

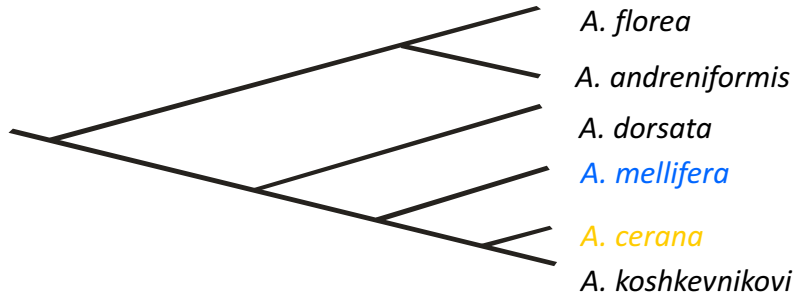
Opportunités de la résistance naturelle au varroa comme alternative aux traitements chimiques



Plan de l'intervention

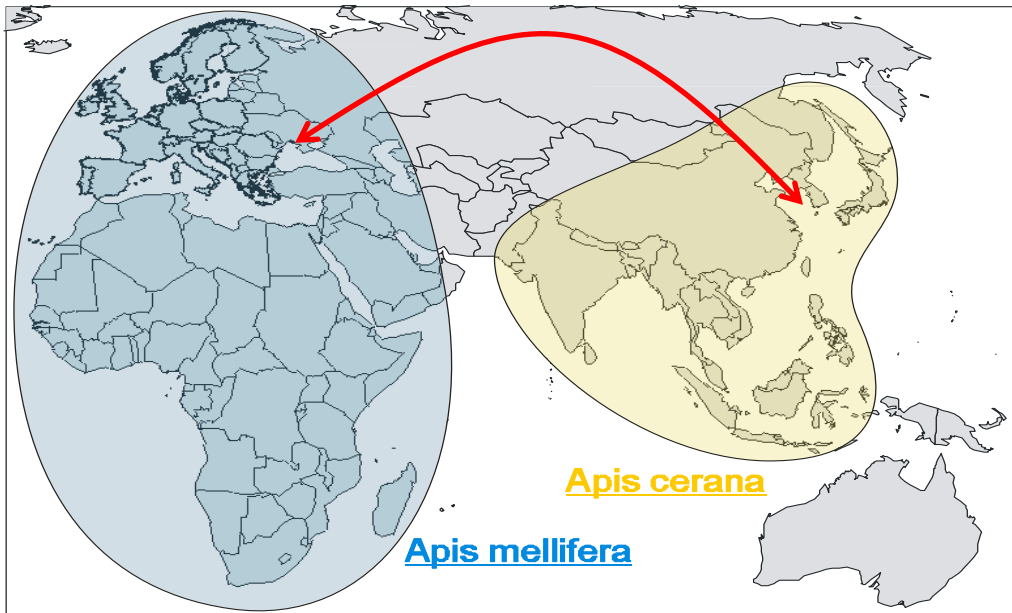
- **Éléments de biologie du varroa**
- **Définition des mécanismes de résistance/tolérance au varroa**
- **Historique de la recherche sur la résistance au varroa**
- **Programmes de sélection en cours dans le monde**
- **Développement d'outils d'aide à la sélection**

Origine du varroa : l'abeille asiatique



Phylogénie du genre *Apis*

(Alexander, *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 1991)

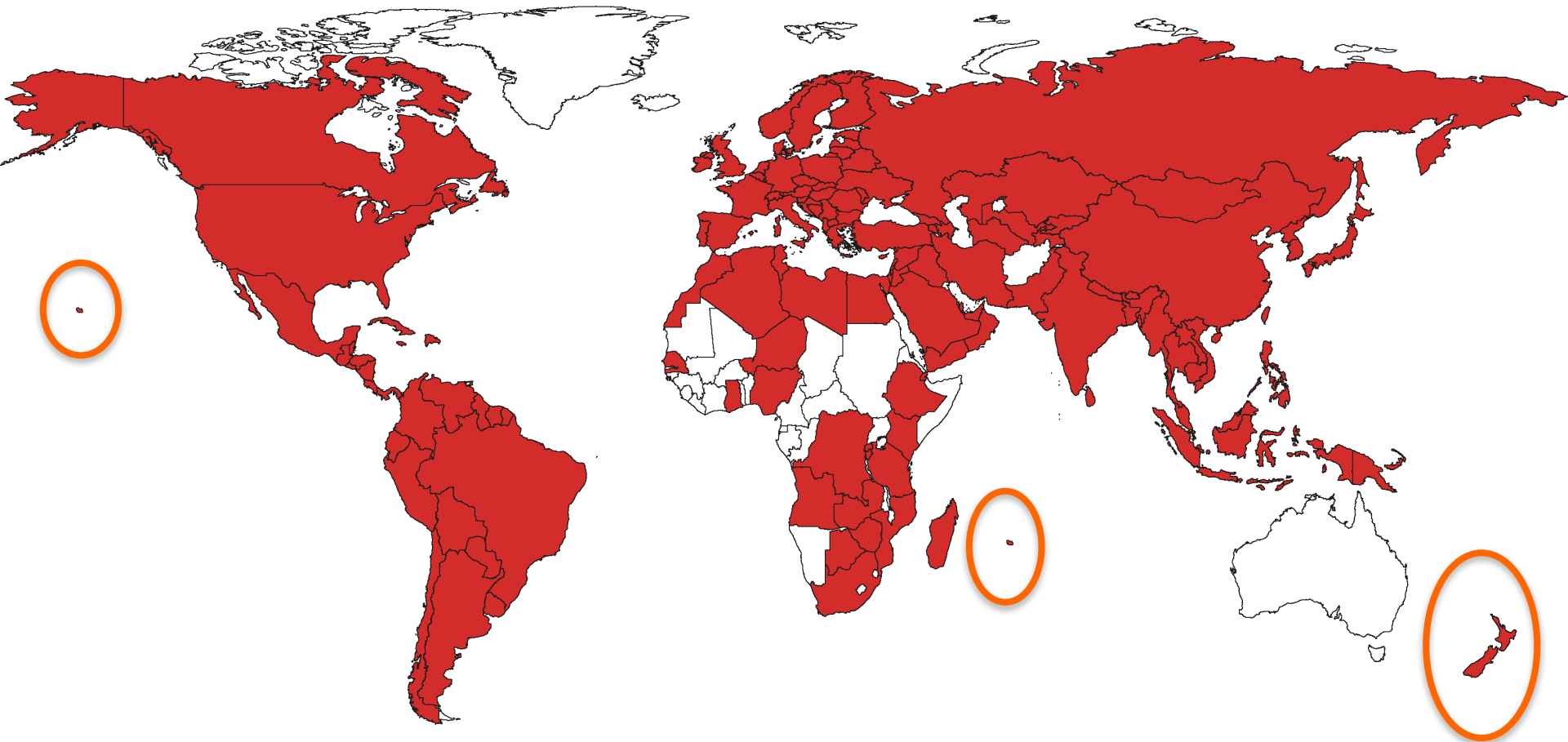


(Franck, PhD thesis, 1999)

→ Arrivée du varroa en Europe dans les années 80

D'une relation hôte/parasite équilibrée, à une relation déséquilibrée

Répartition mondiale du varroa



Carte de la distribution du varroa en 2015

Une pathologie étroitement liée aux virus

○ Varroa en tant que vecteur de virus

- Transfers directs
- Transfer indirect par immunosuppression?

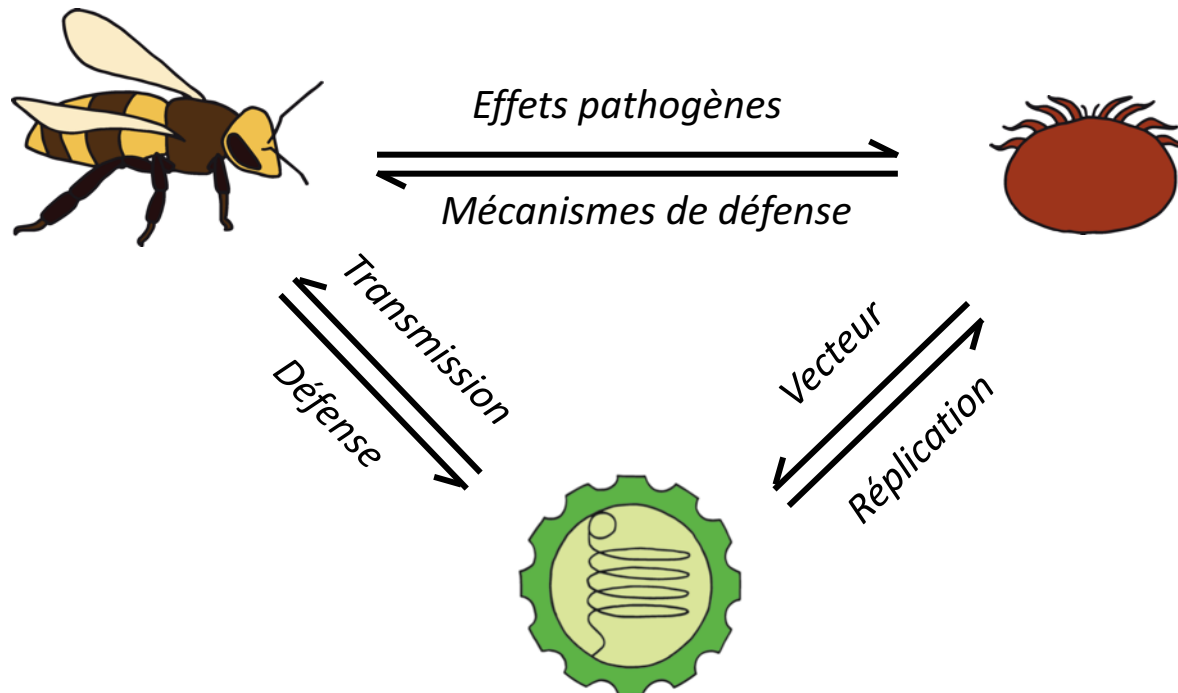
(Gisder et al. 2009; Chen and Siede 2007)

(Kuster et al. 2014; Yang and Cox-Foster 2005; Gregory et al. 2005)

- Viruses associés au varroa :

DWV, IAPV, ABPV, KBV, BQCV, SBV, CBPV

(Sammataro et al. 2012; de Miranda et al. 2012)



D'une relation hôte-parasite bilatérale à une relation triangulaire

Une relation complexe avec l'abeille européenne

New insights on how bees battle deadly varroa mite

June 14, 2016

Home » Publications » Newsletters » Discovery » Discovery Issue 28 » Slowing varroa's deadly march
SLOWING VARROA'S DEADLY MARCH



Varroa Mite

Varroa destructor

Ministry for Primary Industries
Manatū Ahu Matua



Varroa mites and honey bee health: can Varroa explain part of the colony losses?*
Yves LE CONTE¹, Mari **Articles**

The varroa mite's deadly impact on honey b

Apidologie 35 (2004) 91–92
© INRA/DIB-AGIB/ EDP Sciences, 2004
DOI: 10.1051/apido:2003060

