HAL
open science

Application de la démarche de drug-design pour la conception de nouveaux médicaments vétérinaires contre le parasite Varroa destructor (Acari Varroidae)

Clemence Riva

To cite this version:

Clemence Riva. Application de la démarche de drug-design pour la conception de nouveaux médicaments vétérinaires contre le parasite Varroa destructor (Acari Varroidae). Médicaments. Normandie Université, 2017. Français. NNT : 2017NORMC420 . tel-01693335

HAL Id: tel-01693335

https://theses.hal.science/tel-01693335v1

Submitted on 26 Jan 2018

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.

Normandie Université

THESE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité Sciences de la Vie et de la Santé

Préparée au sein de l'Université de Caen Normandie

Application de la démarche de drug-design pour la conception de nouveaux médicaments vétérinaires contre le parasite *Varroa destructor* (Acari : Varroidae)

Présentée et soutenue par
Clémence RIVA

Thèse soutenue publiquement le 14 décembre 2017 devant le jury composé de		
Mme Gwenaëlle ANDRE-LEROUX	Chargée de recherches-HDR, INRA Jouy-en-Josas	Rapporteuse
Mme Catherine ARMENGAUD	Maîtresse de conférences-HDR, Université Paul Sabatier Toulouse	Rapporteuse
Mr Luc BELZUNCES	Directeur de recherche-HDR, INRA Avignon	Examinateur
Mr Sylvain RAULT	Professeur émérite, Université de Caen Normandie	Examinateur
Mr Patrick DALLEMAGNE	Professeur, Université de Caen Normandie	Examinateur
Mme Isabelle VILLARD	Docteure vétérinaire Directrice général déléguée, Véto-pharma Villebon-sur-Yvette	Examinatrice
Mme Marie-Pierre HALM-LEMEILLE	Maîtresse de conférences-HDR, Université de Caen Normandie	Co-directrice de thèse
Mme Jana SOPKOVA-de OLIVEIRA SANTOS	Professeure, Université de Caen Normandie	Directrice de thèse

Thèse dirigée par Jana SOPKOVA-de OLIVEIRA SANTOS et Marie-Pierre HALM-LEMEILLE, Centre d'Études et de Recherche sur le Médicament de Normandie

UNIVERSITÉ CAEN NORMANDIE

EdNBISE Ecole doctorale Normande Biologie Intégrative, Santé, Environnement

CERMN

Travailler sans souci de gloire ou de fortune,
À tel voyage, auquel on pense, dans la lune !

Cyrano de Bergerac
Acte II, Scène VIII

Remerciements

Le travail du thésard, quoique personnel, ne saurait exister, ni aboutir, sans le soutien administratif, financier, scientifique ou amical de nombreuses personnes. Je ne pourrai citer ici tous vos noms, mais voici *tous ceux qui me viendront, je vais vous les jeter, en touffe, sans les mettre en bouquets*.

Je remercie Catherine Armengaud et Gwenaëlle André-Leroux d'avoir accepté de juger ce travail en tant que rapportrices. Merci également à Patrick Dallemagne de m'avoir accepté au laboratoire du CERMN pendant la durée de mes travaux, et d'avoir participé au jury de ma soutenance de thèse. Je souhaite remercier les membres du jury Luc Belzunces, Isabelle Villard et Sylvain Rault de m'avoir fait l'honneur de juger mon travail.

Mes pensées se tournent maintenant vers mes deux directrices, Jana Sopkova-de Oliveira Santos et Marie-Pierre Halm-Lemeille. Marie-Pierre merci de m'avoir ouvert au monde de la recherche sur l'abeille, et de m'avoir fait confiance. Jana un grand merci pour m'avoir guidé avec patience dans le monde, souvent surprenant, de la modélisation, et pour ton soutien sans faille.

Je souhaite remercier la Région Basse-Normandie, et l'École Doctorale Normande BISE pour l'accompagnement de ce projet. Merci également à la Fondation Lune de Miel® pour l'attribution d'une bourse en 2016.

Je remercie la société Vétopharma pour le cofinancement de mes travaux de thèse et sa participation active au projet. Je remercie chaleureusement Isabelle Villard, à la fois pour cette très intéressante collaboration et pour avoir bien voulu participer au jury de ma soutenance. Je remercie également Benoit Seifert pour avoir été présent sur toute la première moitié du projet. Je souhaite remercier également les personnes que j'ai pu rencontrer à Wyjolab, pour leur agréable accueil dans la belle Région de l'Indre. Je remercie tout particulièrement Gaël Charpentier, j'espère que tu m'excuseras d'avoir vidé presque tous tes stocks de varroas.

Merci à Michel Sokolowski, pour le prêt de ton matériel, cela a été un plaisir de pouvoir utiliser et suivre l'évolution de ces dispositifs complexes. Un grand merci à Julien Normand pour l'aide précieuse et motivante sur le logiciel R.

Mes remerciements apicoles vont aux membres de l'Abeille Normande du Calvados. Merci pour votre participation volontaire, votre aide a été indispensable au bon déroulement de mon projet. Merci aux bénévoles du rucher école, grâce à qui j'ai pu être initiée aux bonnes pratiques apicoles. Je remercie Jean-Marie Godier, président de l'association. Philippe Gilles, je te remercie pour le partage, sans compter, de ton savoir et de ta passion. Merci à Jaques Hue, pour l'aide sur l'enquête des pratiques de traitements anti-varroa. Et un grand merci pour tous les apiculteurs, pour les cadrons de couvains et vos encouragements.

Un immense merci à ceux que j'ai pu côtoyer au quotidien, ou simplement croiser, durant ces trois années. Je remercie tout particulièrement Jean-Philippe, pour le coaching lors de la rédaction et pour nos discutions autours des *très* nombreux mugs de thé. Merci Peggy et Colette, pour l'aide précieuse concernant la chimiothèque. Charline, merci pour ton intérêt pour l'apiculture, je suis heureuse de savoir que les abeilles vont continuer à butiner autour du CERMN. J'en profite pour saluer Emmanuelle et Sangeetha, membres officiels l'équipe « mots-croisés ». Fabienne je te remercie pour l'initiation à la modélisation par homologie. Je remercie Maxime, agréable note Québécoise au pays de l'embuscade, pour nos discutions scientifiques et amicales. Anne-Claire, Sophie, Willy et Thomas, Marie, et tous les thésards, post doctorants, techniciens et stagiaires, dont la bonne humeur, et les goûts musicaux souvent surprenants, me permettent de garder ces trois années de nombreux et heureux souvenirs.
Je souhaite remercier tous ceux qui ont cru en moi, tout au long de mon parcours scolaire et personnel. Merci à mes amis. Quentin et Adeline, nos fous rires devant le Cœur à ses raisons raisonnent *probablemin* encore dans l'enceinte du campus Bridoux. Marion je ne te remercierai jamais assez pour ton oreille attentive. Enfin, un immense merci à ma famille. À mes parents, qui m'ont toujours soutenu, je vous remercie d'avoir cru en moi, parfois au-delà du raisonnable. Merci à mon grand frère également, et à mes deux grands-mères, qui ont, chacun à leur manière, contribué à mon éducation.

Table des matières

Remerciements **1**

Table des matières **3**

Table des abréviations **7**

AVANT-PROPOS **9**

CHAPITRE 1 PRESENTATION DES MODELES BIOLOGIQUES **13**

1.1 Importance des abeilles **13**

1.2 Taxonomie **15**

1.2.1 Classification de l'abeille 16

1.2.2 Classification du varroa 18

1.3 Cycles de développement **19**

1.3.1 Organisation de la colonie d'abeilles 19

1.3.2 Cycle biologique annuel 20

1.3.2.1 Développement annuel de la colonie d'abeilles 20

1.3.2.2 Développement de la population de varroas 21

1.3.3 Cycle de développement de l'abeille et du faux bourdon 22

1.3.3.1 Reproduction par essaimage 22

1.3.3.2 Reproduction sexuée 23

1.3.3.3 Développement du couvain 23

1.3.4 Cycle de développement du varroa 25

1.3.4.1 La phase de phorésie 25

1.3.4.2 Processus d'infestation du couvain 25

1.3.4.3 Ontogenèse 26

1.3.4.4 Reproduction dans le couvain 27

1.4 Conséquences de l'infestation par varroa **28**

1.4.1 Expression de la varroose à l'échelle de la colonie 29

1.4.2 Conséquences du parasitisme à l'échelle individuelle 30

1.4.2.1 Réduction de l'espérance de vie 30

1.4.2.2 Altération des capacités cognitives 31

1.4.2.3 Effet immunopathogène de *Varroa destructor* 31

1.4.2.4 Un vecteur d'agents infectieux pour l'abeille 32

1.5 Moyens de lutte contre *Varroa destructor* **35**
1.5.1 Évaluer l'infestation par varroa 36
1.5.2 Lutte par l'emploi de traitements acaricides 38
1.5.2.1 Molécules de synthèses à usage varroacide 38
1.5.2.2 Molécules biologiques 42
1.5.3 Lutte biologique et biomécanique 45
1.5.3.1 La sélection de souche d'abeilles tolérantes au varroa 45
1.5.3.2 Piégeage des varroas dans le couvain 46
1.5.3.3 La lutte biologique 47
1.5.3.4 Extraits végétaux divers 49
1.5.3.5 Autres pistes de lutte 49
1.5.4 Traitements anti-varroas autorisés en France 50
1.5.5 Efficacité des traitements varroacides et phénomènes de résistances 52
1.5.5.1 Définition d'un traitement efficace 52
1.5.5.2 Suivi de l'efficacité en France 53
1.5.5.3 Développement et propagation des résistances 54
1.5.5.4 Mécanismes de résistance 55

1.6 Enquête sur les pratiques de traitements anti-varroas dans le Calvados **56**
1.6.1 Présentation de l'Abeille Normande du Calvados 56
1.6.2 Résultats de l'enquête 57

1.7 Conclusion **61**

CHAPITRE 2 LA DEMARCHE DE DRUG-DESIGN **63**

2.1 Introduction **63**
2.1.1 Mode d'action des ligands 63
2.1.2 Les étapes d'identification de molécules actives 64

2.2 Les méthodes de criblage virtuel **65**
2.2.1 Recherche par similarité de structure 65
2.2.1.1 Les descripteurs 65
2.2.1.2 Descripteurs constitutionnels (0D) 66
2.2.1.3 Descripteurs de sous-structure (1D) 66
2.2.1.4 Descripteurs obtenus à partir de la formule développée (2D) 66
2.2.1.5 Descripteurs obtenus à partir de la conformation 3D de la molécule 67
2.2.1.6 Les descripteurs conformationnels (4D) 68
2.2.1.7 Les empreintes moléculaires (1D/2D/3D) 68
2.2.1.8 Coefficient de similarité 68
2.2.2 Méthodes basées sur la structure du récepteur 69

2.2.2.1 Détermination expérimentale de la structure 69
2.2.2.2 Niveau de confiance des structures 71
2.2.2.3 Les modèles par homologie de séquence 71
2.2.2.4 Prédiction de l'orientation du ligand par docking moléculaire 73
2.2.2.5 Flexibilité 73
2.2.2.6 La simulation par dynamique moléculaire 75
2.2.2.7 Estimation de la force de liaison par scoring 76
2.2.3 La procédure de criblage GOLD 79

2.3 Tests *in vitro* 80
2.3.1 Test d'inhibition de l'acétylcholinestérase 80
2.3.2 Test de liaison aux récepteurs à l'octopamine 82

2.4 Tests *in vivo* sur abeilles et varroas 82
2.4.1 Récoltes de varroas dans le couvain 82
2.4.2 Récolte de varroas phorétiques 83
2.4.3 Maintien des varroas au laboratoire 83
2.4.4 Protocole du test en cagettes 84

