



Les micro-champignons, nouvel espoir dans la lutte biologique contre *Varroa destructor*

William MEIKLE
Guy MERCADIER
Vincent GIROD

Depuis près de vingt ans, les techniques de lutte chimique n'ont pas permis de venir à bout de *Varroa destructor*. Cet acarien parasite représente toujours à ce jour une menace permanente pour les colonies d'*Apis mellifera*. En laboratoire, il a été démontré que plusieurs espèces de champignons entomopathogènes, que l'on trouve à l'état naturel dans les colonies d'abeilles, présentent une certaine virulence vis-à-vis de *Varroa*. Voici les résultats des deux premières années d'une étude menée par l'European Biological Control Laboratory (EBCL) en collaboration avec le comité technique et sanitaire apicole du Gard (CTSAG) et l'Association de développement de l'apiculture professionnelle en Languedoc-Rousillon (ADAPRO-LR).

La lutte chimique contre *Varroa* présente une série de problèmes. En plus des résidus de produits retrouvés dans la cire et dans les miels, des résistances aux produits les plus utilisés comme le fluvalinate et le coumaphos ont été observées en plusieurs endroits.

Les biopesticides et plus particulièrement les champignons entomopathogènes peuvent présenter une alternative aux produits chimiques dans certains domaines agricoles. Les apiculteurs connaissent ainsi les préparations de *Bacillus thuringiensis* Berliner qui sont enregistrées (B 401) pour lutter contre la grande teigne *Galleria mellonella*. Plusieurs espèces de champignons entomopathogènes sont également actives. Des essais préliminaires ont montré qu'*Hirsutella thomsonii* Fisher et *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin affectent la densité d'acariens dans les colonies d'abeilles et que *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Deuteromycota : Hyphomycetes) infecte des varroas en laboratoire.



Larve de *Galleria mellonella* envahie par *B. bassiana*

Mouche de l'olivier envahie par *B. bassiana*

LA LUTTE BIOLOGIQUE AVEC DES MICRO-ORGANISMES

Les micro-organismes utilisés en lutte biologique sont des virus, des bactéries, des micro-champignons, des nématodes ou des protozoaires. À ce jour, plusieurs milliers de micro-organismes entomopathogènes et pathogènes des mauvaises herbes ont été décrits et plusieurs espèces sont utilisées en plein champ. Ils sont naturellement présents dans l'environnement (sol, air, eau) et infectent généralement leur hôte soit par ingestion, soit par pénétration à travers la cuticule ou par les orifices. L'agent pathogène se multiplie dans l'hôte en lui causant des dommages par destruction des tissus, entraînant sa mort plus ou moins immédiate par septicémie ou toxémie.

Parmi les micro-organismes utilisés en lutte biologique, plus de 700 espèces de micro-champignons sont entomopathogènes et jouent un rôle important dans la régulation naturelle des populations d'insectes.

Le plus grand nombre de ces champignons pathogènes se trouve dans la classe des Zygomycètes, mais les plus utilisés en lutte biologique proviennent des Deuteromycètes (Fungi imperfecti).

Les espèces des genres *Beauveria*, *Metarhizium*, *Verticillium*, *Erynia*, *Hirsutella*, *Entomophthora*, *Entomophaga*, *Paecilomyces* et *Aschersonia* sont les plus utilisées en lutte biologique. Elles ont un intérêt agronomique majeur dans la lutte biologique contre les ravageurs de cultures et font l'objet d'études de plus en plus poussées.



UN PARTENARIAT ADAPRO-LR/EBCL

Fin 2004, l'EBCL envisageait de mettre en place un programme de recherche portant sur l'utilisation de champignons entomopathogènes pour lutter contre *Varroa destructor*. Un contact s'est établi naturellement entre l'EBCL (Guy Mercadier et William Meikle, tous deux chercheurs) et l'ADAPRO-LR (Vincent Girod, technicien) en vue d'aboutir à la réalisation d'expérimentations de terrain en Languedoc-Roussillon répondant aux objectifs et attentes de chacun. Ce partenariat s'est concrétisé en 2005 et 2006 et a déjà donné lieu à des publications scientifiques et des communications auprès d'apiculteurs (séminaires de l'ADAPRO-LR...).



L'EUROPEAN BIOLOGICAL CONTROL LABORATORY

Le principal laboratoire de lutte biologique de l'USDA/ARS (United States Department of Agriculture/ Agricultural Research Service) hors États-Unis se trouve près de Montpellier (Hérault).