The Varroa mite –
a deadly and dangerous bee parasite

Impact of an ectoparasite on the immunity and pathology of an invertebrate: Evidence for host immunosuppression and viral amplification

Xiaolong Yang and Diana L. Cox-Foster*

Department of Entomology, Pennsylvania State University, University Park, PA 16802

Edited by May R. Berenbaum, University of Illinois at Urbana-Champaign, Urbana, IL, and approved April 14, 2005 (received for review March 7, 2005)

JULIE S. PETTIS

Scientific note on Varroa destructor resistance to coumaphos in the United States

Scientific note

Trombinoscope de la famille varroa (1/2)

- **Dimorphisme sexuel**

→ Différents types d'individus au sein d'une colonie



Femelle fondatrice (1.6mm)



Jeune femelle



Oeuf



Male



Protonympe



Deutonympe

Descendance

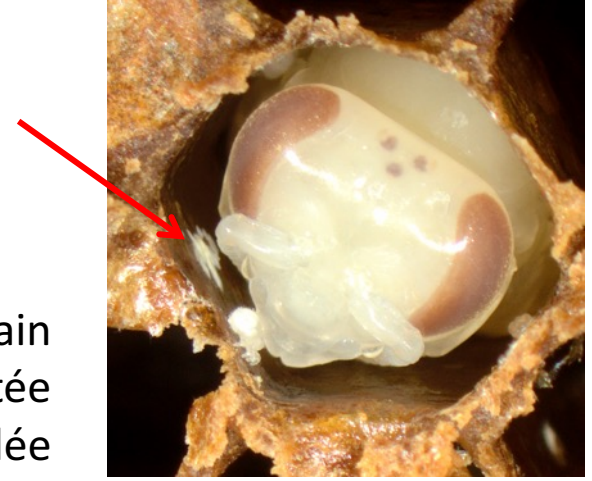
Trombinoscope de la famille varroa (2/2)



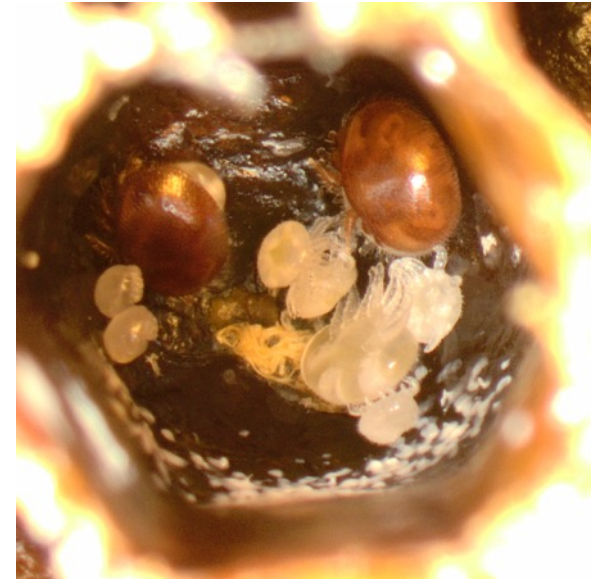
Femelles varroa sur abeille adulte



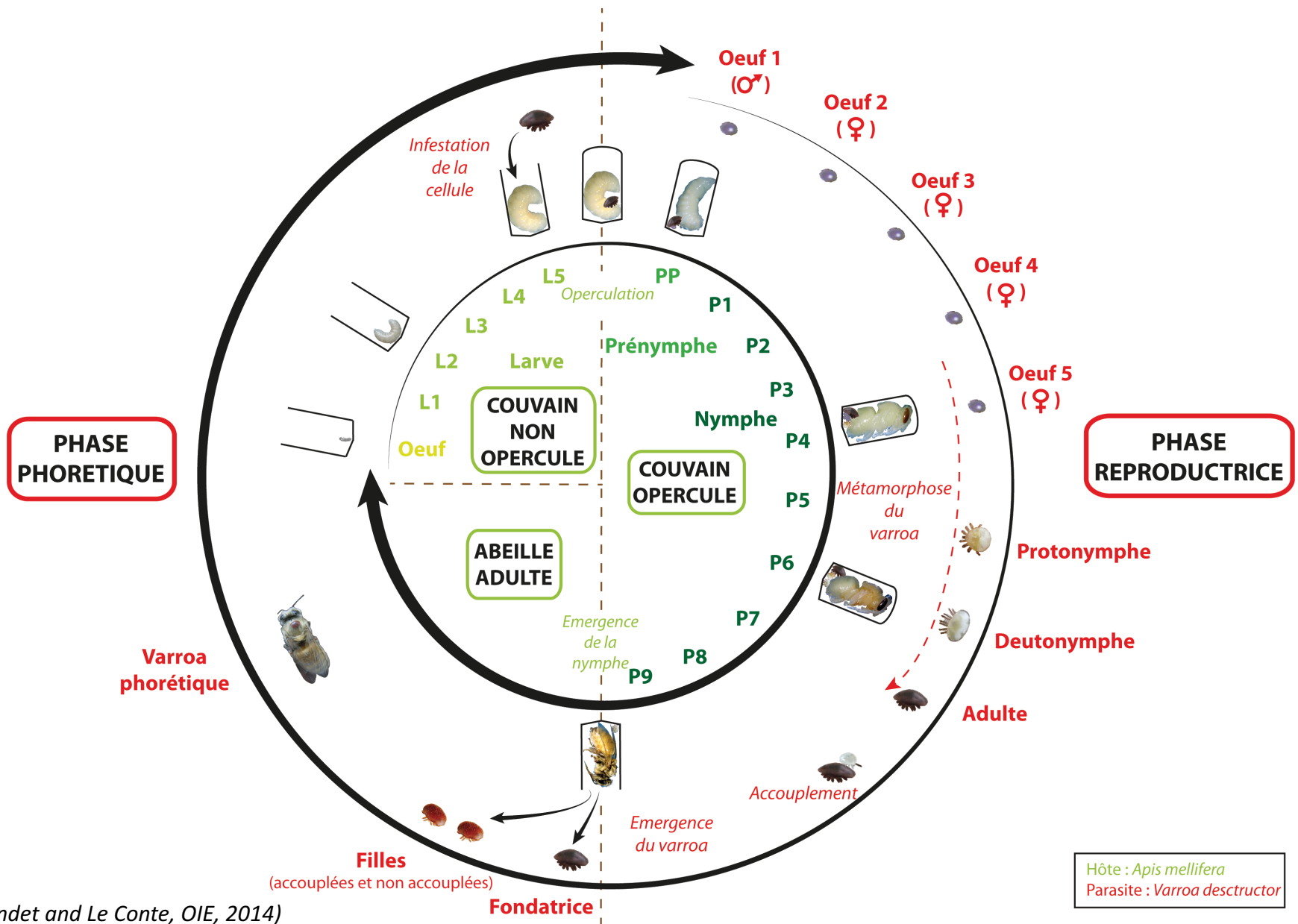
Femelles et immatures de varroa dans une cellule de couvain vidée



Cellule de couvain parasitée désoperculée



Cycle de reproduction du varroa (1/2)



(Mondet and Le Conte, OIE, 2014)

Cycle de reproduction du varroa (2/2)

○ Reproduction dans le couvain

→ Dynamique de population du varroa dépend de la dynamique de population de la colonie, plus particulièrement de la dynamique de population du couvain

→ Rupture de ponte en hiver : Rupture dans la dynamique de population varroa
varroa peut survivre 80-100j sans couvain
≈ 10% de la population meurt par mois (sans couvain)

○ **Taux de reproduction** : ≈ 1.3 - 1.5 femelle mature / femelle fondatrice
(2.5 dans couvain mâle – cf cycle plus long)

→ **Croissance “exponentielle” de la population de varroa**



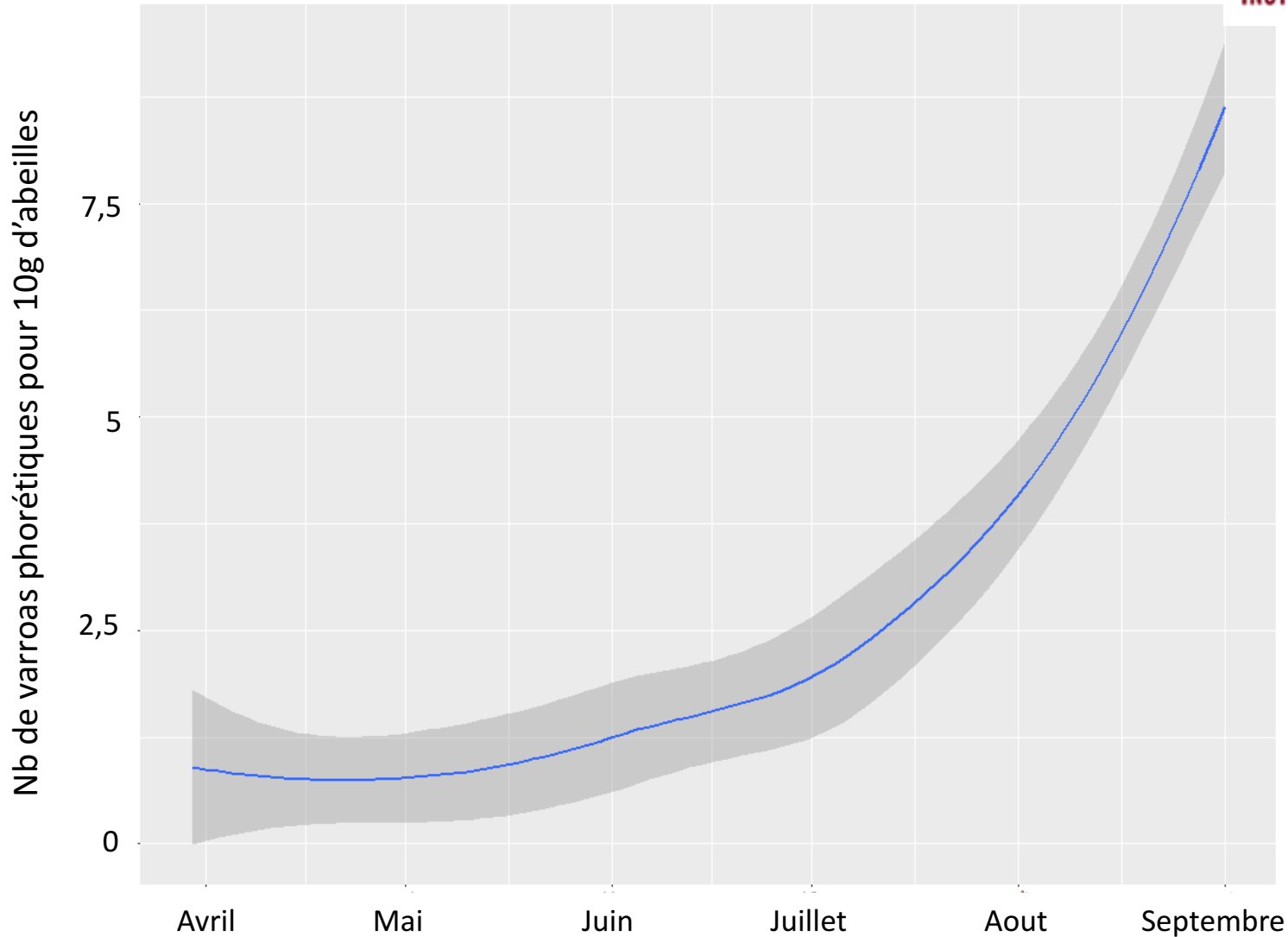
5 cycles de reproduction plus tard
(1 varroa, taux de reproduction = 2)



