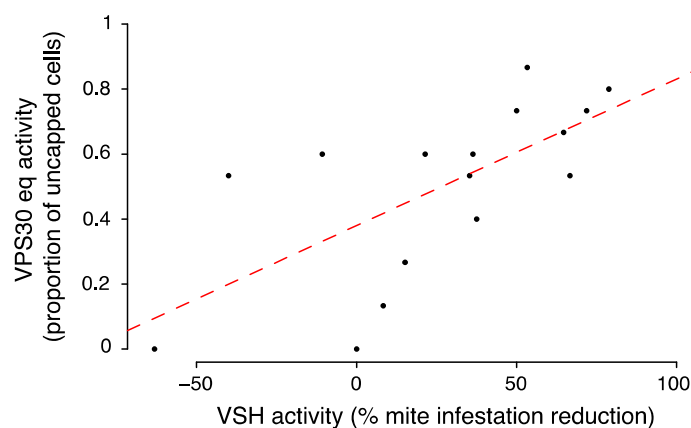


**Figure 12** : Taux de désoperculation par modalité. Tests des deux familles de molécules VPS et BEP, séparément ou en mélange.

Ces études se sont poursuivies en 2018 et début 2019 afin d'affiner ces résultats. En effet, dans une optique de développement industriel, un mélange final comprenant un nombre limité de composés serait plus adapté qu'un mélange de nombreux composés (pour des raisons de coût de production).

### 3.1.2 Test de corrélation entre la réponse au test chimique et la réponse au Varroa (SMR ou VSH)

Un test expérimental pour comparer la réponse au test des molécules chimiques et la réponse VSH des colonies a été conduit, ce qui correspond intrinsèquement à la comparaison directe des mêmes comportements (mis à part les biais liés aux protocoles de mesure). Une corrélation très significative avec un bon degré de corrélation ( $r = 0,48$ ) a été identifiée, ce qui est très encourageant pour la possibilité d'utiliser les composés VPS et le test Varestic comme outil de diagnostic de l'activité VSH (Figure 13).



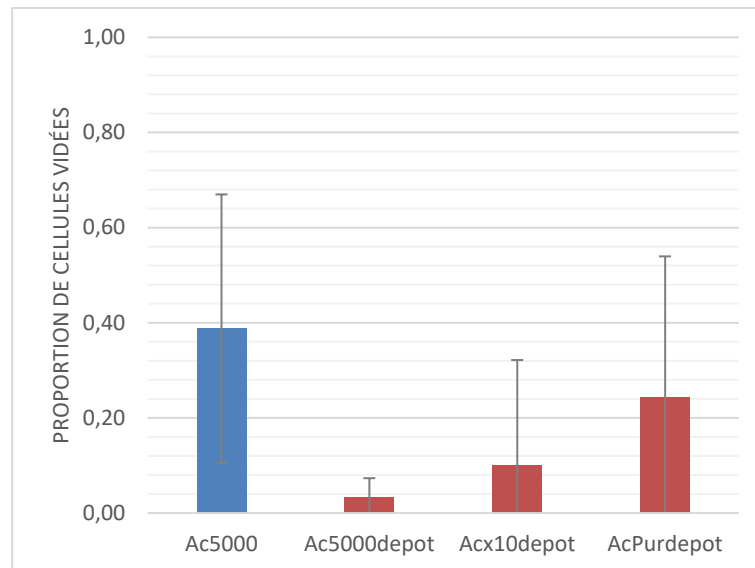
**Figure 13** : Relation entre la réponse aux composés VPS dans le test Varestic et le score VSH

### 3.1.3 Mise au point de la méthode Varestic de phénotypage du comportement VSH

Dans un premier temps, les composés étaient déposés sur l'opercule comme alternative à l'injection. Pour cela différentes concentrations (en équivalents) ont été testées avec le mélange des VPS d'une part, et de BEP d'autre part. Le premier essai a été réalisé en appliquant la même dose par dépôt que par injection.

Ces tests indiquent une très faible réponse aux traitements, quelle que soit la concentration testée (10, 20 ou 30 eq) et le mélange utilisé (VPS ou BEP).

Un test complémentaire sur un contrôle positif (substance induisant une forte activité de désoperculation, l'acide oléique) a été réalisé afin de pouvoir tester le dépôt de fortes concentrations de composés.



**Figure 14** : Réponse au test Varestic suite à l'injection (bleu) ou le dépôt (orange) d'acide oléique

Le résultat de la Figure 14 indique qu'il est nécessaire d'appliquer des concentrations très fortes d'acide oléique (produit pur) pour pouvoir obtenir une réponse comportementale significative par dépôt.

