



Optimisation d'une méthode de dépistage du petit coléoptère de la ruche pour accroître la biosécurité des entreprises apicoles

M. Bernier¹, P. Giovenazzo², J. Arsenault³ et P-L Mercier⁴

¹ Centre de recherche en sciences animales de Deschambault

² Département de biologie, Université Laval

³ Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal

⁴ Département de biologie, Université Laval

Juin 2017

1. Introduction

Aethina tumida, ou petit coléoptère de la ruche est un ravageur des colonies d'abeilles qui peut faire des dommages considérables dans les colonies lorsqu'il est bien établi. Au Canada, on considère l'infestation par *A. tumida* comme une maladie en émergence. Au Québec, c'est une maladie à déclaration obligatoire (MAPAQ 2017) et son évolution sur le territoire est suivie par le biais d'un programme de surveillance active, mis en place depuis 2009. Ce programme, jumelé à la destruction et au traitement des colonies, a permis de contrôler efficacement l'infestation. La surveillance est effectuée à l'aide de pièges ou par l'inspection visuelle des colonies. L'utilisation de pièges requiert plusieurs visites aux colonies et possède une faible sensibilité, c'est-à-dire que les pièges pourront résulter en une absence de détection des coléoptères même en présence de colonies infestées. L'inspection visuelle requiert un temps considérable et doit être effectuée par du personnel qualifié (Neumann et coll. 2013), puisque les coléoptères adultes peuvent facilement se cacher et échapper à l'inspection, surtout si les niveaux d'infestation sont faibles (Spiewok et coll. 2007, Neumann and Hoffmann 2008). La détection de l'ADN de coléoptères par la présence de tissus dans les débris du plateau semble une technique efficace et prometteuse (Ward et coll. 2007). Ward et coll. (2007) ont détecté différents haplotypes de coléoptères inoculés parmi les débris récoltés sur les plateaux de ruches d'abeilles. Ils ont également identifié les coléoptères présents dans des débris d'un échantillon naturellement infestés. (Cepero et coll. 2014) ont utilisé cette technique pour effectuer une surveillance à l'échelle nationale en Espagne.

Objectif principal :

- Optimisation d'une méthode terrain pour faciliter la détection à la ferme d'une maladie émergente dans une perspective de biosécurité des entreprises apicoles.

Objectifs secondaires :

- Développer une méthode de collecte qui permet de récolter facilement les débris de la colonie sans l'ouvrir;
- Estimer les performances diagnostiques (sensibilité et spécificité) de la nouvelle technique de dépistage du petit coléoptère de la ruche.

2. Méthodologie

2.1 Colonies

Les débris de plateau furent récoltés en août 2016, dans un total de 118 colonies réparties en quatre ruchers. Trois ruchers (97 colonies) appartenaient à un même apiculteur et étaient situées dans la région d'Essex County, en Ontario. Ces colonies font partie de la zone de quarantaine mise en place en 2010 et étaient infestées de coléoptères depuis cette date. Ces ruchers ont été trouvés en collaboration avec les membres de la *Tech transfer team*, de l'association des apiculteurs ontarien ainsi que M. Paul Kozak, responsable provincial de l'apiculture, en Ontario. Le dernier rucher, composé de 21 colonies non-infestées (témoin négatif), est situé au Centre de recherche en sciences animales de Deschambault.

2.2 Inspection visuelle

Une inspection visuelle fut effectuée sur chacune des colonies échantillonnées afin de faire un décompte des coléoptères. La méthode utilisée est la même que celle du programme de surveillance québécois en 2016, c'est-à-dire l'inspection du dessus des cadres. Elle est effectuée par deux personnes, soit l'une qui manipule la colonie et l'autre qui compte les coléoptères. L'observation doit se faire promptement, puisque les coléoptères se déplacent rapidement et fuient la lumière.

2.3 Outil de collecte

L'outil de collecte a été développé à partir d'un grattoir commercial en acier inoxydable d'une largeur de 25,4 cm (10 pouces), aussi appelé *Outil de finition pour placoplâtre*. Les deux côtés ont été repliés pour former une pelle. Une longue tige de métal, faisant office de manche, est fixée au grattoir modifié. La récolte de débris était effectuée en insérant l'outil de collecte par l'entrée de la ruche, tout en enfumant l'entrée afin d'écartier les abeilles et ainsi éviter de les écraser. La figure 1 illustre cet outil de collecte. Les débris sont par la suite récoltés dans un sac en plastique refermable identifié. L'outil de collecte est brossé dans de l'eau savonneuse, puis rincé avec de l'alcool éthylique 70%, afin d'éviter la contamination des échantillons lors de la récolte.