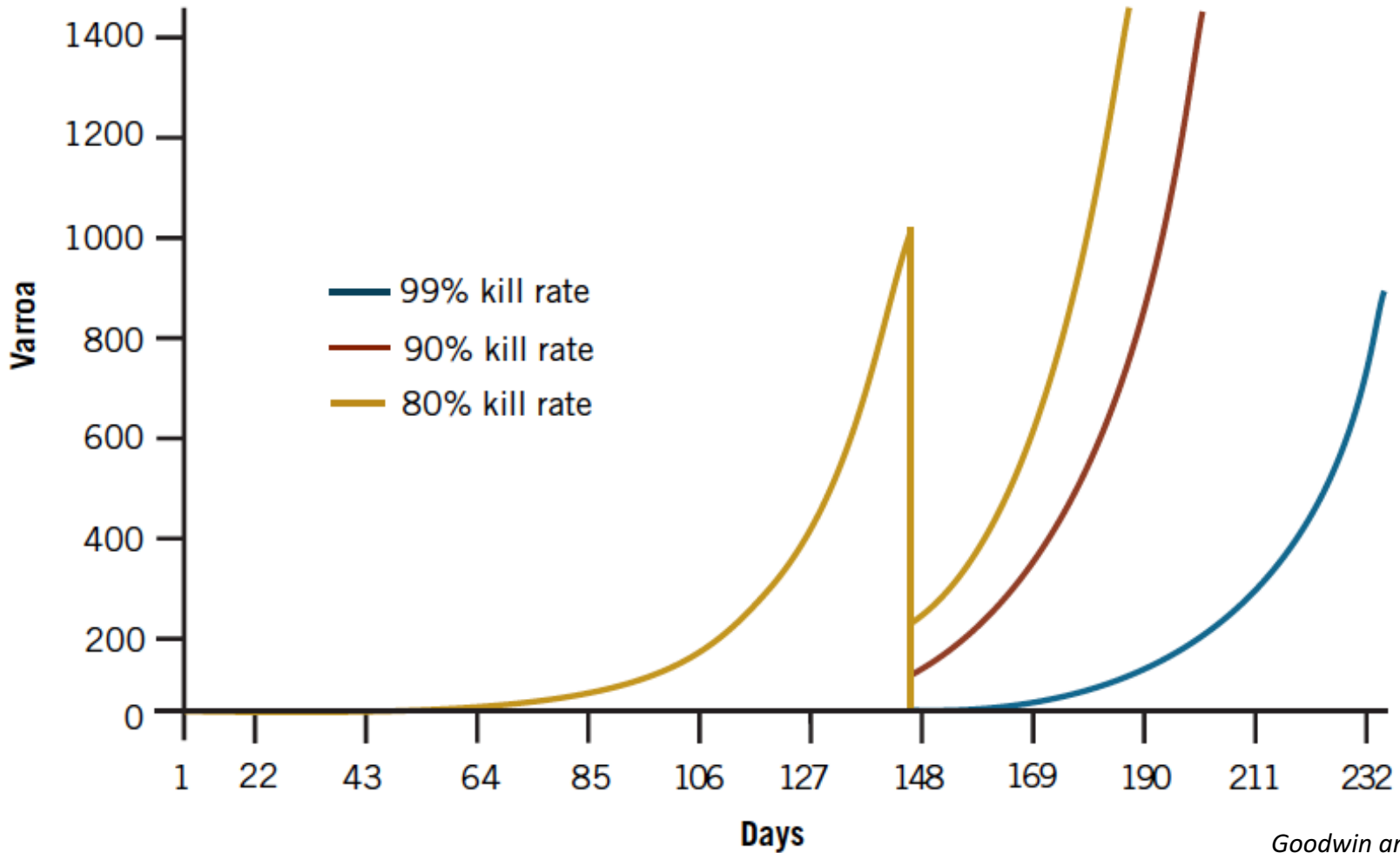
32 varroas !!

Croissance exponentielle du varroa

○ Suivi de varroa sur la station ITSAP 2015 (n = 90 colonies)



Efficacité des traitements (1/2)

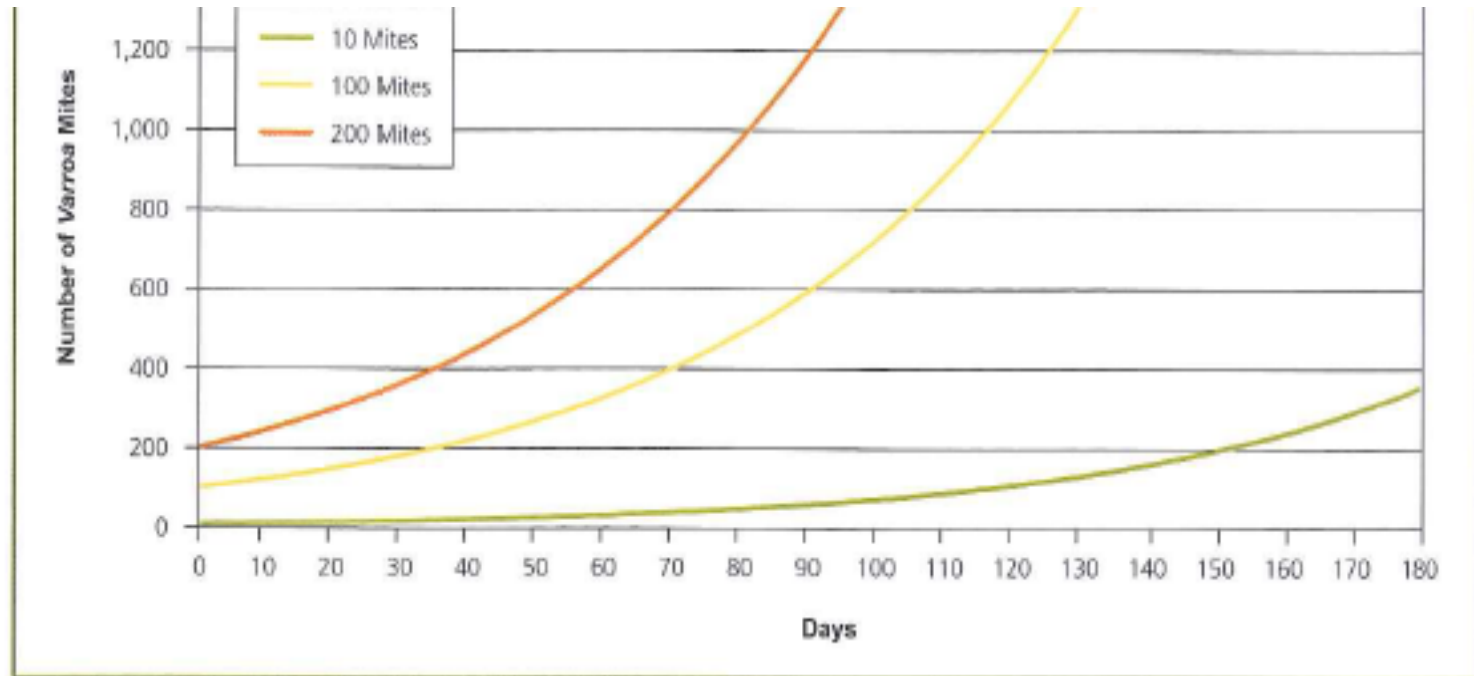


Goodwin and Taylor 2007

Effets seuils importants pour expliquer l'effet de varroa sur les colonies

Efficacité des traitements (2/2)

- **Varroa en début de saison et croissance de population**



Croissance théorique en fonction du nombre de varroa en début de saison

Aperçu des traitements autorisés

- **8 molécules avec AMM en 2016**

- **Médicaments “conventionnels”**

- Apistan® (tau-fluvalinate)
- Apivar® (Amitraze)
- Apitraze® (Amitraze)



- **Médicaments en “bio”**

- Thymovar®
- Apilifevar®
- Apiguard®
- MAQS® (acide formique)
- Apibioxal® (acide oxalique)

Vers de nouvelles stratégies de lutte

○ Limites / échec des stratégies de lutte contre le *Varroa*

- Efficacité *(Rosenkranz et al. 2010; Rademacher et al. 2006)*
- Effets non désirables *(Mondet et al. 2011; Johnson et al. 2009; Chauzat et al. 2009)*
- Résistance *(Nazzi et al. 2010; Pettis et al. 2004; Milani et al. 1999)*



Besoin de développer de nouvelles solutions contre le *Varroa*

○ But = réduire la dépendance aux traitements chimiques (cibler des étapes clés du mécanisme de parasitisme)

○ Stratégie à long-terme

- Certaines colonies survivent au *Varroa* *(Le Conte et al. 2007; Fries et al. 2003)*
- Sélection naturelle / programmes de sélection *(Buchler et al. 2010; Harbo and Harris 1999)*
- VSH/SMR = contribue à la capacité de survie *(Harris et al. 2010; Harbo and Harris 2005)*

○ Difficulté principale = **complexité du phénotypage de VSH/SMR** *(Villa et al. 2009)*

Les pressions naturelles de sélection sont supprimées par nos pratiques d'apiculture



L'existence des traitements est un obstacle pour l'apparition naturelle de la tolérance/résistance

Les abeilles survivantes, solution miracle ?

○ Définition de la tolérance/résistance

“Capacité de colonies d’abeilles parasitées par le varroa à survivre pendant plusieurs années, en l’absence de traitement anti-varroa”

(Mondet and Le Conte, OIE, 2014)

○ Potentiellement, une solution durable

○ Démonstration localement dans différentes populations

- Abeilles africanisées

(Boecking et al. 1993 ; Rosekranz et al. 1999)

- Abeilles européennes

(Le conte et al. 2007 ; Fries et al. 2006 ; Seeley et al. 2007)

○ Plusieurs programmes de sélection (critères)

- US

(Harris 2003 ; Harbo 1999 ; Ibrahim and Spivak 2006)

- Allemagne

(Buchler et al., Apidologie, 2010)

- Pays-Bas

(Arista, unpublished)

- Nouvelle-Zélande

(BettaBees, unpublished)

- ...