Il s'agit de l'EBCL, né en 1991 de la fusion de l'ancien Laboratoire européen des parasites fondé à Paris en 1919 avec le Laboratoire de contrôle biologique des mauvaises herbes ouvert à Rome en 1958. L'EBCL est la première installation de recherche construite en dehors des USA par l'USDA/ARS.

Les recherches menées par les spécialistes de l'EBCL visent à développer des technologies de lutte biologique pouvant être utilisées pour limiter l'invasion des insectes nuisibles et des mauvaises herbes.

LA STATION EXPÉRIMENTALE APICOLE ADAPRO-LR/CTSAG

A l'initiative de quelques apiculteurs professionnels du Gard, en 2000, a été créé le Comité technique et sanitaire apicole du Gard (CTSAG) dont la vocation est de mettre en place des expérimentations pour répondre aux préoccupations des apiculteurs professionnels. Le CTSAG a passé une convention avec l'ADAPRO-LR (Association de développement de l'apiculture professionnelle en Languedoc-Roussillon) qui regroupe actuellement plus d'une centaine d'apiculteurs professionnels et cinq structures apicoles départementales (groupements de défense sanitaire apicole et syndicats). Les missions que le CTSAG confie à l'ADAPRO-LR concernent principalement l'étude du nourrissage des colonies, la recherche de méthodes alternatives de lutte contre *Varroa destructor* et autres maladies du couvain, et une veille sur la qualité des produits de la ruche à partir d'analyses ciblées d'échantillons de miels et de cires, fournis par les apiculteurs ou issus d'expérimentations. Ces actions, selon le cas, sont réalisées soit sur le rucher expérimental créé en 2000 par les apiculteurs du CTSAG, soit chez des apiculteurs professionnels volontaires. Le programme d'expérimentation est financé par VINIFLHOR, le Conseil général du Gard et les apiculteurs.

Le rucher expérimental, qui comptait une cinquantaine de colonies en 2006, permet de tester de nouveaux produits ou de nouvelles méthodes avant de passer aux expérimentations chez les apiculteurs, qui mettent alors du temps de travail et des colonies à disposition pour les essais. Chaque année, plus d'une centaine de colonies sont ainsi concernées par les expérimentations.

Les différents contacts établis depuis 4 ans et une veille bibliographique régulière ont permis d'établir des collaborations avec des laboratoires privés, des centres de formation, des organismes de recherche. Le CTSAG et l'ADAPRO-LR ont ainsi acquis différents produits et formulations présents sur le marché national ou international et les ont testés dans les conditions d'une apiculture méditerranéenne.



Rucher expérimental EBCL



Rucher expérimental ADAPRO-LR/CTSAG



MODE D'ACTION DU CHAMPIGNON *BEAUVERIA BASSIANA*

Le mode d'infection de *B. bassiana* se divise en quatre étapes distinctes :

- **l'adhésion** est caractérisée par un mécanisme de reconnaissance et de compatibilité des spores avec les cellules tégumentaires de l'insecte. Cette phase se scinde en deux étapes distinctes : la première, passive, est la fixation sur la cuticule, réalisée grâce à des forces hydrophobes et électrostatiques ; la seconde, active, est caractérisée par la production d'un mucilage qui va engendrer une modification épicuticulaire aboutissant à la germination ;
- **la germination** va dépendre des conditions environnantes et aussi de la physiologie de l'hôte (composition biochimique de la cuticule de l'hôte), qui peuvent la favoriser ou l'inhiber ;
- **la différenciation** est caractérisée par la production de tubes germinatifs encore appelés appressorium. Ces structures terminales vont servir de point d'ancrage, ramollir la cuticule et favoriser la pénétration ;
- **la pénétration** de l'hôte se fait par la combinaison de pressions mécaniques et de processus enzymatiques. La colonisation de l'hôte a lieu lorsque le champignon parvient à surmonter les mécanismes immunitaires de défense de l'insecte et qu'il envahit l'hémolymphe.