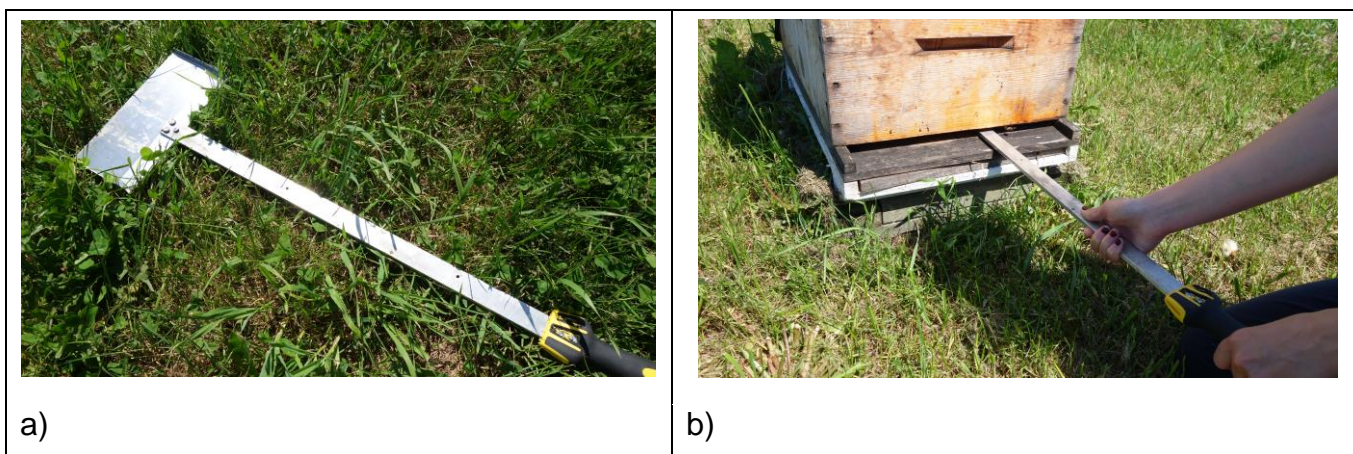


Figure 1. Outil de collecte des débris du plateau. a) Outil de collecte; b) Récolte des débris sur le plateau.

2.4 Analyse génomique des débris et estimation des performances diagnostiques

Les débris récoltés ont été réduits en poudre grossière à l'aide d'un mortier et d'un pilon. Ces derniers étaient ensuite lavés à l'alcool éthylique concentré à 70%, puis exposés à une lumière UV pendant 20 minutes afin d'inactiver l'ADN qui aurait pu rester sur les parois et éviter la contamination. Soixante échantillons ont été sélectionnés de façon aléatoire pour l'analyse génomique. Un sous-échantillon de 0,25 g fut utilisé pour l'extraction des débris. L'ensemble d'extraction *Powersoil DNA Isolation kit* (Mo Bio Laboratories Inc., Californie, États-Unis) fut utilisé pour l'extraction, conformément aux instructions du manufacturier. L'analyse PCR a été réalisée avec des amorces qui permettaient d'amplifier le gène cytochrome oxydase I (COI) de l'ADN mitochondrial d'*A. tumida*. Deux longueurs d'amorces, soit une amorce de 109 paires de bases (SHB207F – TCTAAATACTACTTTCTTCGACCCATC (A/G) et SHB315R – TCCTGGTAGAATTAAAATATAAACTTCTGG, (Ward et coll. 2007)) et une amorce de 1080 paires de bases (AT1904S – 59-GGTGGATCTTCAGTTGATTAGC-39 et AT2953A – 59-TCAGCTGGGGGATAAAATTG-39, (Evans et coll. 2000)) furent utilisées. Une amorce d'actine d'abeille mellifère (*Apis mellifera* L.) (actin-L AGGAATGGAAGCTTGCGGTA et actin-R AATTTTCATGGTGGATGGTGC, (Cox-Foster et coll. 2007)) fut aussi utilisée afin de s'assurer que l'échantillon contenait de l'ADN.

3. Résultats

3.1 Méthode de collecte

La collecte des débris à l'aide de l'outil conçu à cet effet n'a pas mené à des résultats probants. La quantité de débris récoltés avec l'outil n'était pas suffisant, même en essayant à plusieurs reprises. La cire, la propolis et les débris collés au plateau étaient difficilement délogeables avec la lame. De plus, les nombreux interstices de l'outil rendaient son nettoyage et sa désinfection difficile, augmentant les risques de contamination entre les échantillons. Les débris ont donc été récoltés à l'aide d'un lève-cadre conventionnel.