Résistance par sélection naturelle

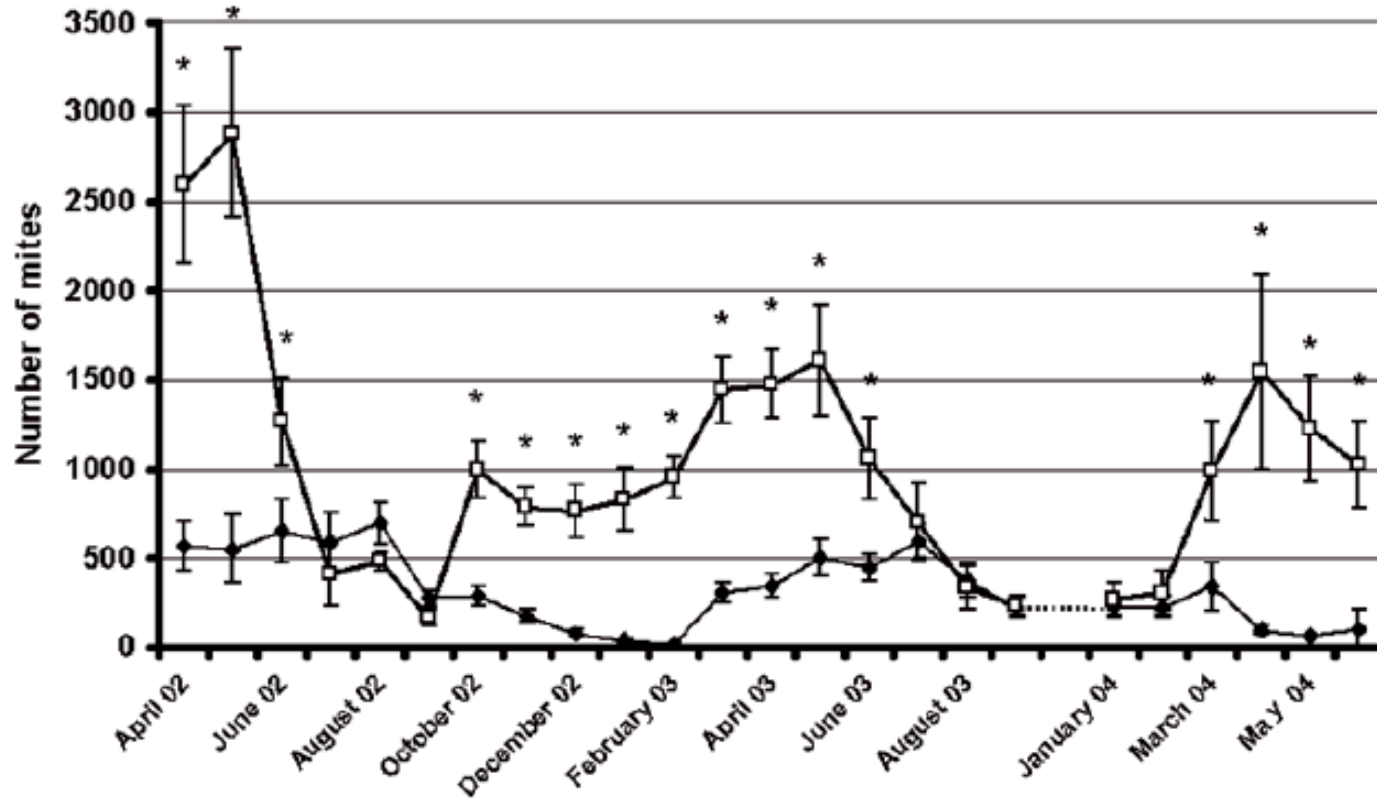


Figure 1. Number of mites collected per month on the bottom board (mean \pm S.E.) from April 2002 to June 2004. Mites were not counted between October 2003 and December 2003. \diamond represent mean number of mites in VSB ($n = 12$ colonies), \square represent control colonies ($n = 16$). (* Significant statistical differences, Mann-Whitney test, $P < 0.05$).

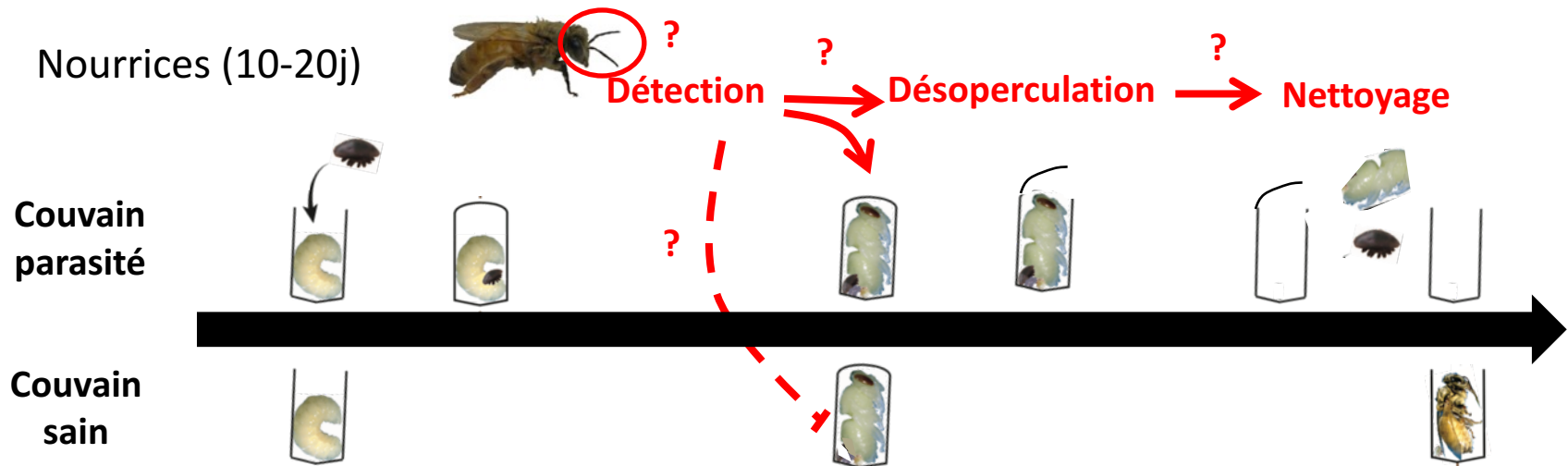
Survie et comportement hygiénique

○ Caractéristiques des abeilles survivantes

→ Limitent le développement de la population varroa (seuil ?)

→ Développent des réponses comportementales contre le varroa (Ricola, Persephone)

○ Abeilles survivantes : niveau élevé de comportement hygiénique varroa-spécifique (VSH : Varroa Sensitive Hygiene)



Mécanismes de résistance au varroa

- *Apis mellifera* peut développer des réponses comportementales au varroa

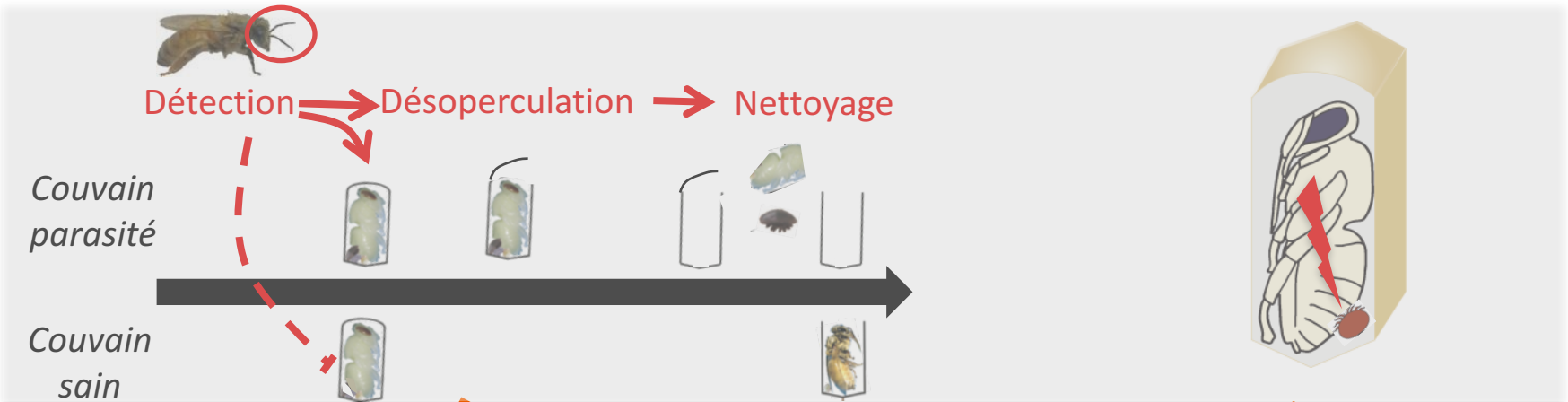
⇒ **Limitation de la croissance de la population varroa**

Action des abeilles adultes

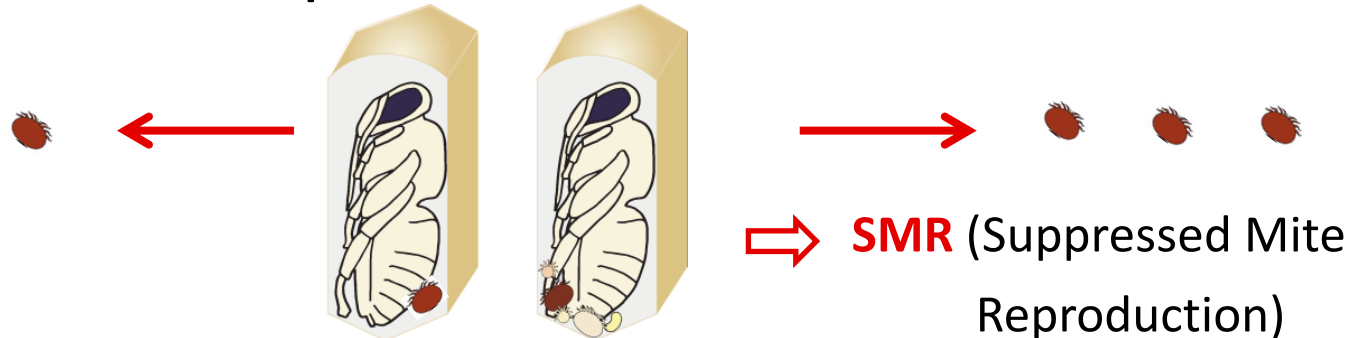
VSH (Varroa Sensitive Hygiene)

Action du couvain

Inhibition de la reproduction



Echec de reproduction des femelles varroa



Caractéristiques du comportement VSH

- **Nettoyage sélectif des cellules infestées par varroa**
- **Coïncide avec un faible taux de varroas reproducteurs**
- **Une forte expression de VSH confère une forte tolérance/résistance à varroa**
 - Potentiel de sélection selon ce critère



© F. Mondet



© F. Mondet

Etapas de nettoyage des cellules infestées

Chronologie de la recherche sur le VSH

- **1997** : Détection d'abeilles avec une faible croissance varroa
- **1999** : Découverte de la suppression de reproduction (SMR)
- **1999** : Découverte du caractère héréditaire du comportement
- **2001** : Démonstration de l'utilité en croisements
- **2005** : Identification du mécanisme = VSH
- **2007** : Débuts d'utilisation en apiculture
(commercialisation de reines aux USA)
- **2010+** : Début de la caractérisation moléculaire
(USA, Suède, Allemagne, Canada)