CHAPITRE 3 L'ACETYLCHOLINESTERASE 87

3.1 Introduction 87
3.1.1 Rôle biologique 87
3.1.2 Polymorphisme structural 89
3.1.2.1 De la structure… 89
3.1.2.2 …aux gènes 90
3.1.3 Structure tridimensionnelle générale 90
3.1.3.1 Le site actif 91
3.1.3.2 La gorge aromatique 92
3.1.3.3 Le site périphérique 93
3.1.4 Inhibition de l'acétylcholinestérase 94

3.2 Résultats 96
3.2.1 Réorientation d'acaricides 96
3.2.1.1 Test *in vitro* de pesticides de la famille des carbamates 97
3.2.1.2 Similarité de structure avec le pirimicarbe 98
3.2.1.3 Tests *in vivo* du pirimicarbe 99
3.2.1.4 Conséquences d'une exposition par voie orale à du pirimicarbe sur le comportement d'alimentation des abeilles 100
3.2.2 Étude à partir de composés inhibiteurs de l'AChE humaine 111
3.2.2.1 Le donécopride et ces dérivés 111

3.2.2.2 Résultats 111
3.2.2.3 Discussion et conclusion 112
3.2.3 Construction des modèles par homologie de séquence 114
3.2.4 Criblage de la chimiothèque dans le modèle de l'AChE du varroa 117
3.2.4.1 Paramétrage du modèle 117
3.2.4.2 Sélection des composés issus du criblage *in silico* 118
3.2.4.3 Résultats des tests *in vitro* 118
3.2.4.4 Détermination des IC_{50} 125
3.2.4.5 Tests *in vivo* 125

3.3 Conclusion sur la cible acétylcholinestérase 127

CHAPITRE 4 LES RECEPTEURS A L'OCTOPAMINE 129

4.1 Introduction 129
4.1.1 Rôle biologique de l'octopamine 129
4.1.2 Caractéristiques structurales des RCPGs 130
4.1.3 Classification des récepteurs à l'octopamine 132

4.2 Résultats 133
4.2.1 Construction des modèles par homologie de séquence 133
4.2.2 Résultats des tests *in vivo* 140
4.2.2.1 Efficacité des dérivés de l'amitraze 140
4.2.2.2 Similarité de structure 143

4.3 Conclusion sur les récepteurs à l'octopamine 145

CHAPITRE 5 CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES 147
A. ANNEXES 153
A.1 Structures des molécules issues du criblage de la chimiothèque du CERMN 154
A.2 Structures des molécules de la famille du composé SR2091 158
A.3 Alignements des trois séquences issues du génome brut du varroa – pour la recherche de récepteurs à l'octopamine – avec la séquence du récepteur β2-adrénergique de l'humain 159
A.4 Structures des molécules testées *in vivo* pour leur similarité de structures avec le DMPF et l'octopamine 161
A.5 Questionnaire de l'enquête sur les pratiques de traitements anti-varroas dans le Calvados 162
Bibliographie 167

Table des abréviations

1D/2D/3D :	1 dimension / 2 dimensions / 3 dimensions
Å :	Angström
ABPV :	Virus de la paralysie aiguë (*Acute Bee Paralysis Virus*)
ACh :	Acétylcholine
AChE :	Acétylcholinestérase
ADAPI :	Association de Développement de l'Apiculture en Aquitaine
AMM :	Autorisation de Mise sur le Marché
ANSES :	Agence Nationale de Sécurité Sanitaire
DL :	Dose Léthale
DM :	Dynamique Moléculaire
DMSO :	Dimethyl sulfoxide
DWV :	Deformed wing virus
EMA :	Agence européenne des médicaments (*European Medicines Agency*)
FNOSAD :	Fédération Nationale des Organisations Sanitaires Apicoles Départementales
GDSA :	Groupement de Défense Sanitaire Apicole
GS :	GoldScore
LMR :	Limite Maximale de Résidus
KVB :	Virus du Cachemire
OA :	Octopamine
OP :	Organophosphoré
PDB :	*Protein Data Bank*
PAS :	*Peripheral Anionic Site*
PER :	Réflexe d'Extension du Proboscis (*Proboscis extension reflex*)
PM :	Poids Moléculaire
RCPG :	Récepteurs Couplés aux Protéines G
RMN :	Résonance Magnétique Nucléaire
RX :	Rayons X
SE :	*Standard error*
SMR :	*Suppression of Mite Reproduction*
TM :	Transmembranaire
VSH :	*Varroa Sensitive Hygiene*

Acides aminés

A	Ala	alanine	M	Met	méthionine
C	Cys	cystéine	N	Asn	asparagine
D	Asp	acide aspartique	P	Pro	proline
E	Glu	acide glutamique	Q	Gln	glutamine
F	Phe	phénylalanine	R	Arg	arginine
G	Gly	glycine	S	Ser	sérine
H	His	histidine	T	Thr	thréonine
I	Ile	isoleucine	V	Val	valine
K	Lys	lysine	W	Trp	tryptophane
L	Leu	leucine	Y	Tyr	tyrosine

Avant-propos

Le présent manuscrit est le fruit de ma thèse, qui s'est déroulée au sein du Centre d'Études et de Recherche sur le Médicament de Normandie (CERMN). Cette unité de recherche interdisciplinaire axe ses travaux sur la conception et la synthèse d'agents d'intérêt thérapeutique pour les neurosciences et la cancérologie. Quatre plateformes, Chimie Organique et Médicinale, Chémoinformatique, Chimiothèque, Screening et Drugabilité permettent une approche raisonnée de la conception de médicaments, ou *drug design*. La plateforme Chimiothèque abrite à l'heure actuelle une collection de plus de 17000 composés originaux, issus des travaux du CERMN. Depuis bientôt six ans, le laboratoire met ce savoir-faire en application pour la santé de l'abeille domestique *Apis mellifera*.

Insecte cosmopolite dont la domestication remonte à 6 000 ans, l'abeille domestique est depuis longtemps reconnue comme un pollinisateur primordial. L'entomogamie, lorsque la pollinisation des plantes est assurée par l'intermédiaire des insectes, est le mode de fertilisation des plantes angiospermes le plus répandu. En menant sa tâche de récolte du nectar et du pollen, l'abeille butineuse permet le transport efficace du pollen vers le pistil des fleurs. Nombreux sont les arbres, arbustes et plantes basses, cultivés sur des dizaines de milliers d'hectares, qui bénéficient de l'intervention des abeilles sauvages ou domestiques. Depuis une vingtaine d'années cependant, le secteur de l'apiculture fait face à un affaiblissement général des colonies, conduisant à une forte augmentation des taux de mortalité d'abeilles à l'échelle mondiale. L'acarien *Varroa destructor*, ce « vampire venu d'Extrême-Orient » [i], est actuellement considéré comme l'un des principaux facteurs impliqués dans la surmortalité des colonies. Les apiculteurs ont à leur disposition une batterie de traitements anti-varroas, mais ces médicaments vétérinaires ne sont dérivés que d'un nombre limité de molécules actives. De l'utilisation répétée des mêmes molécules découle le développement de résistances du varroa face aux traitements utilisés pour en réguler la population. Des moyens de lutte alternatifs existent mais les résultats obtenus sont souvent contradictoires et/ou difficilement applicables

[i] Vincent Tardieu, L'étrange silence des abeilles – Enquête sur un déclin inquiétant, Éditions Belin 2015

pour l'apiculteur. Le développement de nouvelles molécules constitue alors une alternative intéressante et rapide afin de répondre à l'urgence de la situation.

Le plan de développement durable de l'apiculture, initié en 2013 et reconduit jusqu'en 2017, préconise ainsi de « promouvoir et encourager la mise au point de nouveaux médicaments, particulièrement pour lutter contre le varroa »

Cette thèse a donc eu pour objectif de mettre en évidence de nouvelles molécules candidates afin de lutter contre le varroa. Les deux contraintes principales auxquelles les molécules doivent répondre sont : d'avoir une forte efficacité varroacide et d'être sans effet dommageable pour la santé de l'abeille. Dans ce cadre, une démarche de *drug design*, approche utilisée au CERMN pour la conception de médicaments, a été appliquée à la santé de l'abeille.

Les acaricides peuvent agir sur une variété de processus biologiques, dont les ligands peuvent être regroupés en trois catégories : les inhibiteurs de la chaîne respiratoire mitochondriale, les inhibiteurs de croissance qui affectent le développement des acariens visés, et les acaricides neurotoxiques (voir Figure 1).

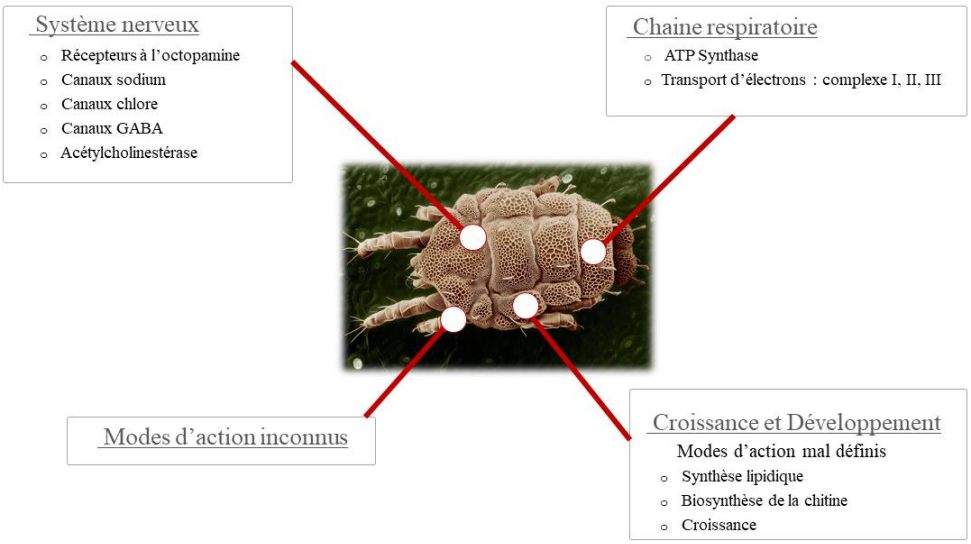


Figure 1. Diversité des modes d'actions des acaricides.

Or si le CERMN axe ses travaux sur la conception et la synthèse d'agents d'intérêts thérapeutiques pour les neurosciences - notamment la maladie d'Alzheimer - et la cancérologie, les cibles visées par les travaux peuvent être « communes ».
En effet, chez l'Homme, on constate que les personnes atteintes de la maladie neurodégénérative d'Alzheimer présentent des carences en acétylcholine, et cette diminution est responsable de certains symptômes clés de la pathologie. Des inhibiteurs de l'AChE permettent de limiter ces symptômes en améliorant la transmission cholinergique. La synthèse de molécules ciblant l'AChE humaine fait donc partie des thématiques de recherche du CERMN.
Les protéines membranaires de la famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs) représentent l'une des cibles les plus importantes de la pharmacologie moderne, du fait de l'étendue des fonctions dans lesquelles elles interviennent. De nombreuses molécules synthétisées au laboratoire visent ainsi certains récepteurs de la famille des RCPGs, dont fait partie le récepteur à l'octopamine chez les insectes.

Dans l'objectif d'exploiter la chimiothèque du CERMN, ce travail de thèse s'est donc focalisé naturellement sur deux cibles du système nerveux : l'enzyme acétylcholinestérase (AChE) et un récepteur de la famille des RCPGs, le récepteur à l'octopamine, déjà ciblé par l'amitraze, substance active de deux médicaments vétérinaires déjà autorisés en France.