3.2 Inspection visuelle

L'inspection visuelle des colonies par l'observation du dessus des cadres a permis de faire un décompte variant entre 0 et 19 coléoptères adultes par colonie. Les 21 colonies CRSAD (témoins négatifs) ne contenaient pas de coléoptères. Parmi les 97 colonies Essex, 47 contenaient des coléoptères adultes, soit 48,5% des colonies. Aucune larve n'a pu être observée.

3.3 Estimation des performances diagnostiques

Tous les échantillons analysés ont révélé la présence d'actine d'abeille, confirmant qu'il y avait présence d'ADN dans les sous-échantillons. Les amorces longues ont un taux d'efficacité de 72,4% (intervalle de confiance entre 58,5 et 83,0%). Le test PCR ne permet pas de prédire le niveau d'infestation de la colonie ($P=0,3793$). Toutes les amorces courtes ont révélé un résultat positif à l'amplification, même celles qui provenaient de colonies n'ayant jamais été en contact avec le petit coléoptère de la ruche.

4. Discussion et conclusion

L'outil de collecte n'a pas montré l'efficacité souhaitée lors de la récolte de débris, principalement parce que les débris de cire et de propolis étaient collés au plateau. Il aurait fallu que la lame puisse attaquer les débris avec un angle plus important, ce qui n'était pas possible compte tenu de la hauteur limitée de l'entrée de la ruche. L'outil de collecte pourrait être plus efficace lorsqu'il y a une grande quantité de débris (à la sortie de l'hivernage, par exemple) ou lorsque le plateau a été nettoyé il y a peu de temps, pour éviter que les débris

ne soient collés. La récolte de débris à l'aide du lève-cadre, utilisée ici comme méthode alternative, a l'avantage de permettre une collecte plus précise des débris, puisque celui-ci permet de déloger la cire et la propolis collées au plateau. Cela nécessite cependant l'ouverture complète de la ruche. Tous les plateaux de ruches utilisés par les apiculteurs ne se prêtent pas toujours à la collecte de débris avec le lève-cadre, notamment si la hausse à couvain est fixée au plateau. Dans le cas de plateaux grillagés anti-varroas, il est possible de récolter les débris sans ouvrir la ruche. Les débris sont récoltés à même le tiroir du plateau si celui-ci est mis en place. Pour ce type de plateau, l'utilisation de l'outil est même déconseillée, puisque celui-ci pourrait endommager le grillage.

L'analyse génomique, avec une efficacité de 72,4% pour l'amorce longue, permet d'identifier les colonies étant infestées avec le coléoptère. Son efficacité n'est pas affectée par le niveau d'infestation, c'est-à-dire que même les colonies les moins infestées auront un résultat positif suite à l'amplification PCR. L'amplification par PCR permet une analyse rapide de l'état de la colonie, ce que les pièges ne permettent pas, puisqu'il faut les laisser dans la colonie au moins quelques jours avant d'y récolter des coléoptères. Cette technique nécessite également deux visites chez l'apiculteur, soit une pour poser les pièges et une seconde pour en faire l'inspection. L'analyse génomique, en tant que technique d'analyse ponctuelle est meilleure que l'utilisation de pièges. La combinaison de trois types de pièges (Beetle Barn, piège Hood et AJ's Beetle Eater), laissés pour une durée de 6 semaines, permet de réduire l'infestation en coléoptères de 83,3% (Bernier et coll. 2014). Il n'est pas possible de comparer le taux d'efficacité du test génomique à l'efficacité de l'inspection visuelle, puisqu'il n'existe pas de données concernant l'efficacité de cette technique.

L'efficacité de l'analyse génomique peut cependant être affectée par la dégradation de l'ADN de coléoptères qui se trouvent sur le plateau depuis plus ou moins longtemps. La présence d'humidité, de moisissures ou de micro-organismes détritvires peuvent compromettre l'intégralité de l'ADN (Bender et coll. 2004). Les abeilles peuvent également contribuer à réduire la quantité d'ADN puisque les abeilles ouvrières nettoient fréquemment le plateau de la ruche et en expulsent les débris (Gary 2015). Enfin, l'amorce courte, utilisée par (Ward et coll. 2007) en qPCR peut ne pas être adaptée à une analyse en PCR conventionnel. L'ADN de coléoptères et des autres organismes présents dans l'échantillon est peut-être trop dégradé et s'associe à l'amorce, ce qui provoque une amplification non-spécifique.