Nous avons cherché à reproduire ce résultat avec nos composés candidats mais avons été confrontés à une limite de solubilité de la plupart des composés dans notre solvant (hexane).

Les travaux de recherche actuels s'orientent donc vers la recherche d'un nouveau solvant ou d'un milieu de transport des molécules candidates pour pouvoir tester une gamme de concentrations plus élevées.

Une solution alternative au traitement d'alvéoles de couvain operculé, consistant à placer dans les colonies des leurres de paraffine imprégnés de composés candidats (VPS et/ou BEP) et à observer si les abeilles détruisent ces leurres a été testée.

La moyenne de quantité de leurre détruite était identique entre le lot traité aux molécules VPS et le lot contrôle ( $24 \pm 15 \%$ , vs  $25 \pm 17 \%$ ).

Ce résultat pourrait s'expliquer par le fait que cette modalité d'application par leurres est très éloignée du contexte « naturel » dans lequel se fait le comportement VSH, à savoir sur une alvéole de couvain operculé. Il était intéressant de tester cette opportunité car en termes d'application industrielle et d'application par les utilisateurs elle aurait été compétitive, cependant et dans la limite des résultats obtenus, elle ne semble pas à retenir pour une phase de développement.

### 3.2 Les outils de génomique

Disposer de marqueurs génétiques associés à des comportements de résistance à Varroa permettrait à tous les apiculteurs de faire tester leurs colonies afin de connaître leur potentiel de résistance.

Le nombre de colonies phénotypées dans le projet MOSAR ne permet pas de rechercher des marqueurs qui soient fiables mais a permis de progresser vers cet objectif poursuivi par différents projets complémentaires.



Particulièrement, un projet de détection de marqueurs de sélection de plus grande envergure (BeeStrong porté par Labogena), dont le montage a bénéficié des réflexions et expériences accumulées lors du projet MOSAR, a démarré en mai 2016. En conséquence, les données des deux projets seront jointes pour réaliser une analyse d'association complète, portant sur plus de 1500 colonies.

Une première analyse avec une partie des données n'a pas permis de détecter de marqueurs liés à la résistance au *Varroa*, mais une nouvelle analyse sera bientôt réalisée avec l'ensemble des données.

A plus court terme, le projet MOSAR a permis de mettre au point le séquençage en mélange des ouvrières d'une colonie. En effet, afin de réaliser l'analyse d'association sur la colonie et non sur un seul individu, comme dans les espèces de rente classiques, des adaptations méthodologiques étaient nécessaires.

## Conclusion

Le projet MOSAR constitue un socle important pour le développement de la sélection pour la résistance à *Varroa* dans la filière apicole.

L'évaluation dans des conditions de production des critères développés dans des laboratoires de recherche a permis d'identifier tous les points de vigilance incontournables pour une réalisation fiable de ces mesures. Dans la limite du possible, ces techniques ont été optimisées afin de limiter au maximum le coût et le temps nécessaires à leur réalisation. Malgré cela, afin de conserver des mesures pertinentes, ces mesures demeurent très complexes à mettre en œuvre à grande échelle, à la fois en raison des compétences requises et du temps nécessaire à leur réalisation. La diffusion de références techniques auprès de la filière permet d'accompagner les apiculteurs ou les structures qui se sont lancés dans ce méticuleux travail de sélection. Le nombre élevé de projets de sélection démarrés dans la filière apicole en s'appuyant sur les acquis du projet MOSAR illustre bien l'importance du travail effectué. Au-delà du projet, cet accompagnement se poursuit à travers de nombreuses formations et collaborations de long terme entre l'UMT PrADE et les partenaires professionnels.

Bien qu'elles n'aient pu aboutir, les différentes pistes de recherche technologique ont significativement progressé au cours du projet et se poursuivent à l'heure actuelle au sein des différents laboratoires impliqués. On peut particulièrement noter l'implication forte, dans ces projets complémentaires, de structures privées en capacité de commercialiser à grande échelle les solutions imaginées.

## Remerciements

L'équipe-projet remercie :

- Les membres du comité de pilotage pour leur présence aux réunions et leurs conseils avisés ;
- L'ensemble des équipes techniques qui sont intervenues pour assurer la réalisation du projet ;
- Le ministère de l'Agriculture, de l'Alimentation et de la Forêt pour le financement.

## Références bibliographiques

Alaux C., Brunet J.-L., Dussaubat C., Mondet F., Tchamitchan S., Cousin M., Brillard J., Baldy A., Belzunces L. P., Le Conte Y., 2010. Interactions between *Nosema* microspores and a neonicotinoid weaken honeybees (*Apis mellifera*). *Environmental Microbiology*, 12, 774–782.