Le manuscrit est composé de cinq chapitres :

- Le chapitre 1 contextualise notre travail. Une introduction aux modèles biologiques *Apis mellifera* et *Varroa destructor* précède la revue des différentes conséquences du développement du parasite dans les colonies d'abeilles. Nous évoquerons également les différents moyens de lutte anti-varroas, et leurs limites, à disposition des apiculteurs. Le lecteur y trouvera également les informations recueillies lors d'une enquête menée auprès d'apiculteurs du Calvados sur les pratiques de traitement anti-varroas.
- Le chapitre 2 explicite la démarche avec laquelle nous avons abordé la recherche de nouveaux traitements anti-varroas. L'approche de *drug design* - ou de conception du médicament en français - est courante en santé humaine pour l'identification de nouvelles molécules actives. Notre objectif est de l'appliquer pour la recherche de nouveaux traitements anti-varroas, en l'adaptant aux contraintes propres aux cibles biologiques visées.

- Les chapitre 3 et 4 comportent les informations recueillies et obtenues sur les cibles visées par nos travaux (*i.e.* l'acétylcholinestérase et les récepteurs à l'octopamine).
  Concernant l'acétylcholinestérase, trois pistes ont été successivement explorées. La première exploite une approche de réorientation de composés déjà existants. La deuxième envisage l'exploitation des molécules synthétisées au laboratoire en tant qu'inhibiteurs de l'acétylcholinestérase humaine. Enfin la dernière piste élargit la recherche à l'intégralité des molécules présentes dans la chimiothèque du CERMN.
  Concernant les récepteurs à l'octopamine, nos efforts se sont focalisés sur l'exploitation de la chimiothèque.
- Le chapitre 5 sert de conclusion générale aux travaux menés pendant ces trois années de thèse.

Chapitre 1
Présentation des modèles biologiques

1.1 Importance des abeilles

Avec 80 % des espèces de plantes à fleurs dépendantes des pollinisateurs pour leur reproduction, les pollinisateurs jouent un rôle primordial pour l'environnement. Notre sécurité alimentaire est également dépendante de la pollinisation animale – en particulier les cultures légumières, fruitières, oléagineuses et protéagineuses. Ainsi à l'échelle mondiale, une étude franco-allemande dirigée Bernard Vaissière (Laboratoire de pollinisation et écologie des abeilles, INRA, Avignon) estime la valeur monétaire du service effectué par les pollinisateurs, pour la production végétale destinée à l'alimentation humaine, à 153 milliards d'euros [1]. Au niveau européen, 84 % des espèces cultivées dépendraient directement des insectes pollinisateurs, avec un degré de dépendance variant de 5 à 50 % selon les cultures [2]. S'agissant de la France, un rapport [i] de 2016 a chiffré les services de pollinisation entre 2,3 et 5,3 milliards d'euros. Les insectes pollinisateurs influencent également les rendements des récoltes, et une pollinisation incomplète s'accompagne souvent de fruits petits et malformés [3,4] (Figure 2 C).

Les abeilles domestiques, avec les autres pollinisateurs sauvages, sont donc essentiels au maintien de la diversité des plantes et de nos ressources alimentaires (Figure 2 A et B).

[i] Commissariat général au développement durable – Evaluation française des écosystèmes et des services écosystémiques, « les services de la pollinisation », novembre 2016

Figure 2. A et B : En récoltant le nectar des fleurs, les insectes pollinisateurs se chargent de pollen. Photographies personnelles. C : les différents modes de pollinisation des fraises influencent la taille des fruits. L'auto-pollinisation passive – auto-fécondation – produit des fruits de petites tailles (rangée d'en haut). L'ajout de la pollinisation par le vent augmente la taille des fraises (rangée médiane). L'ajout de la pollinisation entomophile – en l'occurrence par les abeilles – produit des fraises de très grandes tailles (rangée d'en bas). © Nicolas Morison & Marie Harruis, INRA Avignon

En prenant en compte la dépendance aux pollinisateurs, pour les 100 cultures utilisées dans l'alimentation directe de l'homme, le service écologique a été évalué à l'échelle mondiale, pour 2005, à 153 milliards d'euros [1]. Cela représente 9,5 % de la valeur de la production agricole mondiale destinée à l'homme et traduit l'importance économique majeure que représente la pollinisation. De plus, l'apiculture en elle-même représente un secteur d'activité lucratif, à travers la commercialisation des produits de la ruche. En 2010, la valeur globale du secteur apicole a été évaluée, par un audit de France AgriMer, à plus de 133 millions d'euros [5]. Ce chiffre considère les prix de vente des produits et services de l'apiculture française et englobe un chiffre d'affaire de plus de 3 millions d'euros pour le service de la pollinisation (rémunérations perçues par les apiculteurs, qui mettent à disposition leurs colonies afin d'augmenter les rendements agricoles, sans prise en compte du service écologique).

Cependant, depuis une vingtaine d'années, le secteur de l'apiculture fait face à un affaiblissement général des colonies, conduisant à une forte augmentation des taux de mortalité d'abeilles à l'échelle mondiale. Alors qu'un taux de pertes hivernales de 10 % est considéré comme normal, il se trouve actuellement à 20 % en moyenne, auquel s'ajoutent des pertes en cours de saisons d'environ 10 % [6]. Devant de telles réductions d'effectifs, les apiculteurs se découragent et leur nombre sur le territoire français est en baisse. En six ans, le secteur a subi une perte de 27 400 apiculteurs, soit en moyenne plus de 4500 apiculteurs par an, un recul de la production de miel d'environ 28 % et une baisse des rendements produits par les colonies.

Comprendre les causes de l'affaiblissement des colonies n'est pas une chose facile. La plupart des experts s'accordent sur une origine multifactorielle de ce phénomène. L'ANSES [7] distingue quatre catégories de causes de mortalité des colonies d'abeilles domestiques : les agents chimiques, les causes environnementales, la mortalité liée aux pratiques apicoles et les agents biologiques. Les agents chimiques couvrent les xénobiotiques (insecticides, fongicides et acaricides) présents dans l'environnement et dans les matrices apicoles. Les causes environnementales font références à la qualité des ressources alimentaires des abeilles et aux aléas climatiques. Dans son rapport, l'ANSES dénombre 29 agents pathogènes biologiques dont :

- 4 prédateurs, dont le frelon asiatique *Vespa velutina*,
- 5 parasites, dont *Varroa destructor*,
- 3 champignons, dont *Nosema ceranae* responsable de la nosémose,
- 6 bactéries, comme par exemple *Paenibacillus larvae* responsable de la loque américaine, maladie affectant les stades larvaires,
- 12 virus, comme le virus des ailes déformées (DWV).

1.2 Taxonomie

Présentant un exosquelette et une segmentation hétéronome, l'abeille et le varroa appartiennent tous deux au phylum (ou embranchement) des Arthropodes ; leur lien phylogénétique s'arrête cependant à ce niveau. Les abeilles appartiennent en effet à la classe des Insectes – caractérisée par trois paires de pattes et un corps divisé en trois parties – alors que le varroa, qui possède quatre pattes à l'état adulte, appartient à la classe des Arachnides.

1.2.1 Classification de l'abeille

Les abeilles au sens large, *i.e.* Apoidea: Apiformes, sont probablement apparues au Crétacé, lors d'une transition vers une source protéique pollinique, et non plus carnivore comme leur plus proche voisin les Apoidea: Spheciformes (guêpes fouisseuses). Sont décrites à ce jour plus de 17 000 espèces d'abeilles, réparties en sept familles [8]. Elles appartiennent à l'Ordre des Hymenoptera, caractérisé par deux paires d'ailes membraneuses. Les hyménoptères se subdivisent en deux Sous-ordres : les Symphytes et les Apocrites. Les abeilles appartiennent au second, dont le caractère le plus typique est la « taille de guêpe » qui semble séparer le thorax de l'abdomen. Plus précisément, les abeilles sont rassemblées dans le Groupe des Aculéates, dont l'organe ovopositeur a été transformé en aiguillon.

Le classement phylogénétique des abeilles a évolué au cours du temps. Kirby (1802) et Latreille (1802) proposèrent presque simultanément une première classification globale pour les abeilles. Les deux hommes distinguèrent chacun deux genres, qui reprennent respectivement les abeilles à langue longue et les abeilles à langue courte. La première classification moderne des abeilles est présentée en 1944 par Charles D. Michener [9]. Les résultats d'études morphologiques dépendent de la pondération des traits observés [10] et peuvent donc être très variables ; en revanche, dans toutes ces anciennes classifications phylogénétiques, l'abeille mellifère occupe le sommet de l'arbre. Les nouveaux outils moléculaires ont bouleversé cette vision, et une nouvelle classification a été proposée [11], plaçant les groupes paraphylétiques de la famille Melittidae *s.l.* comme les premières branches de l'arbre phylogénétique des abeilles (Figure 3).

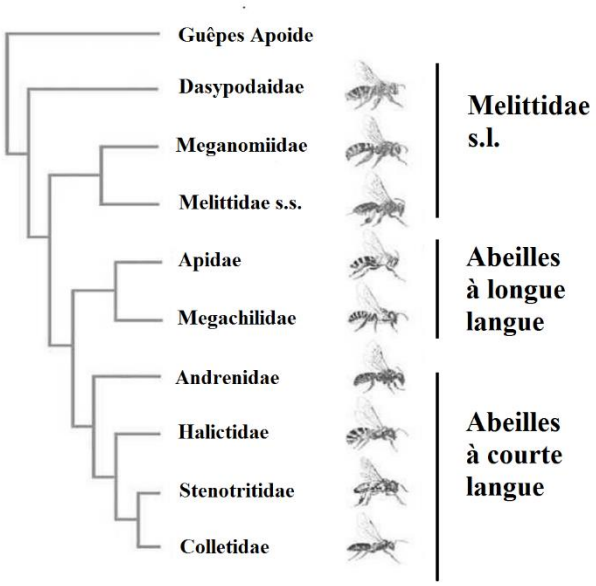


Figure 3. Phylogénie des Apoidea Apiformes basée sur la morphologie des adultes et le séquençage de 5 gènes (d'après Danforth et al. 2006).

L'établissement de l'arbre phylogénétique des abeilles reste encore sujet à modification mais aide à comprendre, entre autres, les relations entre les familles dans lesquelles sont regroupées les abeilles.

Seules les abeilles des genres Meliponini et Apis sont hautement eusociales [12].
Le genre Apis (Linnaeus, 1758) regroupe sept espèces (selon The Integrated Taxonomic Information System on-line database, www.itis.gov, consulté en mars 2017) :

- *Apis cerana* Fabricius, 1793, *Apis koschevnikovi* Enderlein, 1906 et *Apis nigrocincta* Smith, 1861 sont de la taille de notre Abeille et sont réparties en Asie du Sud-Est ;
- *Apis dorsata* Fabricius, 1793, abeille « géante » trouvée en Inde ;
- *Apis florea* Fabricius, 1787 et *Apis andreniformis* Smith, 1858, petites abeilles de l'inde ;
- *Apis mellifera* Linnaeus, 1758.

Apis mellifera est nativement répartie très largement : de l'Europe au Moyen-Orient, en passant par l'Afrique [13] ; les autres espèces du genre sont confinées à l'Asie (Figure 4).