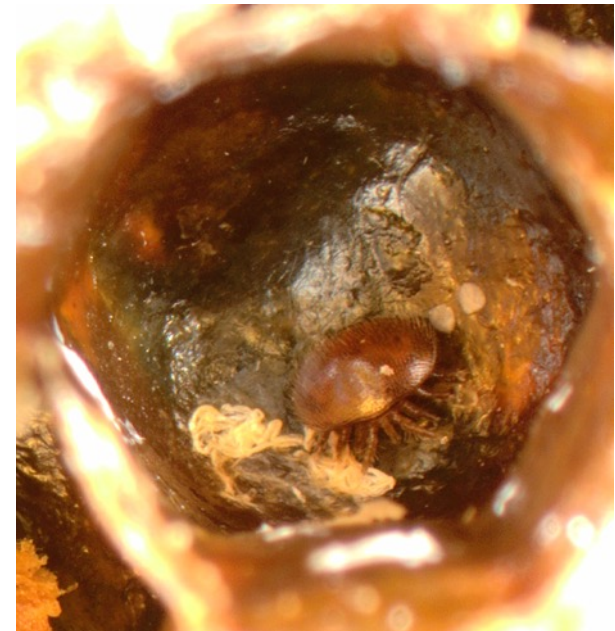
McAfee et al., Mol Cell Proteo, 2017

Spotter et al., J.Hered, 2016

Tsuruda et al., PLoS One, 2012

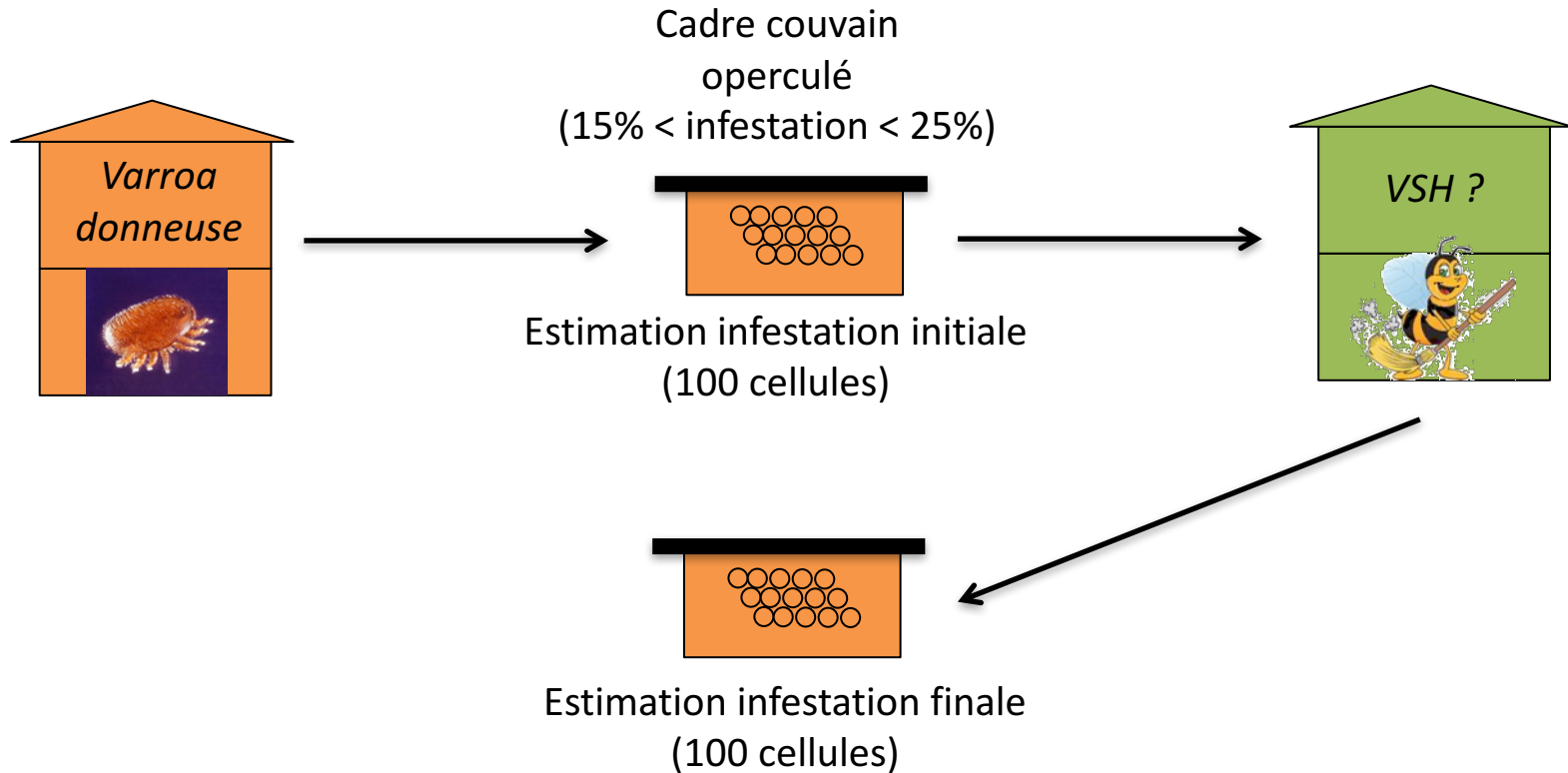
Behrens et al., Ecol&Evol, 2011

Femelle varroa non reproductrice



Test phénotypique des colonies

○ Réponse VSH à du couvain infesté par varroa



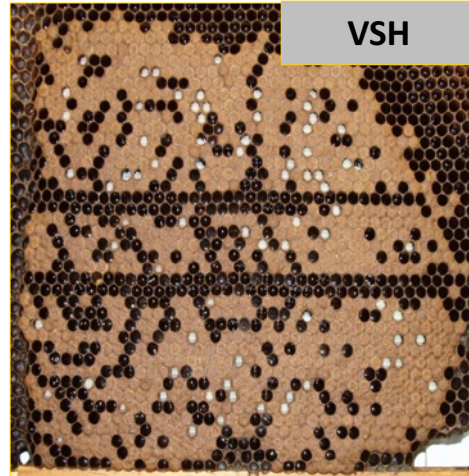
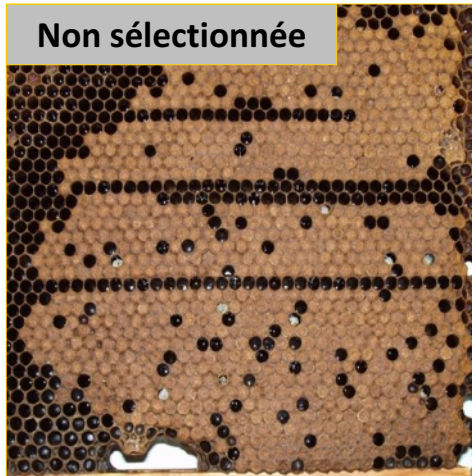
Degré VSH = Réduction de l'infestation
Nombre de cellules désoperculées

Villa et al. 2009

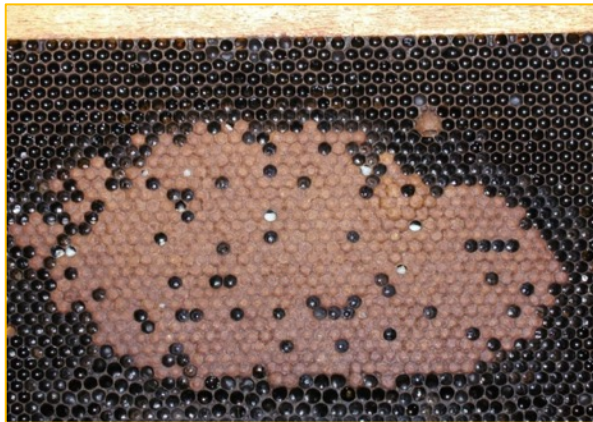
○ Test alternatif : ratio *Varroa* reproducteurs/non reproducteurs (SMR)

Test phénotypique des colonies

- Réponse à court/moyen terme à du couvain infesté par *Varroa*



Réponse à 4 heures



Réponse en une semaine

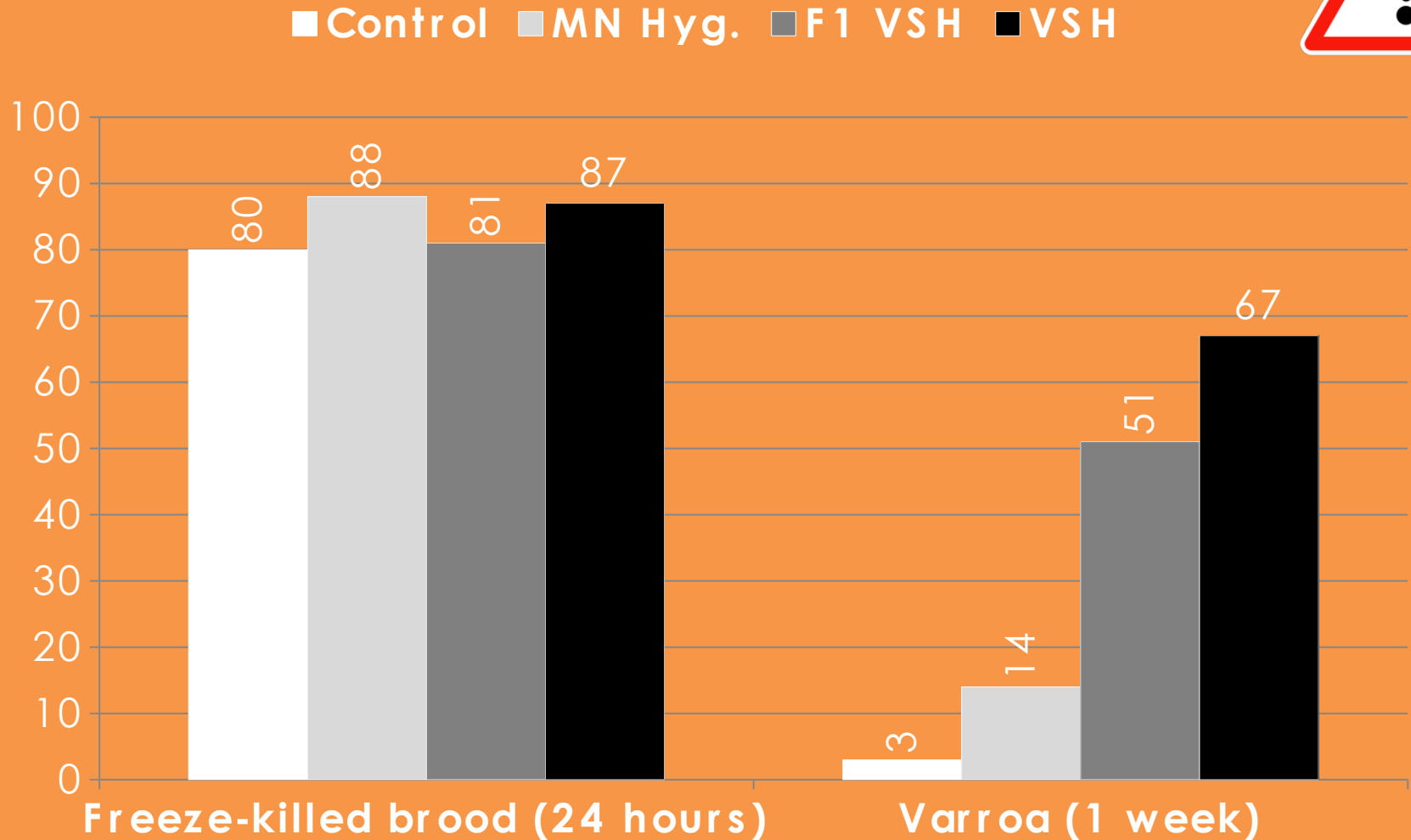
Enlèvement du couvain infesté :
> 60%

VSH et comportement hygiénique (1/2)

Test du couvain congelé



VSH et comportement hygiénique (2/2)



Avantages / inconvénients de la sélection VSH

○ Caractéristiques du VSH

- La survie au varroa diminue le besoin en traitement acaricide
- Caractère héréditaire

○ Inconvénients de la sélection VSH

- Difficile à mesurer (intérêt de la sélection assistée par marqueurs, autres méthodes)
- La plupart de la sélection s'est basée seulement sur la survie au varroa, pas en miel, hivernage etc...