DÉCOUVERTE DE LA SOUCHE BB05002

Durant le printemps 2005, une récolte de varroas a été réalisée dans 12 ruchers (112 colonies). Plus de 3.000 varroas sont tombés suite à des saupoudrages de colonies avec du sucre glace (\pm 150 g de sucre saupoudré sur les abeilles au niveau du couvain - fermeture de la ruche pendant 20' - récolte des varroas tombés sous le grillage du plancher). Les acariens ont été placés dans des boîtes de Pétri dans un milieu neutre favorable au développement naturel des champignons. Seul *Beauveria bassiana* a été trouvé, et uniquement dans 4 des 12 ruchers.

Sur base de ces résultats, l'équipe de l'EBCL a axé son travail sur cette souche naturellement présente dans des ruchers et ils l'ont référencée « Bb05002 ».

BIOESSAIS DE LABORATOIRE

Avant d'envisager une utilisation sur le terrain de cette souche de champignon, elle devait faire l'objet d'une expérimentation en laboratoire en conditions contrôlées. L'objectif des bioessais réalisés durant l'été 2005 était d'évaluer l'action pathogène et la virulence de cette souche Bb05002 sur *Varroa destructor*.

Pour cela, une technique de conservation de varroas vivants a été mise au point et validée et la souche identifiée de *Beauveria bassiana* a été mise en culture pour obtenir une suspension de 10^7 spores/ml. L'essai a consisté, après dépôt d'une dose de spores sur les varroas vivants, à analyser la durée de vie des acariens. Pour leur permettre de s'alimenter, les varroas sont placés par deux sur des nymphes d'abeilles (renouvelées tous les 3 à 4 jours). Ils sont maintenus à 30°C dans un milieu humide (humidité relative de 85 %). Lors des contrôles journaliers, les acariens morts sont placés dans un milieu de culture pour confirmer l'infection par *Beauveria bassiana*. Deux essais ont été réalisés. La durée de vie des varroas infectés a été en moyenne de 5 et de 8 jours lors du premier et du second essai, et celle des varroas témoins, respectivement de 23,5 et de 26 jours. Ces résultats démontrent une action pathogène de la souche Bb05002 de *Beauveria bassiana* en conditions de laboratoire.

ESSAIS DE TERRAIN 2005

Deux premiers essais sur colonies dans les conditions de la pratique apicole ont été effectués durant l'automne 2005 : en septembre dans un rucher de l'EBCL et en octobre dans un rucher de l'ADAPRO-LR situé à Lattes. L'objectif était triple :

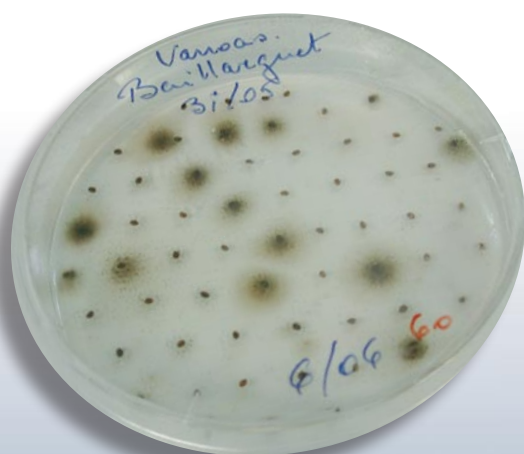
- vérifier l'action pathogène des spores de la souche Bb05002 sur des colonies infestées de varroas ;
- observer la durée de vie des varroas dans les colonies traitées et dans des colonies (proches) non traitées ;
- estimer la quantité de spores présentes sur les abeilles.

Dans les deux ruchers, les essais ont été réalisés sur des colonies Dadant 10 cadres, équipées d'un plancher grillagé avec un set de deux plateaux entièrement grillagés disposant d'une plaque de fermeture coulissante sur laquelle on place un large autocollant quadrillé pour le comptage des varroas. On peut ainsi réintroduire un nouveau linge dès le retrait de celui en place.

Après un travail long et fastidieux de mise en culture de la souche Bb05002 de *Beauveria bassiana* et de vérification de la viabilité des spores, celles-ci ont été mélangées avec de la poudre neutre Entostat® utilisée comme support de distribution et avec une petite quantité de silicate pour éviter les agglomérats.