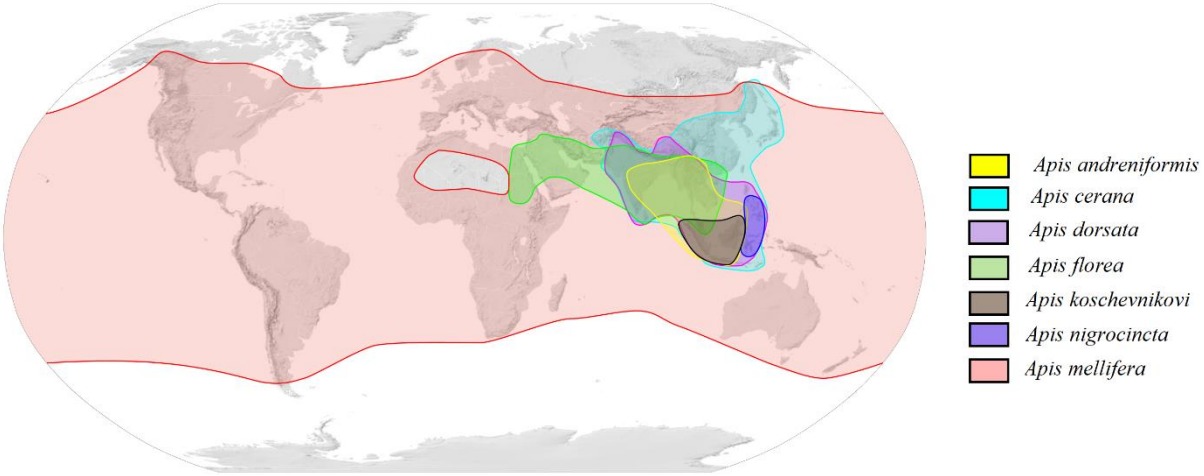


Figure 4. Carte de répartition mondiale des abeilles du genre Apis (© Sémhur, 2011)

Apis mellifera a été introduite par l'Homme sur tous les continents, excepté l'Antarctique, pour la pollinisation des cultures et la production de miel. L'espèce montre des variations géographiques, résultant de son adaptation aux conditions locales (climat, végétation et pathogènes). Ainsi, 27 sous-espèces sont décrites à ce jour, dont 10 sont trouvées en Europe [14].

Certaines sous-espèces montrent une variabilité importante amenant le concept d'écotype, ou race, se distinguant par des caractéristiques liées à l'environnement mais sans réel existence taxonomique. La variabilité en sous-espèces et écotype tend à diminuer sous la pression de facteurs tels que le varroa [15] et l'importation d'abeilles sélectionnées par l'homme [16].

1.2.2 Classification du varroa

Les acariens (Sous-classe Acari) font partie des plus anciens animaux terrestres : le fossile d'acarien le plus ancien date du Dévonien, soit d'environ 400 millions d'années [17]. Les acariens présentent une paire de chélicères (première paire d'appendices buccaux) caractéristique des arthropodes chélicérates, par opposition aux arthropodes antennates (encore appelés mandibulates).

Beaucoup d'acariens vivent librement dans le sol ou l'eau, mais ils ont aussi développé une grande diversité de relations avec d'autres êtres vivants, animaux ou végétaux, allant de la phorésie à l'endoparasitisme. La phorésie a été définie dès 1896 par Lesne ; elle désigne le processus par lequel un animal (le phorétique) s'accroche à la surface d'un hôte, pour une durée limitée, afin notamment d'émigrer d'un site à un autre [18]. L'étude de fossiles en provenance de Chine [19] a permis le plus ancien report de phorésie entre un acarien et un insecte, datant de 320 millions d'années.

Selon l'Integrated Taxonomic Information System (www.itis.gov, consulté en mars 2017) les acariens se subdivisent en deux Super-ordres : les Acariformes et les Parasitiformes. Le varroa appartient au second, et plus précisément à l'ordre Mesosigmata. Les mésostigmates sont un ordre d'acariens parasitiformes regroupant environ 11 500 espèces [20], soit environ 20% des espèces d'acariens connues.

Jusqu'en 1999, trois espèces du genre *Varroa* étaient définies :

- *Varroa underwoodi* (décrite par Delfinado-Baker et Aggarwale en 1987)
- *Varroa jacobsoni*, (décrite par Oudemans en 1904)
- *Varroa rindereri* (décrite par De Guzman et Delfinado-Baker en 1995), cette dernière espèce se limitant au parasitisme sur l'abeille *Apis koschevnikovi* à Bornéo [21].

Il était alors convenu que *Varroa jacobsoni* avait réalisé le transfert d'hôte d'*Apis cerana* vers *Apis mellifera*, se répandant ainsi à travers les continents. Cependant, en 2000, Anderson et Trueman distinguèrent *Varroa destructor* de *Varroa jacobsoni* sur des critères morphologiques et génétiques [22]. Il s'avère que seul *Varroa destructor* a colonisé l'abeille *Apis mellifera*. Dans cette étude était également mis en évidence l'existence de 18 haplotypes (varroas ayant des séquences d'ADN mitochondriales distinctes), dont six haplotypes membres de l'espèce *Varroa destructor*.

Deux haplotypes de *Varroa destructor* sont trouvés sur l'abeille européenne : l'haplotype Coréen (K) et le Japonais (J), dont les noms proviennent des îles où ils furent détectés initialement. L'haplotype K semble être celui majoritairement trouvé sur *Apis mellifera* à travers le monde [23]. Les publications d'avant 2000 et le changement de nomenclature faisaient référence à *Varroa jacobsoni*, mais il est donc à retenir qu'il s'agissait bien en réalité d'études portant sur *Varroa destructor*.

1.3 Cycles de développement

Ce paragraphe vise à expliquer la relation complexe qu'entretient le varroa avec son hôte. Après une courte introduction sur l'organisation de la colonie d'abeilles, nous verrons les cycles de développement des deux espèces. Dans un premier temps, nous aborderons les cycles de développement annuel de la colonie et de la population de varroa. Ensuite, nous nous focaliserons sur la reproduction sexuée du varroa, intimement liée à celle de l'abeille.

1.3.1 Organisation de la colonie d'abeilles

Une colonie d'abeilles est composée de trois castes : les ouvrières, la reine et les mâles (les faux-bourdons) (Figure 5). Si une seule reine est toujours observée dans la colonie, le nombre de faux-bourdons varie d'aucun à quelques milliers, et l'on peut compter de 10 000 à 60 000 ouvrières selon la saison. Dans nos régions tempérées, les abeilles ouvrières montrent une distribution bimodale de leur durée de vie. Elles peuvent être classées soit comme « abeilles d'été », à courte durée de vie, soit comme « abeilles d'hiver » avec une espérance de vie plus longue [24]. Les abeilles émergeant du printemps jusqu'à la mi-été ont en effet une espérance de vie de 25 à 35 jours environ, contre 6 à 8 mois pour les abeilles d'hiver.

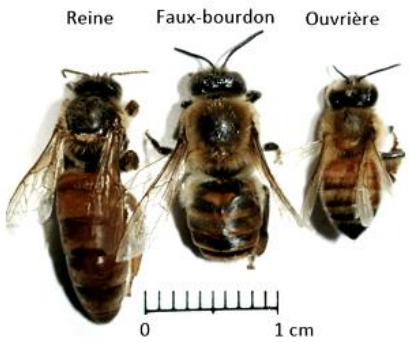


Figure 5. Les trois castes constituant la colonie d'abeille Apis mellifera. Source : ADA Ile-de-France (www.adaif.fr)

Au cours de l'année, la colonie présente une succession d'états de développement ; on parle de rythme annuel de développement ou de cycle biologique annuel [25]. Le cycle du varroa dépend entièrement de ce cycle annuel de la colonie, ainsi que du cycle de développement de l'abeille.

1.3.2 Cycle biologique annuel

1.3.2.1 Développement annuel de la colonie d'abeilles

Le cycle annuel de l'abeille peut être décrit précisément selon une série de paramètres comme le cycle de développement du couvain et de la population d'ouvrières ou encore les cycles de récoltes de nectar et de pollen. Il peut être ainsi découpé en cinq phases [25] :

1. Une phase hivernale qui s'étend approximativement de novembre à février. La flore n'offre pratiquement aucune ressource et la colonie vit sur les réserves accumulées.
2. Une phase prévernale pendant laquelle l'activité des abeilles est souvent limitée par des conditions météo défavorables. Pendant cette phase qui s'étend de mars à avril environ, la flore printanière (peuplier, saules, etc.) fournit du nectar et du pollen frais en abondance. Cet apport permet une intensification de l'élevage du couvain et les ouvrières deviennent de plus en plus abondantes.
3. Une phase vernale, correspond à la miellée de printemps (début mai- fin juin). La floraison, entre autres, des arbres fruitiers, du colza, du pissenlit permet une récolte très intense. Le couvain est à son apogée, énormément de jeunes abeilles naissent, permettant à la colonie de profiter des miellées mais aussi de donner des essaims. La fin de cette période se caractérise par un moment de disette relative appelé « trou de miellée », qui est plus ou moins prononcé selon les régions.

4. Une phase estivale, qui commence vers fin-juin, début-juillet, correspondant à la miellée d'été. La colonie entre dans une phase de régression : la ponte de la reine faiblit, le couvain et l'effectif global de la colonie tendent à diminuer, les mâles sont chassés. Les premières abeilles d'hiver font progressivement leur apparition lors de cette phase qui se termine vers fin juillet-début août.
5. Une phase estivo-automnale, marquée par la floraison du lierre. La flore n'offre plus que de maigres possibilités. Le couvain est très limité et l'essentiel de la population est constitué d'abeilles d'hiver.

Le cycle biologique annuel est caractéristique de la population locale d'abeilles [26] et dépend de l'environnement dans lequel évolue la colonie (climat, flore, cycle de récolte).

1.3.2.2 Développement de la population de varroas

Le cycle de développement du varroa, à l'échelle de la population, est dépendant de celui de la colonie. Pendant la période estivale, l'infestation par les varroas s'accroit en parallèle du couvain élevé par les abeilles. Le nombre de parasites présents dans la colonie en début de phase estivale reste un paramètre déterminant pour l'évolution du taux d'infestation au cours de la saison (Figure 6). Une étude portant sur 35 colonies suggère une augmentation d'un facteur 100 de la population de varroas en l'espace d'un été [27].

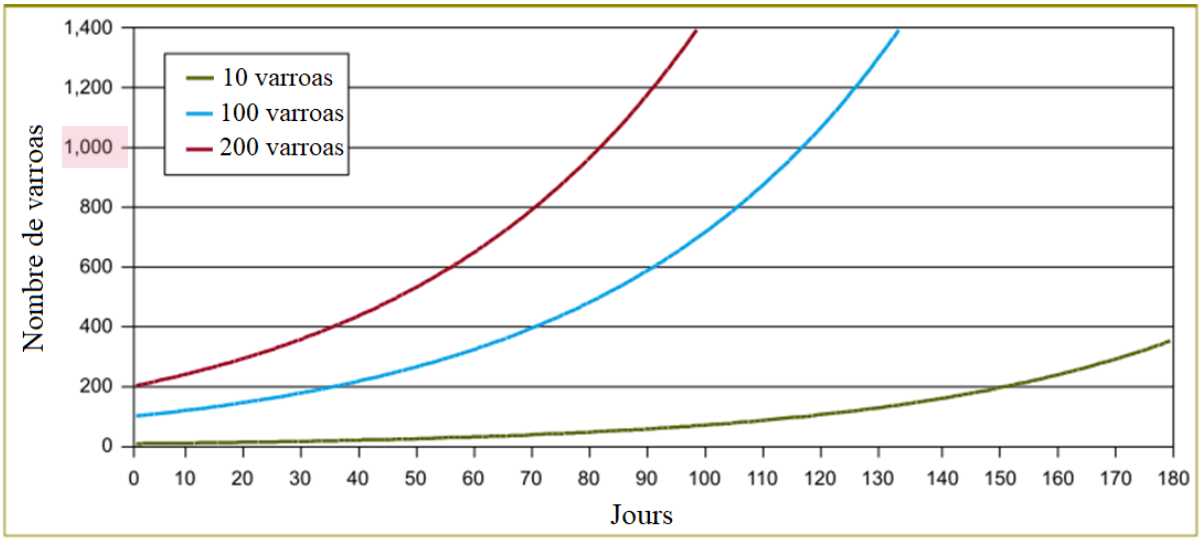


Figure 6. Augmentation du taux d'infestation par varroa sur 180 jours, en fonction du nombre initial de parasites dans la colonie. Seul un nombre faible de 10 varroas environ permet de rester sous le seuil critique de 1 000 varroas sur la période considérée. Issu de Managing varroa - The Food and Environment Research Agency (2015) [28].