Vers d'autres outils de mesure du VSH

Enjeux pour l'utilisation en sélection

- Intégration dans les schémas de sélection existants, pour :
 - Permettre la sélection en parallèle sur d'autres critères (production)
 - Garantir le maintien de la diversité existante des abeilles en France

- Rôle des organismes de recherche / développement :
 - Développer et diffuser des outils pour détecter le VSH/SMR dans les colonies
 - Détection de la capacité de résistance
 - Emettre des recommandations pour l'utilisation optimale du caractère (conditions d'expression, transmission à la descendance...)
 - Sélectionner une lignée d'abeille « super VSH »



Quelle est la spécificité des abeilles VSH ?

Éléments déclencheurs du VSH ?

○ Hypothèse principale = stimulus olfactif

→ Quelle est la signature des abeilles qui détectent le *Varroa* ?

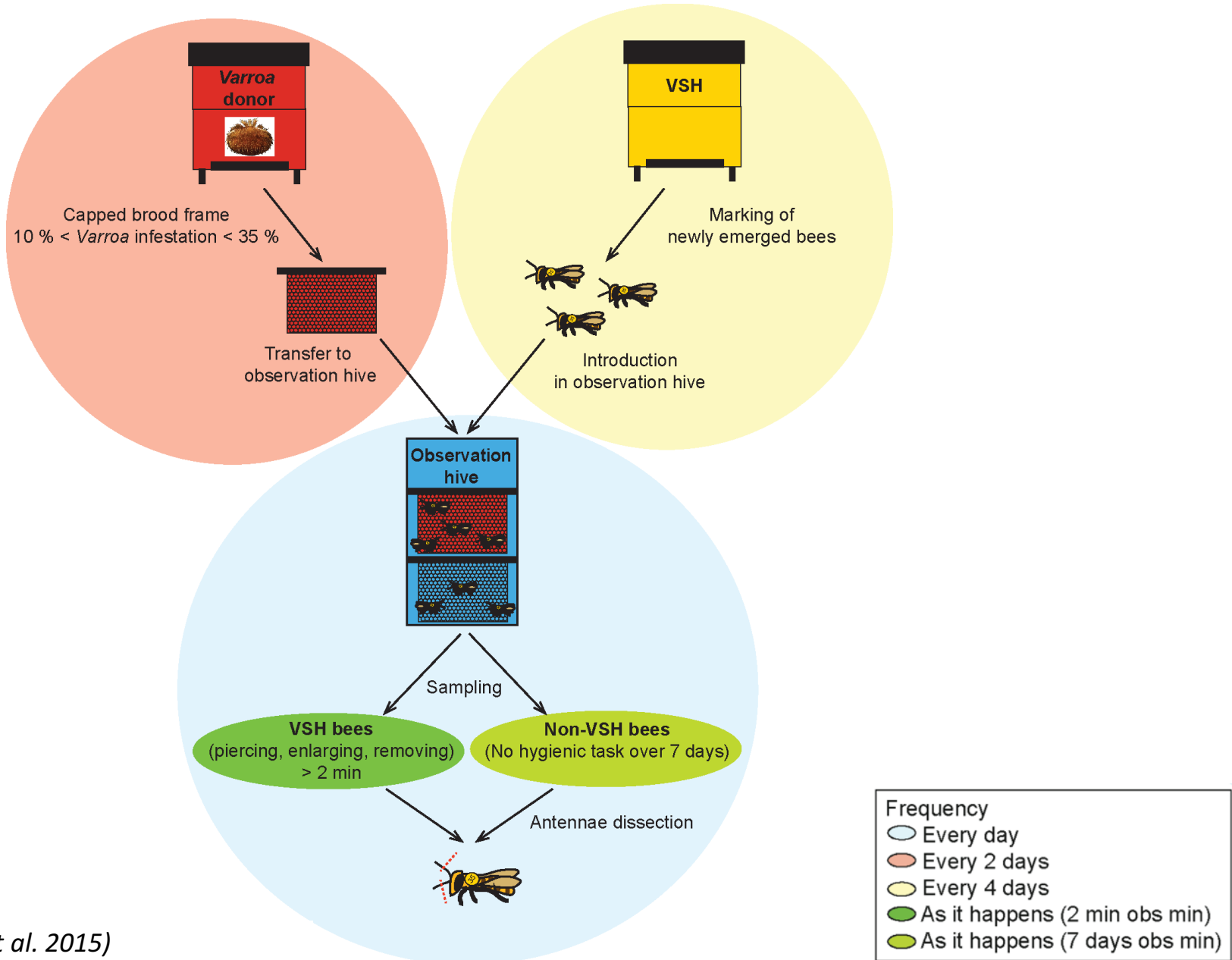
- Essai comportemental : abeilles hygiéniques/non hygiéniques
- Essai moléculaire : recherche de signature dans l'expression des gènes au niveau des antennes



→ Quelle est l'odeur qui est responsable de la détection ?

- Ecologie chimique : recherche de molécules ("l'odeur") par extraits d'alvéoles parasitées / saines
- Essai comportemental : test des molécules

Echantillonnage d'abeilles VSH



Signature transcriptomique d'abeilles VSH

General function	Number of genes	Proportion of the DEG	GO functions
Motor activity	(-) : 7	18.6 %	Motor activity, muscle microtubule activity, muscle assembly
	(+) : 24		
Neuronal processes	(-) : 5	18.0 %	Sensory perception (of smell and taste), neurotransmission, neuronal development and maturation, synaptic function
	(+) : 25		
General metabolism	(-) : 8	17.3 %	Redox metabolism, carbohydrate metabolism, fatty acid metabolism, lipid metabolism
	(+) : 21		
Transcription regulation	(-) : 11 (+) : 7	10.7 %	Transcription factors, nucleosome assembly
Oxidative phosphorylation	(-) : 5	10.2 %	Oxidative phosphorylation
	(+) : 12		
Structural	(-) : 3 (+) : 14	10.2 %	Chaperones, cell adhesion, structural proteins of membranes
Immunity	(-) : 4 (+) : 6	6.0 %	Antibacterial activity, immunity
Stress response	(-) : 7 (+) : 2	5.4 %	Stress response, apoptosis
Transport	(-) : 1 (+) : 3	2.4 %	Ion transport, carbohydrate transport




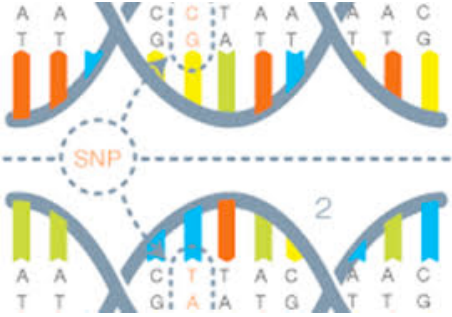


Trois principales familles fonctionnelles : activité motrice, processus neuronaux et olfaction, métabolisme

Vers la sélection assistée par marqueurs

○ Recherche de marqueurs moléculaires du VSH/SMR

- Objectif : trouver un outil pour évaluer le potentiel VSH/SMR des colonies
Problème : Pas de mesure disponible sur le terrain
- Caractère transmissible → déterminisme génétique

	Caractère recherché	Caractère mesuré	Outil de mesure
MIEL		Quantité de miel	
VARROA		VSH SMR	

Vers la sélection assistée par marqueurs

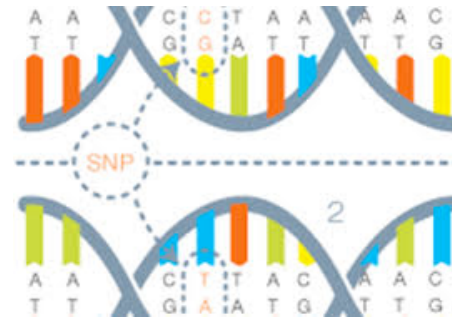
○ Etape 1 : Evaluation des colonies à partir de l'outil de mesure