La proportion de ces mélanges a varié en fonction du test :

- rucher EBCL : 0,38 g de spores, 10 g d'Entostat et 0,05 g de silicate ;
- rucher ADAPRO-LR : 1 g de spores, 9 g d'Entostat et 0,05 g de silicate ;



Début de la sporulation de *B. bassiana* sur *V. destructor*

Préparation des nymphes





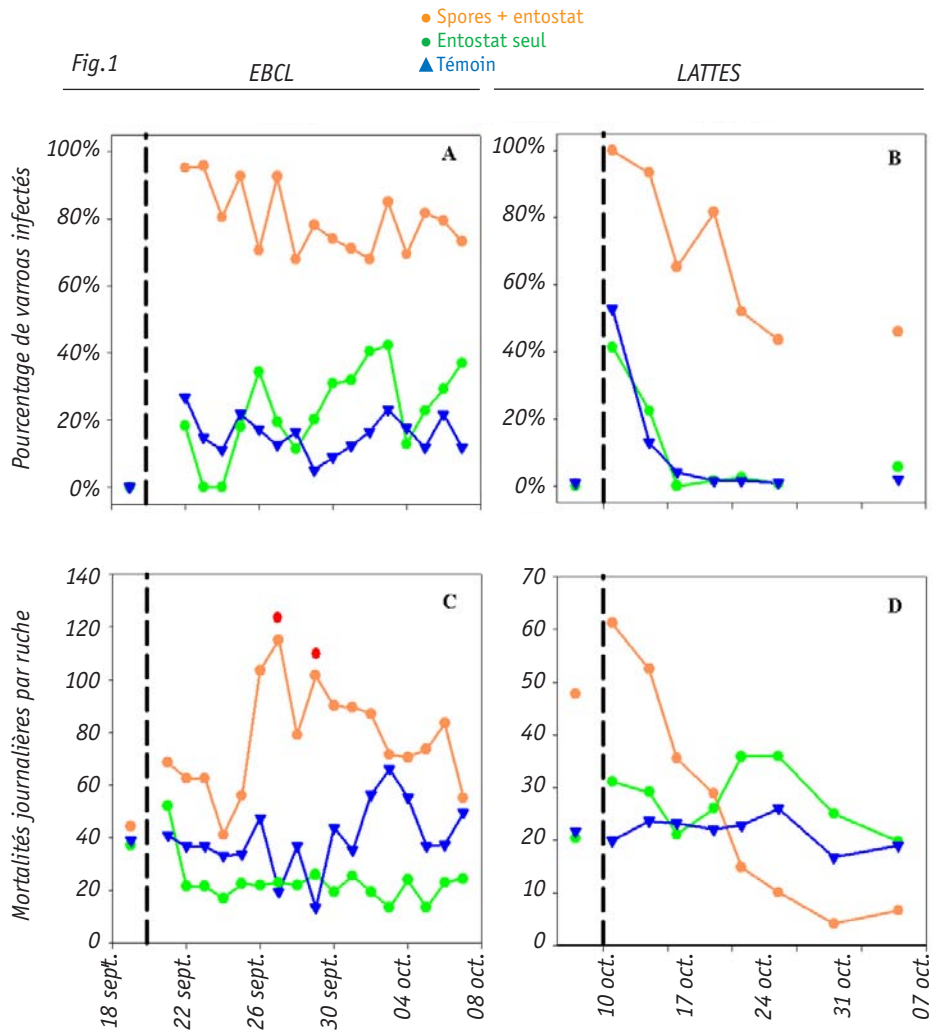
Dans les deux essais, les colonies ont été réparties en deux lots :

- un lot traité avec une application unique du mélange contenant des spores entre les cadres occupés par les abeilles : 2 ruches EBCL et 4 ruches ADAPRO ;
 - un lot témoin saupoudré de façon identique avec uniquement l'Entostat et le silicate : 2 ruches EBCL et 3 ruches ADAPRO ;
- A côté de ces deux lots, d'autres ruches ont servi de témoins.
- ruches sans aucun traitement (témoin sans saupoudrage) : 4 ruches EBCL et 4 ruches ADAPRO.