Durant la saison hivernale en revanche, la réduction du couvain d'ouvrières et l'absence totale de couvain de faux-bourdons, voir l'arrêt total de la ponte, impactent largement la reproduction du varroa. Des observations au Royaume-Uni montrent une mortalité significativement plus importante des varroas mâles en hiver par rapport à la période estivale (42 % contre 18 % respectivement) [29,30]. Il s'ensuit que, dans du couvain d'ouvrière :

- seulement 34 % des fondatrices engendrent de jeunes femelles fécondées, contre 68 % en été,
- une baisse de moitié du nombre de varroas filles fécondées engendrées par chaque fondatrice est observée.

D'année en année la population de varroas augmente dans la colonie. Les modèles permettent de souligner qu'avec une population initiale théorique de 10 varroas, la population d'acariens reste relativement faible pendant les deux premières années. Dans la troisième année le taux d'infestation peut atteindre 4 000 varroas, et jusqu'à 10 000 dans la quatrième année [31]. Les facteurs qui semblent influencer le plus la croissance de la population du parasite sont la durée de la période de butinage et d'élevage du couvain [32]. La modélisation temporelle de la population de varroas [33] prédit notamment qu'un étalement de la période d'élevage du couvain (lié à un climat trop doux) implique une augmentation drastique de l'infestation.

Les traitements anti-varroas sont actuellement les seuls moyens suffisamment efficaces pour contrôler efficacement la charge parasitaire des colonies (voir § 1.5). La force du varroa s'explique entre autres par la parfaite synchronisation de son cycle de développement avec celui de l'abeille domestique.

1.3.3 Cycle de développement de l'abeille et du faux bourdon

On peut distinguer chez l'abeille la reproduction par essaimage et la reproduction sexuée. C'est ce second mode de reproduction qui permet d'accroitre la diversité génétique de la population.

1.3.3.1 Reproduction par essaimage

Lors de l'essaimage, la vieille reine quitte la colonie avec près de la moitié de la population d'ouvrières pour fonder une nouvelle colonie alors qu'une nouvelle reine est élevée au sein de la colonie mère. Certains facteurs, tels que l'âge de la reine et le manque d'espace lors de la miellée, stimulent l'essaimage.

1.3.3.2 Reproduction sexuée

La reproduction sexuée de l'abeille est dite polyandrique : la reine s'accouple avec plusieurs mâles [34]. Pendant les trois premiers jours de sa vie, la reine vierge ne peut pas voler. C'est vers son cinquième jour, et après quelques vols d'orientation, que la reine se rend sur une zone d'agrégation de mâles [35] afin de se faire féconder. Les reines peuvent effectuer plusieurs vols nuptiaux sur quelques jours successifs. Les faux-bourdons sont attirés vers la reine par un mélange de phéromones complexe tiré de la glande mandibulaire de la reine [36,37]. Des études tendent à montrer que la diversité génétique apportée par la polyandrie améliore la résistance de la colonie à des agents pathogènes [38]. Environ 80 à 90 % des reines réalisent leur vol nuptial avec succès, les échecs étant liés généralement aux conditions climatiques, à la prédation ou à des difficultés de la reine pour retrouver sa colonie [39]. Rentrée de son vol nuptial, la reine fécondée commence la ponte, jusqu'à 2 000 œufs par jour.

1.3.3.3 Développement du couvain

Le couvain, au sens strict, est l'ensemble des formes (œufs, larves et nymphes) prises par l'abeille avant son émergence en imago. Quelle que soit la caste, on observe toujours sept stades de développement pour le couvain : le stade œuf, cinq stades larvaires [40], et le stade nymphal. En revanche, la durée de développement du couvain varie suivant la caste. Les temps de développement depuis la ponte de l'œuf jusqu'à l'émergence sont de 16, 21 et 24 jours pour respectivement les reines, les ouvrières et les faux-bourdons (Figure 7) ; cependant des variations peuvent être observées sous l'influence de facteurs environnementaux, en particulier la chaleur et l'humidité.

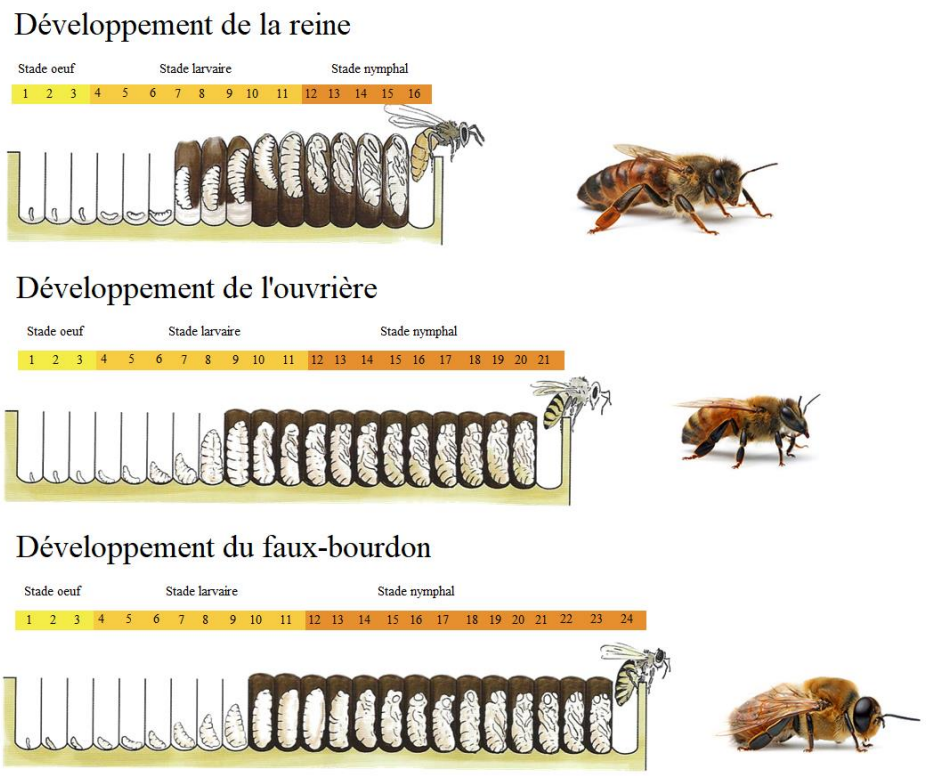


Figure 7. Développement, depuis la ponte de l'œuf jusqu'à l'émergence : de la reine, de l'ouvrière et du faux-bourdon d'Apis mellifera.

Le développement des jeunes abeilles est constitué d'une première phase pendant laquelle le couvain est ouvert. La deuxième phase, dite du couvain operculé, débute lors de l'operculation des alvéoles, soit 8 à 8,5 jours après la ponte pour les œufs d'ouvrières, 9 jours pour les œufs de faux-bourdons, 7 à 8 jours pour les reines. La larve est à cette période au cinquième stade de son développement. L'émergence de la jeune abeille se déroule entre 270 et 290 heures après l'operculation chez les ouvrières et vers 330 heures pour les faux-bourdons [41]. En comparaison, chez *Apis cerana*, le couvain reste operculé durant respectivement 265 et 338 heures. Un temps d'operculation du couvain prolongé est favorable au cycle de développement du varroa.

1.3.4 Cycle de développement du varroa

Après avoir quitté l'alvéole où elle est née, la femelle varroa adulte alterne successivement des phases de phorésie et de reproduction (Figure 8). Il semblerait que les femelles puissent vivre jusqu'à deux mois et demi en été [42].

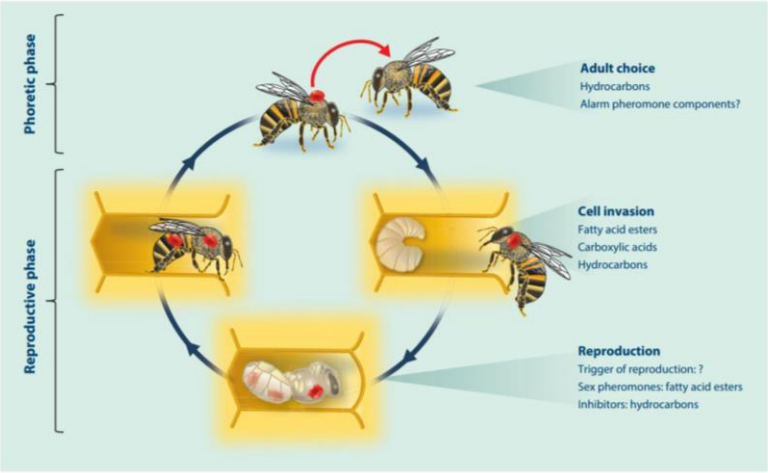


Figure 8. Le cycle de vie du varroa alterne phase de phorésie sur abeille adultes et phase de reproduction dans le couvain [43].

1.3.4.1 La phase de phorésie

Lors de la phase de phorésie, la femelle adulte varroa se nourrirait régulièrement par des ponctions d'hémolymphe sur l'hôte. Cependant le nourrissement durant cette phase a été récemment remis en cause [44]. Le parasite reste souvent caché entre deux sternites de l'abdomen des abeilles [43]. La phase de phorésie n'apparait pas cruciale pour le développement de la population du varroa, en dehors de son rôle dans la dissémination du parasite. En revanche une étude a montré une augmentation du nombre d'abeilles émergentes avec les ailes déformées quand la durée de phorésie de la fondatrice est plus longue [45]. En présence de couvain, la phase phorétique s'étend entre 4,5 et 11 jours [31].

Le cycle de reproduction du varroa et son ontogenèse se déroulent exclusivement dans les cellules operculées du couvain.

1.3.4.2 Processus d'infestation du couvain

La femelle varroa adulte, communément appelée « fondatrice » sort de sa phase phorétique et pénètre dans une cellule de couvain peu avant son operculation – environ 20 heures pour une cellule d'ouvrière, 40 heures pour une cellule de faux bourdon [46,47].

En conditions naturelles, une femelle entreprend entre 1,5 et 2 cycles de reproduction au cours de sa vie [48], voire entre 2 et 3 cycles [49]. Le nombre de cycles semble dépendant de facteurs tels que la disponibilité en couvain et le taux de succès de fécondation des femelles.

La fondatrice reste cachée dans la bouillie larvaire, sous la larve à l'abri des nourrices, jusqu'à l'operculation de la cellule.

Le couvain de mâles est infesté environ 8 fois plus que celui d'ouvrières [50,51], avec de très fortes variations individuelles. Le processus d'infestation semble se faire sous l'influence de substances chimiques issues de la cuticule des larves et attractives pour le varroa. L'hypothèse a été initiée par les travaux de Le Conte et collaborateurs [52], qui mettaient en évidence l'attirance des parasites par certains esters d'acides gras (notamment le methyl palmitate), retrouvés dans la cuticule des larves du cinquième stade. Ces résultats ont été confirmés par la suite [53], mais la nature des composés cuticulaires attirant le varroa reste encore sujet à discussion [54].

1.3.4.3 Ontogenèse

Que ce soit dans le couvain d'ouvrières ou de mâles, le premier œuf est pondu par la fondatrice environ 70 heures après l'operculation de l'alvéole [55,56]. Cet œuf qui contient un embryon haploïde, et uniquement lui, donnera un varroa mâle. Tous les autres descendants sont de jeunes femelles [30], avec un rythme de ponte d'un œuf toutes les 30 heures [55]. La fondatrice pond ainsi un total de cinq œufs par cycle.