5. Activités de transfert et de diffusion :

Bernier, M., P-L. Mercier, J. Arsenault et P. Giovenazzo. 2017. Detection of small hive beetle (*Aethina tumida* Murray) in naturally infested hives using DNA analysis of hive debris and scraps. *Hivelights*. Vol 30, no 4. Pages 11-13.

Bernier, M., P.L. Mercier, J. Arsenault et P. Giovenazzo. 2017. Small hive beetle: exploration of a screening method via DNA analysis of hive debris and scraps. Présentation orale au congrès American Bee Research Conference. Galveston, États-Unis. Janvier 2017.

Bernier, M., P.L. Mercier, J. Arsenault et P. Giovenazzo. 2017. Detection of small hive beetle in naturally infested hives via DNA analysis of hive debris and scraps. CBRF preliminary report. *Hivelights*. 30(1): 23.

6. Contribution financière

Ce projet est financé en partie en vertu du Programme d'appui à l'implantation de systèmes de salubrité alimentaire, biosécurité, traçabilité et santé et bien-être des animaux, conformément à l'accord Canada-Québec *Cultivons l'avenir 2*, par la bourse *Canadian Bee Research Fund* octroyée par le Conseil Canadien du miel et par l'Association des professionnels de l'apiculture, et par le Centre de recherche en sciences animales de Deschambault.

7. Bibliographie

- Bender, K., M. J. Farfán, and P. M. Schneider. 2004.** Preparation of degraded human DNA under controlled conditions. *Forensic Science International*. 139: 135–140.
- Bernier, M., V. Fournier, L. Eccles, and P. Giovenazzo. 2014.** Control of *Aethina tumida* (Coleoptera: Nitidulidae) using in-hive traps. *The Canadian Entomologist*. 147: 97–108.
- Cepero, A., M. Higes, A. Martínez-Salvador, A. Meana, and R. Martín-Hernández. 2014.** A two year national surveillance for *Aethina tumida* reflects its absence in Spain. *BMC research notes*. 7: 878.
- Cox-Foster, D. L., S. Conlan, E. C. Holmes, G. Palacios, J. D. Evans, N. A. Moran, P.-L. Quan, T. Briese, M. Hornig, D. M. Geiser, V. Martinson, D. vanEngelsdorp, A. L. Kalkstein, A. Drysdale, J. Hui, J. Zhai, L. Cui, S. K. Hutchison, J. F. Simons, M. Egholm, J. S. Pettis, and W. I. Lipkin. 2007.** A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science*. 318: 283–287.
- Evans, J. D., J. S. Pettis, and H. Shimanuki. 2000.** Mitochondrial DNA relationships in an emergent pest of honey bees: *Aethina tumida* (Coleoptera: Nitidulidae) from the United States and Africa. *Annals of the Entomological Society of America*. 93: 415–420.
- Gary, N. 2015.** Activities and behaviour of honey bees. *In The Hive and the Honey Bee*. Dadant & Sons, Hamilton, États-Unis.
- MAPAQ. 2017.** Nouvelles règles sanitaires concernant le risque de dissémination du petit coléoptère de la ruche. Avis aux apiculteurs. 2 mars 2017. Disponible sur le site Agri Réseau. <https://www.agrireseau.net/documents/94469/avis-aux-apiculteurs-regles-sanitaires-concernant-le-risque-de-dissemination-du-petit-coleoptere-de-la-ruche?p=461>
- Neumann, P., J. D. Evans, J. S. Pettis, C. W. Pirk, M. O. Schäfer, G. Tanner, and J. D. Ellis. 2013.** Standard methods for small hive beetle research. *Journal of Apicultural Research*. 52: 1–32.
- Neumann, P., and D. Hoffmann. 2008.** Small hive beetle diagnosis and control in naturally infested honeybee colonies using bottom board traps and CheckMite+ strips. *Journal of pest science*. 81: 43–48.
- Spiewok, S., J. S. Pettis, M. Duncan, R. Spooner-Hart, D. Westervelt, and P. Neumann. 2007.** Small hive beetle, *Aethina tumida*, populations I: Infestation levels of honeybee colonies, apiaries and regions. *Apidologie*. 38: 595–605.
- Ward, L., M. Brown, P. Neumann, S. Wilkins, J. Pettis, and N. Boonham. 2007.** A DNA method for screening hive debris for the presence of small hive beetle (*Aethina tumida*). *Apidologie*. 38: 272–280.