Mortalité des varroas

Un comptage des varroas a été réalisé dans les deux essais. Dans le rucher de l'EBCL, les langes ont été placés à partir du 14 septembre 2005 sous les 8 ruches. Ils ont été remplacés 2 jours après l'application afin de réduire les risques de contamination dus à la présence de poudre sur le linge. Durant les 17 jours suivants, les langes ont été renouvelés chaque jour. Par la suite, les langes n'ont plus été renouvelés que deux fois par semaine. Lors du retrait des langes, les varroas étaient systématiquement dénombrés et placés dans un milieu de culture (jusqu'à 40) pour vérifier après 15 jours la sporulation des champignons. Dans le rucher de l'ADAPRO-LR, Les langes ont été placés une semaine avant le début du traitement (le 3 octobre 2005). Ils ont été changés juste avant le traitement. De nouveaux langes ont été placés juste après traitement (10 octobre 2005) et ont été renouvelés tous les 3 à 4 jours pendant les trois premières semaines et encore chaque semaine pendant les deux suivantes. Ici aussi, les varroas étaient dénombrés et placés dans un milieu de culture.

Fig.1 Proportion moyenne des acariens infectés et chute journalière moyenne pour des ruches traitées avec des spores de *B. Bassiana* et de la poudre électrostatique (Entostat) (ligne orange), de la poudre électrostatique seule (ligne verte) ou rien (ligne bleue). A - Pourcentage d'acariens infectés sur le site EBCL ; B - Pourcentage d'acariens infectés sur le site de Lattes ; C - Chute de varroas sur le site EBCL ; D - Chute de varroas sur le site de Lattes. Les points surmontés d'un point rouge indiquent que les colonies traitées étaient significativement différentes, tant pour le traitement avec la poudre seule que pour le témoin. La ligne hachurée noire indique la date du traitement.



graphes : de Meikle et al. (2007)



Les différences observées au niveau des chutes de varroas les deux premiers jours ne sont pas liées au champignon mais plutôt à l'effet du saupoudrage. Pour le rucher de l'EBCL, les chutes de varroas sont plus importantes 6 et 8 jours après le traitement dans les ruches traitées, ce qui correspond au moment d'efficacité maximum attendu. Ce phénomène n'est pas observé dans les ruches test ADAPRO.

L'analyse des varroas tombés sur le linge montre que l'infection par le champignon est très répandue chez les acariens provenant des ruches traitées et que l'infection des ruches non traitées à également augmenté dans une moindre mesure par rapport au niveau d'infection avant expérimentation. La proportion des acariens infectés est plus importante dans les ruches traitées que dans les ruches témoins.

Application des spores de *B. bassiana* sur les abeilles



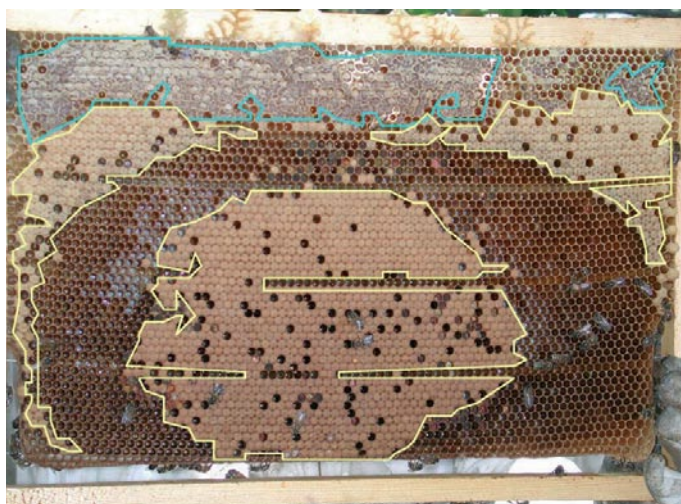
Lors du test avec les ruches de l'EBCL, un suivi des spores sur abeilles a été réalisé. La quantification du nombre de spores présentes sur des abeilles vivantes prélevées aux jours n-1, n+3, n+8, n+16 et n+14 (25 à 30 abeilles de chaque colonie) a mis en évidence une différence significative entre les colonies traitées ($1,1 \times 10^4$ CFU (Colonies Formant Unité) par abeille) et les autres. Vingt-quatre jours après traitement, le niveau était similaire à celui observé avant le test.

Une série de mesures complémentaires ont été réalisées lors de l'essai de l'EBCL pour mettre en évidence des effets :

- suivi du poids continu par balance électronique (capacité de 100 kg \pm 30 g) sur 4 ruches (2 ruches traitées Bb05002 et 2 ruches témoins Entostat) ;
- toutes les deux semaines (début trois semaines avant le traitement), pesée avec une balance de précision (\pm 1g) et sans abeilles, des différents éléments des 4 ruches sur balance (hausses, cadres, corps). Ceci permet de calculer le poids de l'essaim (poids de la ruche - poids des éléments sans abeilles) ;

- photographie numérique de toutes les faces de cadres et estimation des surfaces de couvain avec un logiciel informatique (ArcView3.0.). La densité du couvain a été estimée à $0,72 \text{ g/cm}^2$. Cette valeur a été également utilisée pour le miel et le pollen en stock ;
- suivi de la température, de l'humidité relative et de la pluviométrie avec une station météo située dans le rucher.