Les jeunes varroas passent par deux stades immatures :

1. La protonymphe : d'abord mobile, elle devient immobile quelques heures avant une première mue.
2. La deutonymphe : d'abord mobile, elle devient immobile avant la mue imaginale qui l'amène au stade adulte sexuellement mature.

Les formes immatures mobiles se nourrissent d'hémolymphe prélevée sur la nymphe d'abeille. Pour cela, la fondatrice perce la cuticule de l'abeille lors de sa mue vers le stade nymphal, créant ainsi un « site de nourrissement » (voir Figure 9). Ce site est essentiel car le mâle et les jeunes femelles varroas ne sont pas capables de percer par eux même la cuticule pour se nourrir.

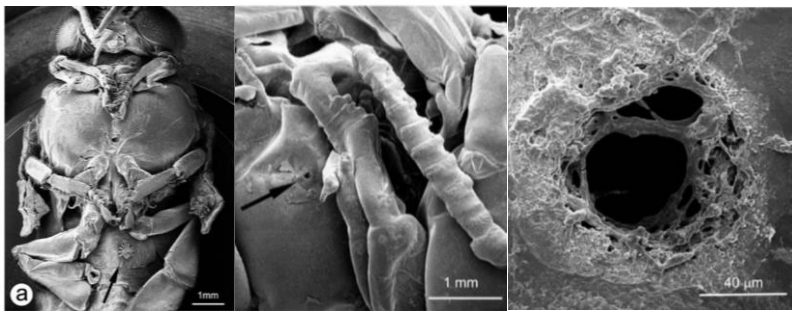


Figure 9. Le site de nourrissement permet aux jeunes femelles et aux mâles varroas de se nourrir [57].

1.3.4.4 Reproduction dans le couvain

Depuis la ponte, il faut compter 6,6 jours environ pour que le mâle soit adulte, et 5,8 jours pour obtenir une femelle varroa adulte [58] (voir Figure 10). Compte tenu de l'intervalle de ponte entre les deux premiers œufs, le mâle atteint l'âge adulte une vingtaine d'heures avant la première femelle. Le mâle attend donc que la première femelle achève sa mue imaginale pour s'accoupler avec elle ; le premier accouplement se déroule environ 230 heures post-operculation, dans le couvain d'ouvrières comme dans celui de faux-bourdons [59]. Tous les accouplements se déroulent à l'intérieur des alvéoles operculées de couvain, les mâles varroas réalisant tout leur cycle de vie à l'intérieur de l'alvéole. La reproduction du varroa est donc consanguine – entre le frère et ses sœurs - sauf en cas d'infestation d'une cellule de couvain par plusieurs fondatrices. Cette situation de co-infestation tend à augmenter avec la diminution du couvain en fin de saison [60]. La phase de reproduction est interrompue par l'émergence de l'abeille. Seules les femelles varroas adultes (générations parentale et fille) survivent dans la ruche, où elles parasitent les abeilles adultes ; les femelles encore immatures au moment de l'émergence, ainsi que les mâles sont voués à mourir rapidement [61].

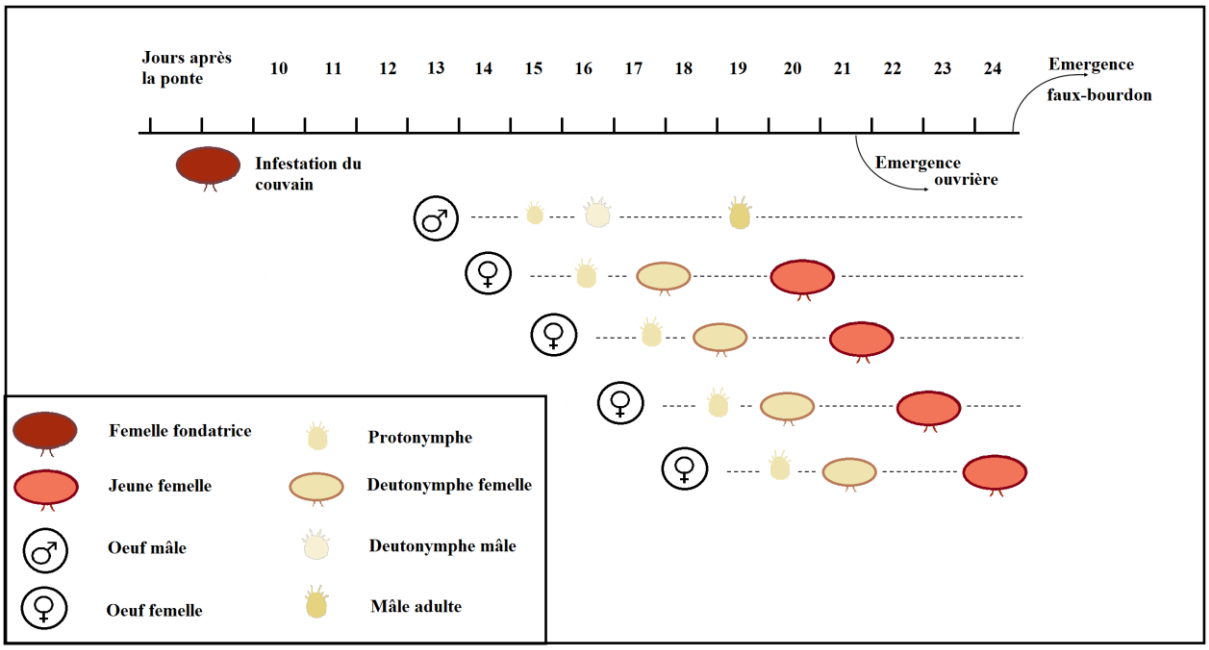


Figure 10. Cycle de reproduction du varroa dans le couvain [55].

Une nouvelle femelle varroa est produite à chaque cycle de reproduction se déroulant dans une cellule d'abeille ouvrière ; alors qu'une fondatrice effectuant son cycle dans du couvain de faux-bourdon produit en moyenne 2,9 jeunes femelles varroas [62].

1.4 Conséquences de l'infestation par varroa

L'infestation par varroa a de multiples conséquences négatives sur les abeilles et donc sur la santé de la colonie. La varroose, maladie associée au développement du varroa dans la colonie, est un sujet de préoccupation majeur des apiculteurs et des autorités sanitaires. Dans le Code rural et de la pêche maritime (CRPM), l'ordonnance 2011-862 du 22 juillet 2011 (www.legifrance.gouv.fr) a remplacé les notions de maladie animale réputée contagieuse et de maladie à déclaration obligatoire, par les notions de catégories de dangers sanitaires.

Le CRPM distingue ainsi trois catégories de dangerosité (article L201-1) appréhendées en termes vétérinaires (atteinte à la santé) et économiques (capacités de production) :

- Les dangers de première catégorie, dont les manifestations ont des conséquences graves et qui requièrent un encadrement réglementaire.

- Les dangers de deuxième catégorie, pour lesquels il peut être opportun de définir des mesures réglementaires ou de reconnaître officiellement l'action menée par certaines filières de production. Ces maladies sont à déclaration obligatoire mais n'entraînent pas l'application de mesures de police sanitaire.
- Les dangers de troisième catégorie, pour lesquels les mesures de prévention, de surveillance ou de lutte relèvent de l'initiative individuelle.

Chez l'abeille, l'infestation due à *Aethina tumida*, à *Tropilaelaps*, au parasite *Nosema ceranae* responsable de la nosémose, ainsi que la loque américaine, causée par la bactérie *Paenibacillus larvae*, appartiennent à la première catégorie. La varroose, et le frelon asiatique *Vespa velutina*, appartiennent à la liste des dangers sanitaires de deuxième catégorie.

1.4.1 Expression de la varroose à l'échelle de la colonie

L'expression des symptômes de la varroose n'est pas uniforme car dépendante de la charge en parasites dans la colonie [63].

En début d'infestation, les symptômes sont rares et peu évidents : seul un dépistage met en évidence la présence de l'acarien dans la colonie. En revanche, lorsque le niveau d'infestation s'accroit, des symptômes plus spécifiques apparaissent.

Vers la fin août, la pression sur la colonie se fait d'autant plus ressentir : la ponte de la reine tend à diminuer alors que la charge en parasites est à son maximum, avec de graves conséquences sur les abeilles d'hiver. Un couvain en mosaïque est observable, témoin de la forte mortalité des larves. La surface du couvain et le nombre d'abeilles des colonies diminuant, l'infestation relative des abeilles adultes augmente [64]. Il a été estimé que 2 000 - ou 3 600 - varroas dans la colonie en automne sont suffisants pour tuer une colonie de 30 000 et 40 000 abeilles respectivement [29].

Après la mort des colonies, on retrouve une symptomatologie caractéristique témoignant d'un lent dépeuplement de la colonie [65] :

- ruches retrouvées vides, avec très peu d'abeilles mortes devant et dans les ruches, notamment avec de petites grappes d'abeilles mortes sur le haut des cadres,
- fortes provisions de miel et de pain d'abeille.

La varroose traduit, à l'échelle de la colonie, les conséquences que peut avoir le parasite sur chacun des individus qui la constituent.

1.4.2 Conséquences du parasitisme à l'échelle individuelle

L'infestation par varroa a de multiples conséquences sur les individus de la colonie, avec notamment une réduction de l'espérance de vie des ouvrières et des effets sur leur système immunitaire. Le varroa est également un vecteur d'agents infectieux.

1.4.2.1 Réduction de l'espérance de vie

De manière générale, un taux d'infestation par varroa fort des colonies est associé à une réduction de l'espérance de vie des abeilles d'hiver comparativement à des colonies moins infestées [66]. Or la survie de la colonie dépend de la bonne santé et de l'espérance de vie des individus qui la composent.

Nous avons déjà mentionné la différence importante de durée de vie entre les ouvrières d'été et d'hiver, ainsi que la division du travail suivant un polyéthisme d'âge. Ces phénomènes sont gouvernés par des changements physiologiques, régulés en grande partie par la vitellogénine [67], mais aussi par d'autres facteurs tels que les niveaux de l'hormone juvénile et des amines biogéniques : dopamine, sérotonine et octopamine [68,69].

La vitellogénine est une glucolipoprotéine synthétisée au niveau du corps gras (analogue du foie des mammifères). Le taux de vitellogénine et de protéines totales atteint chez les abeilles est significativement plus faible quand le stade nymphal a subi le parasitisme de varroa [70]. La vitellogénine se trouve en grande quantité chez la reine, les nourrices et les abeilles d'hiver, et en faible quantité chez les butineuses [71]. On détecte également des traces de cette protéine dans l'hémolymphe des faux-bourdons [72]. Elle est impliquée dans la production de la nourriture larvaire et de la gelée [73] et dans l'organisation des tâches des ouvrières [73]. La vitellogénine sert également dans la protection contre le stress oxidatif [74,75] et est liée à la durée de vie des abeilles [71]. L'atteinte du taux de cette protéine peut donc avoir un effet négatif sur la longévité des abeilles, et des conséquences dramatiques sur la survie de la colonie, notamment lorsque cela concerne les abeilles d'hiver. La diminution du taux de cette protéine pourrait expliquer l'effet négatif du parasite sur la durée de vie des abeilles infestées.

La réduction de l'espérance de vie des abeilles peut être l'un des facteurs explicatifs de la sur-mortalité des colonies [76]. En effet, les ouvrières ayant une durée de vie écourtée, la population de la colonie diminue. Au-dessous d'un nombre critique d'abeilles, la colonie ne peut plus réguler sa température, et meurt malgré les réserves accumulées. Ce seuil a été mesuré entre 5 000 et 8 000 abeilles selon les conditions climatiques [77].