Basso B., 2013. Hiver 2012-2013 : un taux de pertes national stable malgré de fortes disparités régionales – Lettre de l'ITSAP - Institut de l'abeille (août 2013).

Elzen P.J., Baxter J.R. Westervelt D., Randall C., Wilson W.T., 2000. Control of *Varroa jacobsoni* Oud resistant to fluvalinate and amitraz using coumaphos. *Apidologie* 31, 437–441.

- Eynard S., Sann C., Basso B., Guirao A.-L., Le Conte Y., Servin B., Tison L., Vignal A., Mondet F., 2020. Descriptive Analysis of the Varroa Non-Reproduction Trait in Honey Bee Colonies and Association with Other Traits Related to Varroa Resistance. *Insects*, 11(8):492.
- Fries I., Imdorf A., Rosenkranz P., 2006. Survival of mite infested (*Varroa destructor*) honeybee (*Apis mellifera*) colonies in a Nordic climate, *Apidologie* 37, 564-570.
- Harbo J.R. et Harris J.W., 2005. Suppressed mite reproduction explained by the behaviour of adult bees. *J. Apic. Res* 44: 21-23.
- Harris J.W., Danka R.G., Villa J.D., 2010. Honey bees (Hymenoptera: Apidae) with the trait of Varroa sensitive hygiene remove brood with all reproductive stages of Varroa mites (Mesostigmata: Varroidae). *Annals of the Entomological Society of America* 103(2): 146-152.
- Henry M., Beguin M., Requier F., Rollin O., Odoux J.-F., Aupinel P., *et al.*, 2012. A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. *Science* 336, 348–350.
- Holzmann, 2012. ITSAP - Institut de l'abeille - Cahier technique Hivernage et pertes de colonies chez les apiculteurs professionnels français – 45 p
- Johnson R.M., Dahlgren L., Siegfried B.D., Ellis M.D., 2013. Acaricide, fungicide and drug interactions in honey bees (*Apis mellifera*). *PloS One*, 8(1), e54092.
- Le Conte Y., De Vaublanc G., Crauser D., Jeanne F., Rousselle J.C., Becard J.M., 2007. Honey bee colonies that have survived *Varroa destructor*, *Apidologie* 38, 566–572
- Le Conte Y., Ellis M., Ritter W., 2010. Varroa mites and honey bee health: can Varroa explain part of the colony losses? *Apidologie* 41(3): 353-363.
- Milani N., 1999. The resistance of *Varroa jacobsoni* oud. To acaricides. *Apidologie* 30(2-3):229-234
- Mondet F., 2015. Host-parasite interactions between the honey bee, *Apis mellifera*, and the mite *Varroa destructor*: Insights into virus infections and Varroa Sensitive Hygiene (Thesis, Doctor of Philosophy). University of Otago. Retrieved from <http://hdl.handle.net/10523/5473>
- Mondet et al., 2020. Evaluation of Suppressed Mite Reproduction (SMR) Reveals Potential for Varroa Resistance in European Honey Bees (*Apis mellifera* L.) DOI: 10.3390/insects11090595
- Mondet F., Beaurepaire A., McAfee A., Locke B., Alaux C., Blanchard S., Danka B., Le Conte Y., 2020. Honey bee survival mechanisms against the parasite *Varroa destructor*: a systematic review of phenotypic and genomic research efforts. *International Journal for Parasitology*, Elsevier, 2020, 50 (6-7), pp.433-447.
- Mullin C.A., Frazier M., Frazier J.L., Ashcraft S., Simonds R., vanEngelsdorp D., Pettis J.S., 2010. High Levels of Miticides and Agrochemicals in North American Apiaries: Implications for Honey Bee Health. *PLOS ONE*, 5(3).
- Pettis J.S., Collins A.M., Wilbanks R., Feldlaufer M.F., 2004. Effects of coumaphos on queen rearing in the honeybee, *Apis mellifera*. *Apidologie*.; 35:605–610.
- Oldroyd B.P., 2007. What's killing American honey bees? *PLoS biology* 5, e168
- Rosenkranz P., Aumeier P., Ziegelmann B., 2010. Biology and control of *Varroa destructor*. *Journal of Invertebrate Pathology* 103(Supplement 1): S96-S119.

Cet article est publié sous la licence Creative Commons (CC BY-NC-ND 3.0).



<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>

Pour la citation et la reproduction de cet article, mentionner obligatoirement le titre de l'article, le nom de tous les auteurs, la mention de sa publication dans la revue « *Innovations Agronomiques* », la date de sa publication, et son URL ou DOI).