Productrice



Peu productrice



Résistante

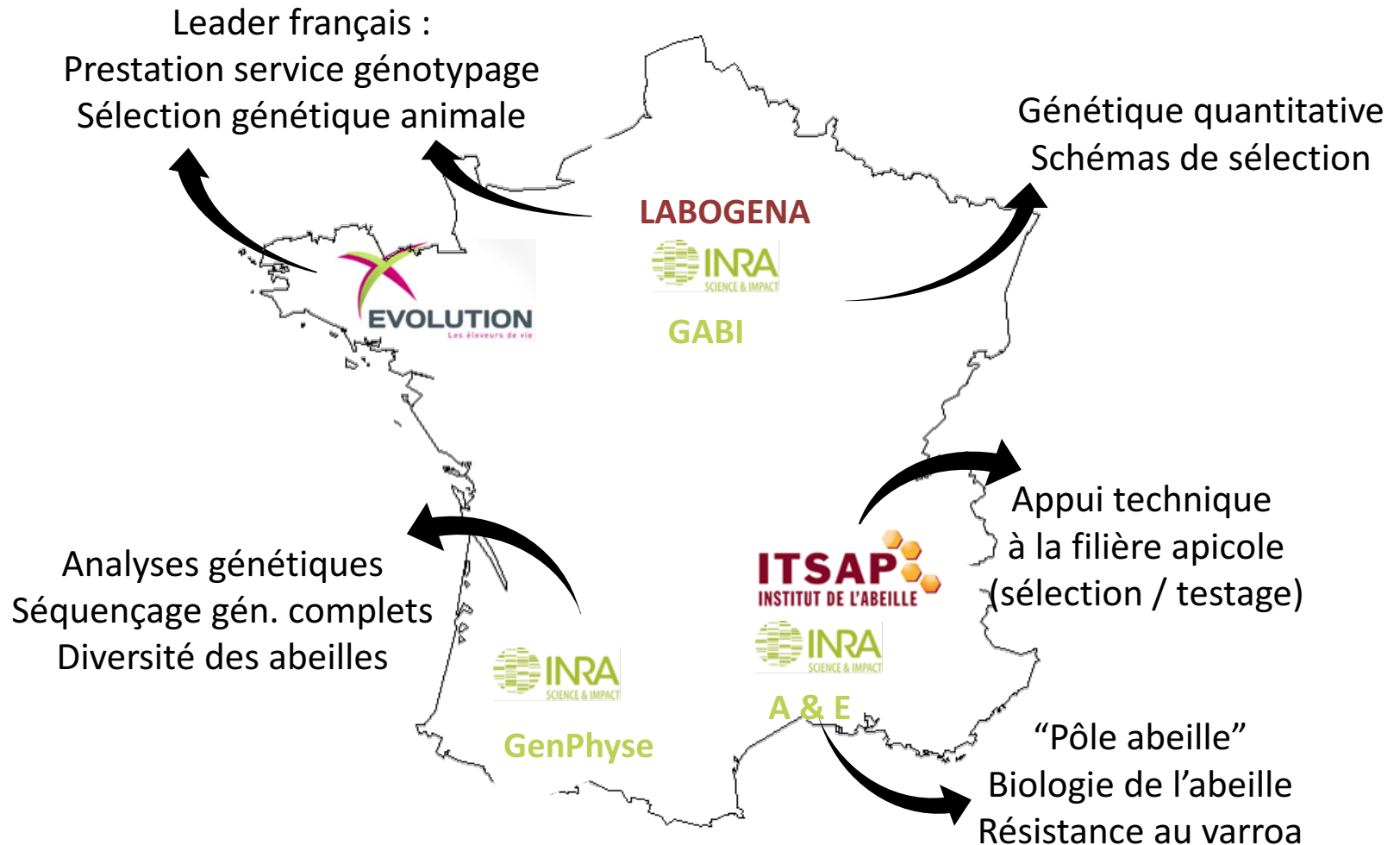
Sensible

○ Etape 2 : prise en compte dans les schémas de sélection par l'apiculteur

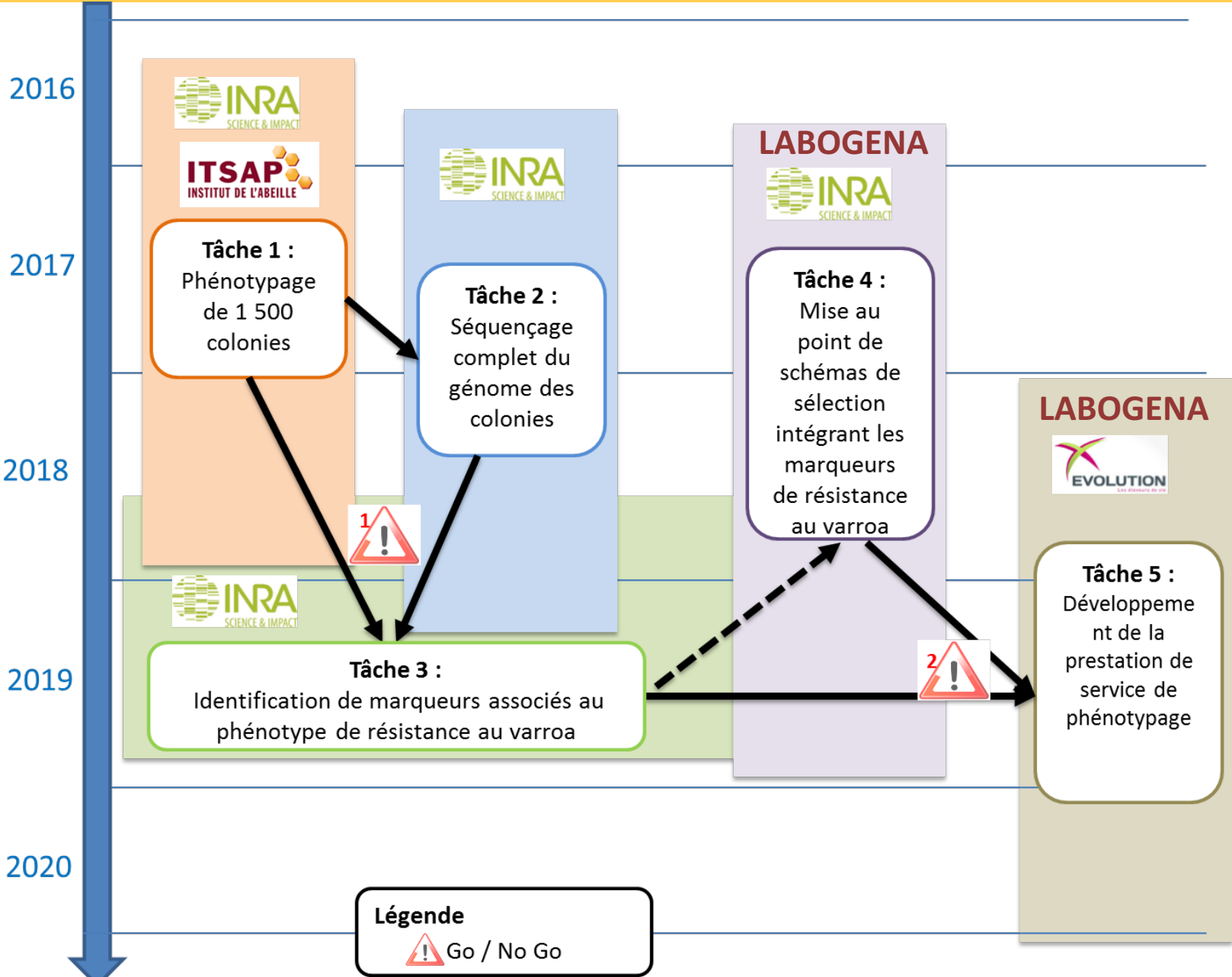
- Choix des colonies à reproduire, en fonction des différents critères retenus
- Choix des croisements (stations de fécondations...)

Le projet BeeStrong

- Objectif : **Développer une nouvelle méthode de phénotypage fiable, rapide, applicable aux populations en production, par développement de marqueurs moléculaires du caractère SMR**



Un projet d'ampleur inédite

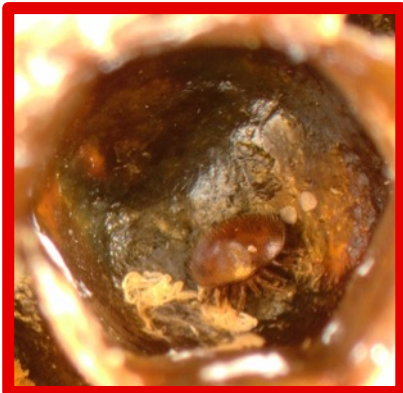


Phénotypage et échantillonnage

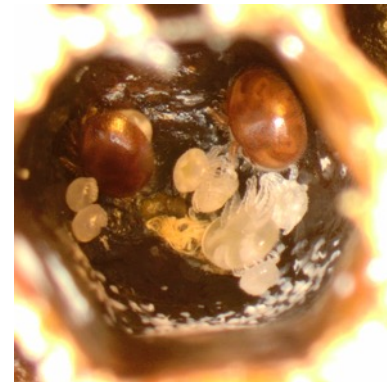
- En “fin de saison” : infestation en varroa du couvain > 5%
 - Evaluation de la colonie par ColEval[®]
 - Prélèvement d'un cadre de couvain operculé dans la colonie à évaluer pour SMR
 - Prélèvement d'abeilles adultes : charge en varroa phorétiques + analyse moléculaire
- Phénotypage du caractère SMR



Alvéole de couvain parasitée avec **varroa non-reproducteur**

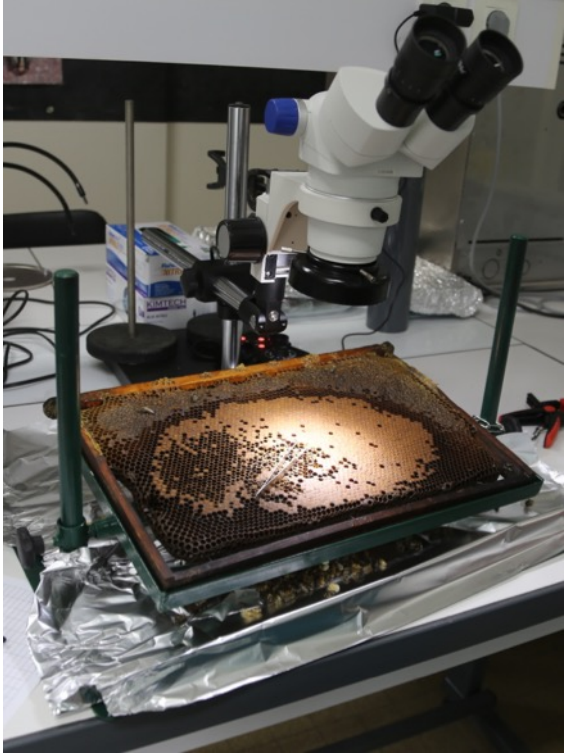
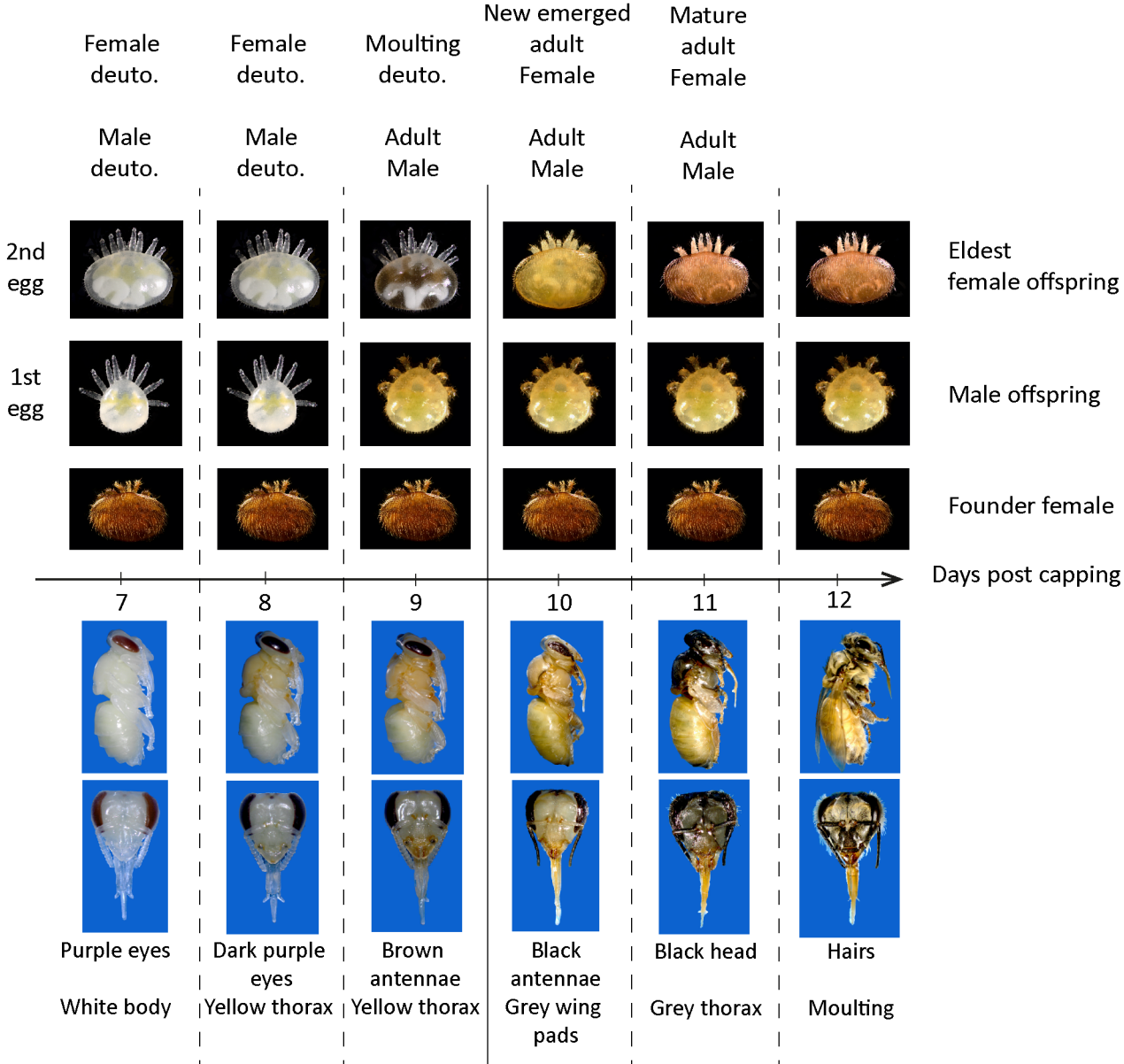