1.4.2.2 Altération des capacités cognitives

Chez des butineuses, l'infestation par varroa affecte l'apprentissage [78]. L'apprentissage peut être défini comme une modification du comportement de l'animal (ou de ses connaissances) qui résulte de l'exposition à l'environnement [79]. Chez l'abeille, l'apprentissage appétitif peut être étudié lors du déclenchement de la réponse de l'extension du proboscis avec une solution de saccharose (*proboscis extension response*, PER, [80]). Il a ainsi été montré que la réponse PER pouvait être conditionnée dans le cadre d'un protocole de conditionnement associatif (conditionnement pavlovien). Le protocole apporte des informations sur le potentiel des butineuses à remplir leur fonction et est utilisé comme mesure des capacités d'apprentissage et de mémoire chez l'abeille.

Une étude montre l'influence du varroa sur la durée de vol et la capacité de retour au nid des butineuses [81]. Le dénombrement des abeilles sortant et retournant à la colonie montre une perte en butineuses deux fois plus importante lorsque le taux d'infestation par varroa varie d'un facteur huit. Ce phénomène peut être mis en lien avec le dépeuplement des colonies exprimant des signes de varroose. Dans cette même étude, des ouvrières infestées et non infestées ont été relâchées à quelque distance de la colonie pour mesurer l'heure du retour à la ruche. Les ouvrières infestées mettaient 2,3 fois plus de temps pour rentrer à la colonie et la proportion d'abeilles infestées qui ne rentraient pas le soir était 1,5 fois plus élevée. Lors d'un test d'orientation visuelle, les abeilles infestées ont été moins bien notées pour leur précision à trouver l'entrée de la colonie. Les auteurs évoquent deux hypothèses expliquant ces phénomènes :

1. Le développement d'un comportement d'adaptation des abeilles pour éliminer les parasites.
2. Un changement de comportement en faveur de la dispersion du parasite.

1.4.2.3 Effet immunopathogène de *Varroa destructor*

Le varroa a un effet sur l'immunité de l'abeille. Les insectes sont dotés d'une immunité innée bien développée, ainsi que d'une immunité acquise, pour se défendre contre les organismes pathogènes. L'immunité innée est subdivisée en deux réponses : humorale et cellulaire, qui entretiennent entre elles de fortes interactions.

1. L'immunité humorale correspond à l'activation de cascades protéolytiques (coagulation et mélanisation) dont les éléments centraux sont la phénol-oxydase et la synthèse d'une batterie de peptides antimicrobiens par le corps gras [81–84].
2. L'immunité cellulaire se rapporte aux réponses telles que la phagocytose et l'encapsulation (isolement du pathogène dans une capsule mélanique) mise en œuvre par les cellules sanguines, ou hémocytes [85,86].

Le système immunitaire varie selon le stade des ouvrières (stades larvaire, nymphale, nourrice et butineuse), avec globalement un système qui se renforce avec l'âge des abeilles [87].

L'infestation par varroa est associée à une baisse du nombre total d'hémocytes chez les nourrices [88], ainsi que pour tous les stades de vie des faux-bourdons [89]. À l'échelle de l'expression des gènes, l'infestation implique une moindre expression du gène codant pour la phénol-oxydase et de gènes codant pour des peptides antimicrobiens [90]. La réduction du corps gras a également été observée [91] ; toutes ces données suggèrent une baisse globale de l'immunocompétence des abeilles infestées.

1.4.2.4 Un vecteur d'agents infectieux pour l'abeille

Le parasite pourrait être un vecteur pour *Aspergillus flavus*, agent responsable de l'aspergillomycose (maladie du « couvain pétrifié ») [92]. Des auteurs tendent à montrer que le varroa peut également être un vecteur de bactéries pathogènes ou non [93].

Il existe actuellement 24 virus identifiés chez l'abeille. Certains sont cependant assez proches pour les considérer comme appartenant à la même espèce. Cela réduit à 18 le nombre réel de virus affectant l'abeille. À une exception près, tous les virus de l'abeille *Apis mellifera* identifiés à ce jour sont des petits virus à acide ribonucléique (ARN) simple brin positif, qui seront directement traduits une fois dans la cellule. Les virus peuvent se transmettre entre abeilles, par exemple via une nourriture contaminée (pollen, nourriture larvaire et gelée royale) [94] ou par les fèces [95]. Une transmission verticale, de la reine vers les œufs, semble également possible [96]. Mais surtout, en changeant d'hôte et en se nourrissant régulièrement de l'hémolymphe des abeilles, le varroa agit comme un vecteur pour huit virus de l'abeille (Tableau 1). De par son action immunosupressive, le varroa pourrait également faciliter la réplication des virus au sein de abeilles [97]. Plusieurs maladies virales sont ainsi associées à l'infestation par varroa, celles liées aux virus ABPV et DWV étant fortement pathogènes pour l'abeille.

Tableau 1. Maladies virales associées à Varroa destructor ainsi que les principaux symptômes associés et le mode de transmission de ces virus [98,99].

VIRUS	SYMPTÔMES	TRANSMISSION
Virus de la paralysie aiguë *Acute Bee Paralysis Virus* (ABPV)	Symptômes de paralysie précoce, mortalités précoces	Verticale Alimentaire
Virus de la paralysie chronique *Chronic Bee Paralysis Virus* (CBPV)	Entraîne des mortalités, parfois importantes, d'ouvrières dépilées et noires avec des symptômes de tremblements	Verticale Fécale
Virus du couvain sacciforme *SacBrood virus* (SBV)	Mortalités de larve en forme de sac	Verticale Horizontale Alimentaire
Virus du cashmire de l'abeille *Kashmir Bee Virus* (KBV)	Mortalité très rapide sans symptôme	Verticale Horizontale Fécale
Virus des ailes deformees *Deformed Wing Virus* (DWV)	Mortalité d'ouvrières et déformations des ailes d'abeilles naissantes (Figure 11)	Verticale Horizontale Alimentaire
Virus des cellules noires de reine *Black Queen Cell Virus* (BQCV)	Entraînerait des mortalités de larves de reine	Verticale
Virus de la paralysie lente *Slow Paralysis Virus* (SPV)	Symptômes de paralysie tardive, suivi de mortalité	
Virus des ailes nuageuses *Cloudy Wing Virus* (CWV)	Pas de symptôme précis	

Les virus à ARN sont caractérisés par un fort taux de réplication et de mutation [100]. Cette variabilité génétique entraîne l'apparition d'une collection de mutants non identiques mais génétiquement liés, les quasi-espèces [101]. La quasi-espèce désigne une population de variants viraux présente chez un individu ou dans un environnement donné à un instant *t* [102].

Les DWV (*Iflaviridae: Iflavirus*) sont des virus à ARN proche des picornavirus [103]. Selon l'International Committee on Taxonomy of Viruses il existe deux types de DWV. De plus, des variants recombinants ont été observés chez l'abeilles et le varroa [104,105] et un type C a été mis en évidence [106]. L'arrivée et la propagation du varroa sur l'ensemble des îles hawaiiennes à partir

de 2007 a permis de suivre les changements de l'environnement viral des abeilles [107]. Les différents variants du DWV étaient probablement présents chez les abeilles de ces îles : dans les zones encore indemnes de varroa, le virus était détecté dans environ 10 % des colonies. En revanche le virus était détecté dans 75 à 100 % des colonies situées dans les zones infestées. Les auteurs ont également constaté une charge virale par abeille un million de fois supérieure quand le parasite est présent, ainsi qu'une décroissance temporelle de la diversité en variants. Cette sélection de variants liée au parasitisme pourrait jouer un rôle important dans la physiopathologie de l'infection. En effet, si le DWV est un ensemble de quasi-espèces, la virulence des différents types ne semble pas équivalente[108]. Le virus peut causer la déformation des ailes des ouvrières (Figure 12) ainsi qu'une réduction de l'immunocompétence humorale et cellulaire de l'abeille [109].

Figure 11. Illustration d'une abeille ouvrière adulte aux ailes déformées (à gauche), caractéristique de l'expression du virus des ailes déformées. Un varroa est visible sur son thorax. En comparaison, une abeille aux ailes normales (à droite). Photographies personnelles.

L'expression du Virus de la paralysie chronique (CBPV) peut affecter les abeilles adultes de deux manières. Le premier type inclus des tremblement anormaux des ailes et du corps des abeilles affectées, qui sont en général incapables de voler et trouvées rampantes à proximité de la colonie. Le second type est associé au nom de maladie noire (*black robbers* ou *hairless black syndrome*). Les abeilles perdent en effet leurs poils et apparaissent de couleur noire ; elles sont attaquées par leurs congénères qui les prennent pour des pilleuses, puis perdent leur capacité de vol et meurent en quelques jours [110]. Le CBPV a été détecté chez le varroa en 2008, et est

capable de se répliquer dans le parasite [111]. Le rôle du varroa comme vecteur de ce virus n'est cependant pas clairement démontré actuellement.

Les virus ABPV, KBV ainsi que l'*Israel acute paralysis virus* (IAPV) sont maintenant reconnu comme appartenant à un même complexe de la famille des Dicistroviridae [112]. L'ABPV et le KBV présentent 70 % de similarités sur l'ensemble de leurs génomes.
L'ABPV (GenBank: AF150629.1) a été découvert dans des colonies et dans des abeilles sans symptômes apparents en 1963 en Angleterre, avant l'arrivée du varroa ; lors d'une injection de virus, les abeilles présentent des tremblements similaires à ceux exprimés avec le CBPV mais la mortalité survient plus rapidement [113]. Le lien entre le varroa et l'ABPV a été montré en comparant les mortalités de colonies en Allemagne, où le varroa était déjà répandu, et en Angleterre avant la colonisation par le varroa [114]. Lors de faibles taux d'infestation par varroa en Allemagne, les colonies présentaient des incidences en virus similaires à ceux d'Angleterre. En revanche, le virus ABPV devenait la principale cause de mortalité des colonies allemandes lorsque la pression en varroa augmentait. Un an plus tard, une étude en laboratoire montrait la capacité du varroa à transmettre le virus à pupes saines [115], montrant ainsi l'action vectrice du parasite.
Le KBV (GenBank: AY275710.1) est commun des colonies d'apparence saine. Des tests d'injection du KBV dans des pupes et abeilles adultes semblent indiquer que ce virus est parmi les plus virulent pour l'abeille domestique [116]. La présence de ce virus dans les sécrétions salivaires de varroa suggère le rôle de vecteur du parasite [94].

1.5 Moyens de lutte contre *Varroa destructor*

Selon la FAO, la lutte intégrée est définie comme étant un « système de lutte aménagée qui, compte tenu du milieu particulier et de la dynamique des populations des espèces considérées, utilise toutes les techniques et méthodes appropriées de façon aussi compatible que possible en vue de maintenir les populations d'organismes nuisibles à des niveaux où ils ne causent pas de dommages économiques ». Au sein de l'Union Européenne, la lutte intégrée est définie par la directive communautaire 91/414/CEE comme « l'application rationnelle d'une combinaison de mesures biologiques, biotechnologiques, chimiques, physiques, culturales ou intéressant la sélection des végétaux, dans laquelle l'emploi de produits phytopharmaceutiques est limité au strict nécessaire pour maintenir la présence des organismes nuisibles en dessous de seuil à partir duquel apparaissent des dommages ou une perte économiquement inacceptables ». La lutte

intégrée prend donc en compte la balance entre le coût et le bénéfice pour le producteur, la société et l'environnement lors des choix pour la lutte contre un nuisible [117]. Selon les auteurs Eguaras et Ruffinengo [118,119] la lutte intégrée contre le varroa passe par quatre points principaux :

1. Évaluer l'infestation dans les colonies.
2. Réduire de la croissance de la population par des méthodes biotechniques.
3. Contrôler l'infestation, par des traitements acaricides sans risque écotoxicologique.
4. Rechercher des d'abeilles tolérantes au parasite.