Mesure des surfaces de couvain et des provisions avec la technique ArcView sur les ruches de EBCL



ESSAIS DE TERRAIN 2006

L'objectif de ces nouveaux essais était de vérifier l'impact du traitement avec le champignon entomopathogène sur le comportement de la ruche et plus particulièrement sur la dynamique de population des abeilles, le développement du couvain et l'aptitude à produire du miel. Une comparaison de la poudre utilisée comme support de distribution (adjuvant) a également été réalisée.

L'expérimentation a été menée du 23 mai au 27 juin 2006 sur 22 colonies en ruches Dadant 10 cadres, équipées pour le contrôle des varroas et appartenant à l'ADAPRO-LR. Les ruches ont été séparées aléatoirement en trois lots + un groupe témoin de 8 colonies.

- Le premier lot est composé de 5 colonies traitées comme lors des expériences de 2005 avec un mélange homogène de 1 g de spores de Bb05002, de 9 g de poudre Entostat® et de 0,05 g de silicate.
- Le second lot de 5 colonies a eu un traitement qui diffère du premier uniquement par l'adjuvant qui est ici de la farine dans les mêmes proportions que l'Entostat®.
- Le troisième lot de 4 colonies n'a été saupoudré que d'un mélange homogène de 9 g de farine et de 0,05 g de silicate.

Un suivi hebdomadaire des poids (ruche et éléments séparés comme en 2005) a montré que l'ensemble des lots a gagné du poids et toutes les ruches ont produit du miel dans les hausses. Le traitement n'a, a priori, pas affecté la capacité à produire des colonies.



BIBLIOGRAPHIE

1. MEIKLE W. G., MERCADIER G., GIROD V., DEROUANÉ F. and JONES W. A. (2006) Evaluation of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Deuteromycota : Hyphomycetes) strains isolated from varroa mites in southern France - J. Apic. Res., 45(3) : 219-220.

2. KANGA L. H. B., JAMES R. R. and BOUCIAS D. G. (2002) *Hirsutella thompsonii* and *Metarhizium anisopliae* as potential microbial control agents of *Varroa destructor*, a honey bee parasite - J. Invertebr. Pathol., 81 : 175-184.

KANGA L. H. B., JONES W. A. and GRACIA C. (2006) Efficacy of strips coated with *Metarhizium anisopliae* for control of *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) in honey bee colonies in Texas and Florida - Exp. appl. Acarol., 40 : 249-258.

3. MEIKLE W.G., MERCADIER G., HOLST N., NANSEN C. and GIROD V. (2006) Duration and spread of an entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* (Deuteromycota: Hyphomycetes), used to treat varroa mites (Acari : Varroidae) in honey bee (Hymenoptera : Apidae) hives - J. Econ. Entomol., 100 : 1-10.

4. GIROD V., MERCADIER G. et MEIKLE W. G. (2006) Du nouveau dans la lutte biologique contre *Varroa destructor* - Bulletin Technique Apicole 33 (4), 2006, 187-196.

5. EBCL & ADAPROLR
 • ADAPRO LR - CRALR
 Maison des Agriculteurs
 Mas de Saporta -CS 30012
 34875 Lattes Cedex
 Email : adaprolr@free.fr
 • USDA-ARS-EBCL
 Campus International de Baillarguet
 CS 90013 Montferrier-sur-Lez
 34988 St. Gely du Fesc
 Email : wmeikle@ars-ebcl.org