Alvéole de couvain parasitée avec **varroa reproducteur**



→ Dissection de 35 alvéoles infestées → ratio non-reproducteur / reproducteur

Protocole de phénotypage SMR



Protocole de phénotypage SMR

- Prélèvement d'un cadre de couvain operculé dans la colonie à évaluer
 - En "fin de saison" : infestation en varroa du couvain > 5%
 - Estimation de l'âge du couvain
 - Prélèvement d'abeilles adultes pour déterminer la charge en varroa phorétiques
 - Evaluation de la colonie par ColEval[®] : ratio varroas phorétiques/reproducteurs

- Dissection du cadre sous loupe binoculaire
 - Objectif = 35 cellules infestées par une seule femelle fondatrice
 - Si infestation faible : min 10 cellules infestées + 700 cellules disséquées

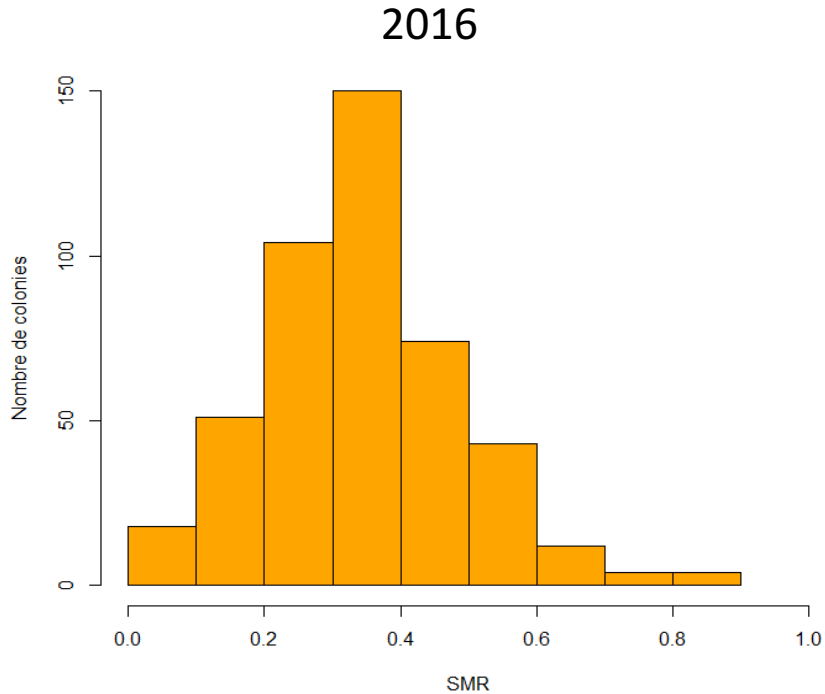
- Détermination du ratio varroas reproducteurs / non-reproducteurs
→ **taux SMR**

- Classement des colonies selon leur taux de SMR (+ autres critères ?)

Echantillonnage 2016-2017

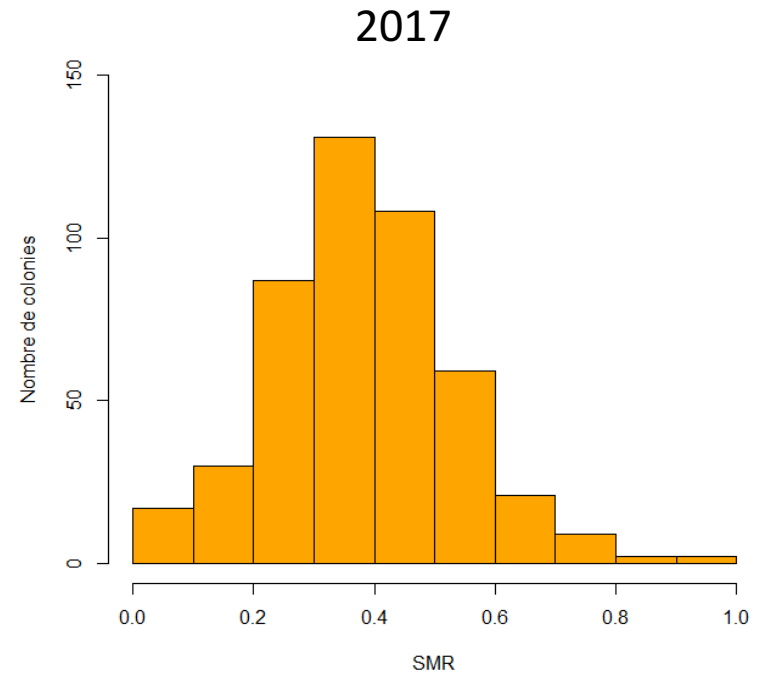
2016	2017	
12	12	structures
40	43	apiculteurs
81	69	ruchers
978	1212	colonies visitées
584	574	mesures SMR
446	468	colonies séquençables

Le phénotypage SMR



- Moyenne de 35%

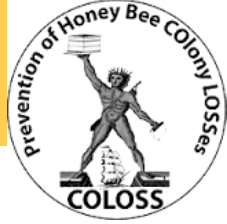
- 13% des colonies avec un score
SMR \geq 50%



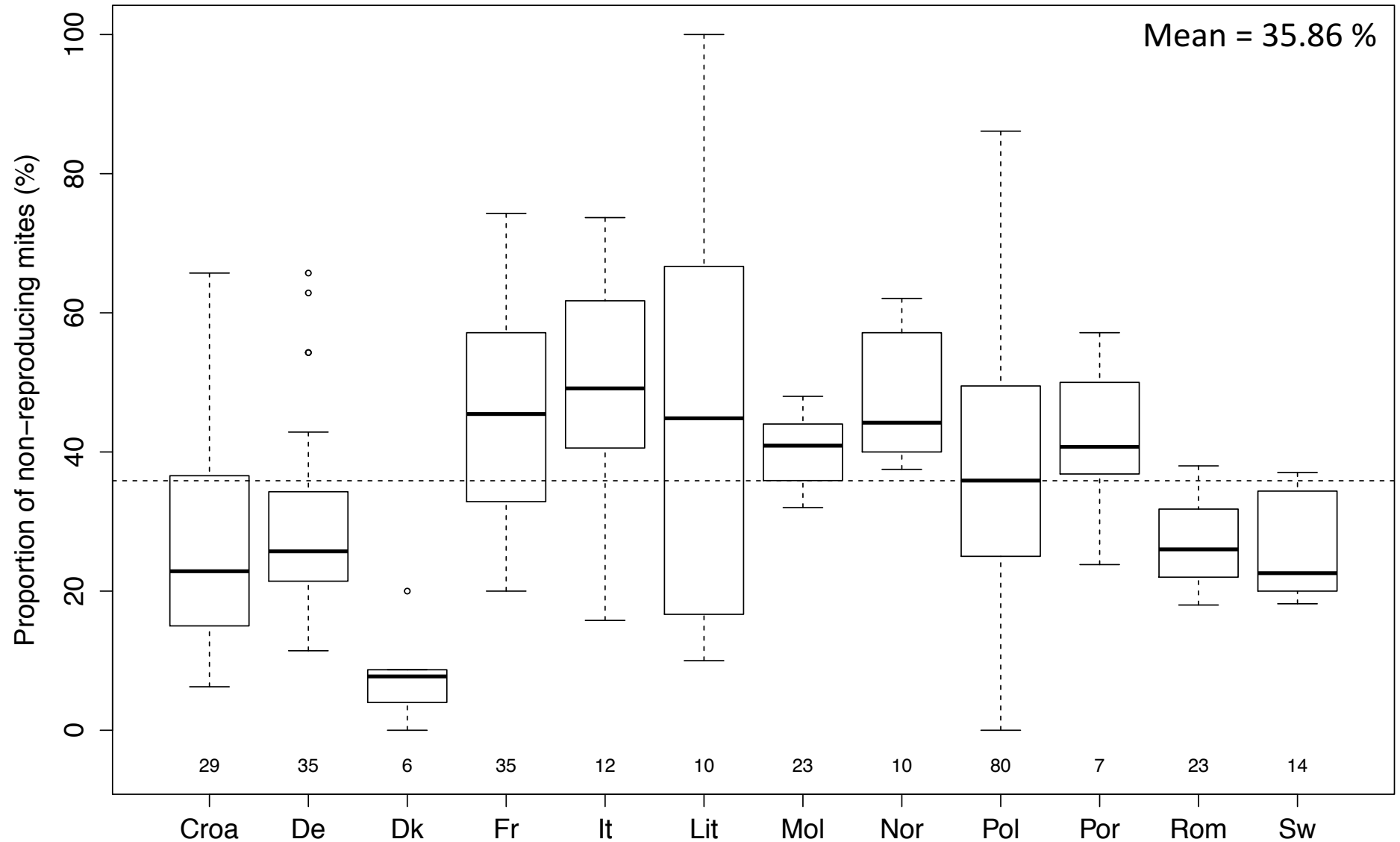
- Moyenne de 39%

- 22% des colonies avec un score
SMR \geq 50%

SMR en Europe



Non reproduction rate per country (inf cells > 10)



Conclusions sur le projet BeeStrong

- Objectif atteint des 1000 colonies phénotypées sur le SMR en deux ans
 - Taux moyen de SMR similaire aux données européennes
 - Caractère de résistance présent dans la population française
 - Pas de structuration évidente selon les races (à confirmer)
 - Identification de 'souches' potentiellement intéressantes
- Etapes en cours et à venir
 - Extraction et séquençage des échantillons d'abeilles en cours
 - Analyse des données de phénotypes :
 - lien avec la saison, la charge en varroas, stabilité de la mesure,
 - lien avec d'autres critères (croissance de la population varroa),
 - Démarrage de l'analyse pour la détection des marqueurs
 - Réflexion avec les réseaux d'apiculteurs sur des projets de sélection

Remerciements



FranceAgriMer