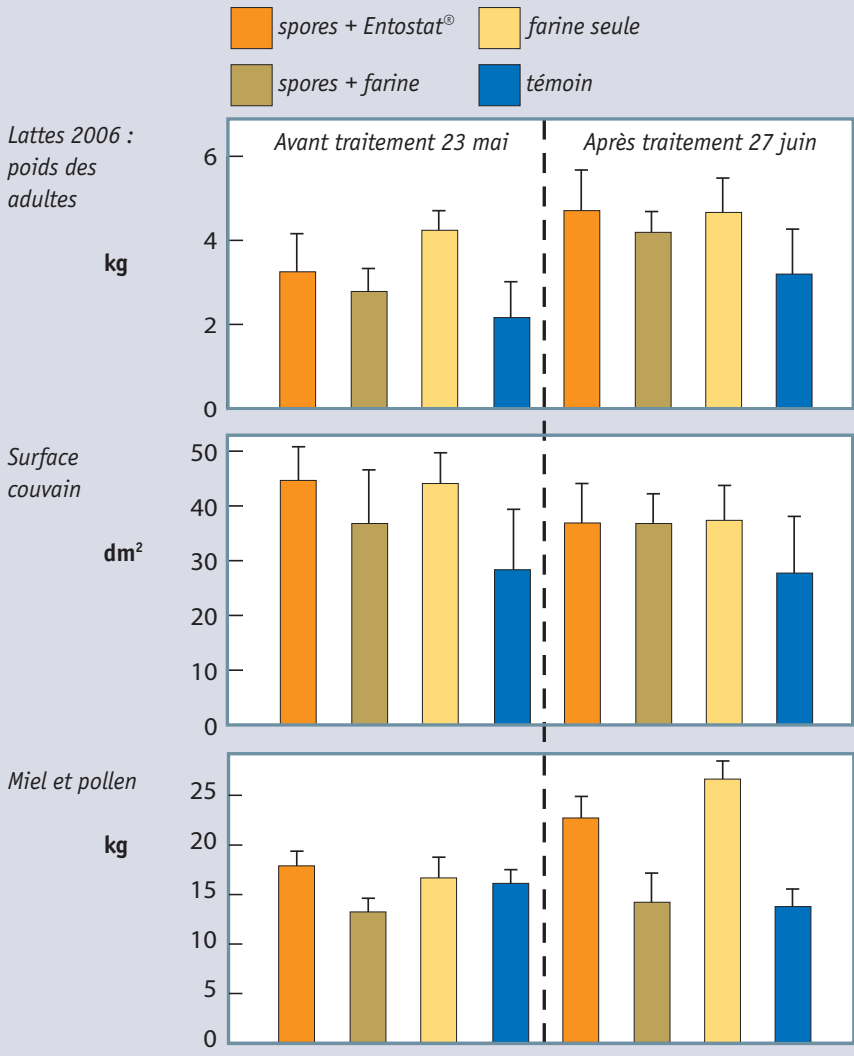
Photographies : Guy Mercadier & Vincent Girod
 Graphes : William Meikle

Le comptage bihebdomadaire des varroas sur langes et le prélèvement aléatoire de 40 d'entre eux pour vérifier l'origine de leur mort ont permis d'obtenir les informations suivantes :

- comme on pouvait s'y attendre, en moyenne, on retrouve le plus grand nombre de varroas tués par les spores dans les lots traités ;
- la proportion de varroas infectés par les spores diminue rapidement au-delà de 5 jours (probablement lié à l'augmentation de la température extérieure) ;

- statistiquement, le cumul des chutes de varroas par ruche a été significativement plus important avec le lot traité avec les spores et l'Entostat® comme adjuvant par rapport aux autres lots.

Les premiers résultats du suivi photographique réalisé comme en 2005 montrent qu'il n'y a pas eu d'impact du traitement entre le lot témoin et le lot traité « spores + Entostat® » sur le volume de couvain, ni sur les provisions de miel et de pollen, ni sur la population d'abeilles.



CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Des souches de champignons entomopathogènes virulentes contre le varroa sont naturellement présentes dans certaines ruches. Dans notre recherche, la seule espèce trouvée est *Beauveria bassiana*.

Dans le cadre des essais menés à ce jour, un traitement avec les spores de ce champignon :

- cause une augmentation significative des fréquences d'infections parmi les varroas ;
- n'a eu aucun effet détectable négatif sur le gain de poids de la ruche, sur la masse du couvain ou des abeilles adultes.

Sur base de ces premiers résultats, l'objectif pour 2007 est de vérifier les effets d'un double traitement (le second traitement sera probablement réalisé au moment où la densité de spores par abeille a décliné) en se basant sur les critères déjà utilisés. Une évaluation de l'efficacité d'un tel traitement sera effectuée afin de pouvoir la comparer à d'autres moyens de lutte.