1.5.1 Évaluer l'infestation par varroa

La surveillance régulière de la population de varroas est une mesure essentielle : elle permet de déceler une éventuelle augmentation de la population de parasites et le cas échéant de mettre en œuvre les mesures de luttes nécessaires. Une étude canadienne [120] recommande un traitement lorsque :

- La densité moyenne de varroas destructor dépasse 0,02 acarien par abeille (2 acariens pour 100 abeilles) au printemps afin d'empêcher les pertes de production de miel.
- La densité d'acariens dépasse 0,04 acarien par abeille (4 acariens pour 100 abeilles) entre la fin d'août et le début de septembre pour éviter la perte de colonies en automne ou en hiver.

Le diagnostic quantitatif du nombre de varroas peut être fait par plusieurs méthodes.

La méthode des langes correspond au comptage des varroas tombés naturellement au fond de la ruche pendant un laps de temps donné. Un plateau recouvert d'un tissu graissé, ou bien d'une feuille collante, est glissé sous la ruche. L'usage de pièges pour empêcher les fourmis d'accéder au plateau est nécessaire pour éviter un comptage biaisé de la chute en varroas [121]. Dans ce but, les ruches peuvent être installées sur des pieds métalliques enduits d'un collier de glue semblable à ceux utilisés pour les arbres fruitiers. La méthode présente l'avantage de ne pas perturber la colonie mais nécessite un suivi sur plusieurs jours. En effet le nombre de varroas qui chute est variable selon les jours, il est donc recommandé de suivre la chute naturelle sur au moins sept jours. Les varroas sont dénombrés afin de calculer un taux quotidien de chute naturelle. L'outil VarEval [122] propose un canevas afin de simplifier l'étape du comptage, et

d'améliorer la reproductibilité des observations entre les colonies. Le seuil dommageable pour la colonie est généralement fixé à 30 varroas par jour, voire moins selon la saison [123]. La chute naturelle peut être un estimateur de la population globale de varroas dans la colonie. La population de varroas peut être estimée en multipliant la chute naturelle quotidienne par 250 à 500 ou par 20 à 40 pour des comptages réalisés en absence ou présence de couvains respectivement [62]. Selon l'Animal and Plant Health Agency, un traitement varroacide est recommandé dès que l'estimation indique 1000 varroas dans la colonie. La corrélation entre la chute naturelle et la population globale reste cependant une estimation dépendante de la région d'implantation des colonies [124].

Une autre méthode consiste à estimer le taux d'infestation du couvain de mâle operculé. Un minimum de 100 cellules de mâles sont désoperculées et examinées afin de déterminer le pourcentage de cellules infestées [125]. Un taux d'infestation de 15% a été signalé comme la limite indiquant qu'un traitement est nécessaire pour la colonie [32].

Il est également possible d'évaluer l'infestation en varroas phorétiques. L'Association de Développement de l'Apiculture en Aquitaine (ADAPI) propose le calcul suivant pour déterminer le nombre de varroas phorétiques :

$$V_{phorétiques}/\ 100\ abeilles = 0{,}14\ \times\ 100\ \times \frac{V}{P}\ \times\ C_c$$

Avec V : nombre de varroas dans l'échantillon
P : poids de l'échantillon
0,14 : poids d'une abeille
Cc : coefficient de correction, fonction de la méthode d'échantillonnage utilisée

Il existe trois méthodes d'échantillonnage des varroas phorétiques. La méthode de lavage au CO_2, de lavage au sucre glace et de lavage au détergent. Cette dernière montre une efficacité de 100 % : tous les varroas phorétiques sont comptés, et le calcul du nombre de varroas phorétiques ne nécessite pas d'utiliser un facteur de correction Cc. Les méthodes au CO_2 et au sucre glace ont des efficacités de 73 et 92 % respectivement. On applique donc des C_c de 1,4 pour la méthode du CO_2 et de 1,1 pour le sucre glace. L'ADAPI donnait en 2014 comme seuils critiques à ne pas dépasser : 1 varroa phorétique pour 100 abeilles au printemps et 2 varroas en automne après les traitements varroacides.

Pour éviter la contamination du miel, et selon les contraintes climatiques, les traitements anti-varroas ne sont applicables que sur certaines *fenêtres* de périodes assez limitées : en tout début de saison avant la pose des hausses, en fin de saison après la récolte de miel, et éventuellement

en hiver quand le couvain est absent. L'évaluation du taux d'infestation a pour objectif d'indiquer si un traitement doit être appliqué ou si l'apiculteur peut attendre la prochaine fenêtre. Mais le taux d'infestation limite que peut supporter une colonie reste une donnée complexe, dépendante de nombreux facteurs comme la durée de présence de couvain, la qualité des ressources alimentaires, la région géographique où se trouve le rucher, l'exposition à d'autres parasites ou maladies ainsi que le comportement hygiénique des abeilles [126].

1.5.2 Lutte par l'emploi de traitements acaricides

D'un point de vue général, les acaricides présentent différents modes d'action et cibles pharmacologiques : action sur le système nerveux et musculaire (acétylcholinestérase, récepteurs nicotiniques, récepteurs à l'octopamine, canaux sodiques…), action sur la chaine respiratoire (ATP synthase, transport d'électron), action sur la croissance et le développement des acariens (synthèse lipidique, synthèse de la chitine...). Leur emploi est très généralisé car certaines de ces molécules présentent une très bonne efficacité. La mise au point de formulation avec une autorisation de mise sur le marché (AMM) permet la bonne gestion des doses appliquées à chaque ruche et vise à simplifier le travail de l'apiculteur. En revanche l'introduction d'un composé chimique dans une colonie peut potentiellement diminuer la durée de vie des abeilles, atteindre leur système immunitaire et compromettre la croissance de la colonie déjà affectée par le parasite [127]. L'apparition de résistance vis-à-vis des traitements est également une limite rencontrée lors de l'usage répété d'une même molécule.

1.5.2.1 Molécules de synthèses à usage varroacide

L'amitraze a été commercialisée en 1974. Utilisée auparavant pour le traitement des arbres fruitiers, en particulier du psylle du poirier, elle n'est plus autorisée en agriculture depuis 2005. L'amitraze est, par contre, toujours trouvée dans des médicaments vétérinaires antiparasitaires pour les animaux domestiques ; c'est également la molécule active des médicaments à usage varroacide Apivar® et Apitraz®. L'amitraze est une molécule volatile liposoluble, agoniste des récepteurs à l'octopamine, appartenant à la famille des formamidines [128,129]. Les formamidines semble aussi agir sur la monoamine oxygénase de la tique *Boophilus microplus* [130] et possèder des propriétés α-2-adrénergiques chez les mammifères [131,132]. Le mode d'action de l'amitraze chez les acariens n'est en fait pas précisément décrit, mais le plus probable est que l'amitraze soit un agoniste des récepteurs à l'octopamine [133,134]. La dose létale causant 50 % de mortalité des abeilles (DL_{50}) par contact de l'amitraze est de 50 µg par abeille [135]. Dans le miel, l'amitraze est dégradée complètement après 3 à 4 semaines en plusieurs métabolites : le DMPF, le DMF

puis en DMA (Figure 12). Il semblerait que le DMPF suive le même mode d'action que l'amitraze [136].

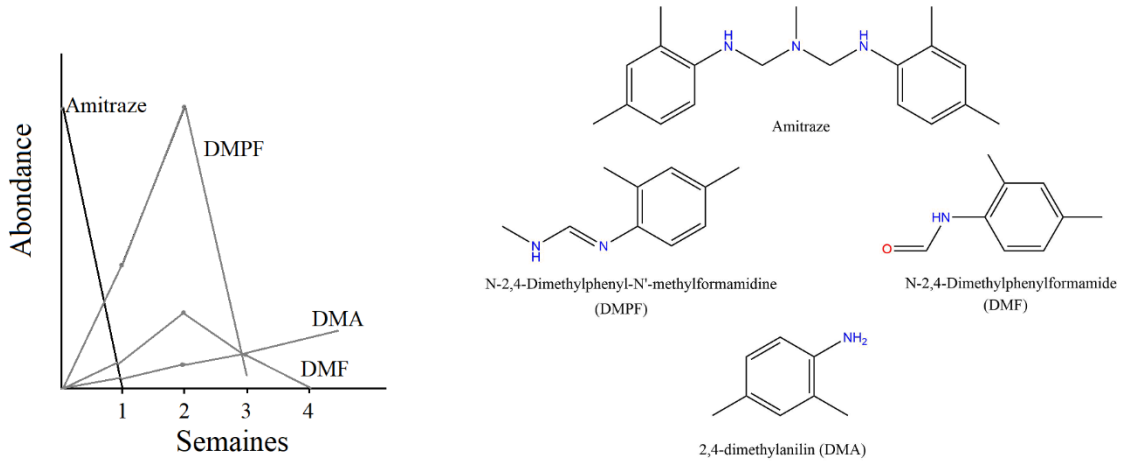


Figure 12. Profil de dégradation de l'amitraze dans le miel pendant quatre semaines [137].

L'amitraze n'est pas détectée dans les cires après traitement pendant 10 semaines avec deux lanières du médicament Apivar® [138]. En revanche les produits de dégradation DMPF, et dans une moindre mesure le DMA, peuvent être détectés dans des échantillons de cire et les corps abeilles [139]. L'exposition aiguë par voie topique à l'amitraze n'entraîne pas de changement pour l'acquisition du conditionnement du PER, ni de variation significative du niveau d'octopamine dans l'hémolymphe des abeilles [140]. La molécule ne semble donc pas affecter la capacité d'apprentissage et la mémoire à court terme des abeilles. De plus, il n'y a pas d'effet significatif de l'amitraze sur l'expression du gène lié à la synthèse de la vitellogénine [127], protéine dont nous avons déjà évoqué l'importance vis-à-vis de la durée de vie des abeilles.

Le tau-fluvalinate (*N*-[2-Chloro-4-(trifluoromethyl)phenyl]-D-valine(RS)- cyano(3-phenoxy-phenyl)methyl ester) de la famille des pyréthrinoïdes (Figure 13), est utilisé comme insecticide et acaricide. Il est employé contre la varroose depuis 1988. La fluméthrine (e.g Bayvarol®) et l'acrinathrine (e.g Gabon PA 92® utilisé en Slovaquie) sont deux autres pyréthrinoïdes de synthèse parfois utilisés contre le varroa (Figure 13). Les pyréthrinoïdes sont des composés neurotoxiques agissant sur les canaux sodium voltage-dépendants [141,142], des protéines membranaires dont le rôle est primordial dans la propagation du signal nerveux. Ce sont des analogues synthétiques des pyréthrines trouvées naturellement dans les fleurs de *Tanacetum*, anciennement *Chrysanthemum spp*. La DL_{50} orale du tau-fluvalinate est de 12,6 µg par abeille

et la DL_{50} par contact de 12,0 µg par abeille (www.agritox.anses.fr), mais sa toxicité semble augmenter en présence d'autres acaricides ou de l'oxytétracycline [143], un antibiotique à large spectre parfois utilisé pour la lutte contre les loques (maladies du couvain). La tolérance de l'abeille au tau-fluvalinate semble permise par le système de détoxification des cytochromes P450 [144]. Le tau-fluvalinate est un contaminant fréquent des cires [145] du fait de sa liposolubilité (logP : 7,02 à pH=7). Il est stable durant au minimum 8 mois dans du miel stocké dans des conditions de température similaires au stockage au sein d'une colonie, et n'est pas altéré lorsque le miel est monté à 80°C pendant 15 minutes [146]. Il n'existe cependant pas de limite maximale de résidus (LMR) dans le miel. Ce composé peut également être retrouvé dans le corps des abeilles [139]. Le tau-fluvalinate détecté dans les ruchers peut être d'origine apicole ou agricole [147]. Lors de tests en ruches, le tau-fluvalinate ne semble pas avoir d'effet notable sur la santé et le développement des reines [148].

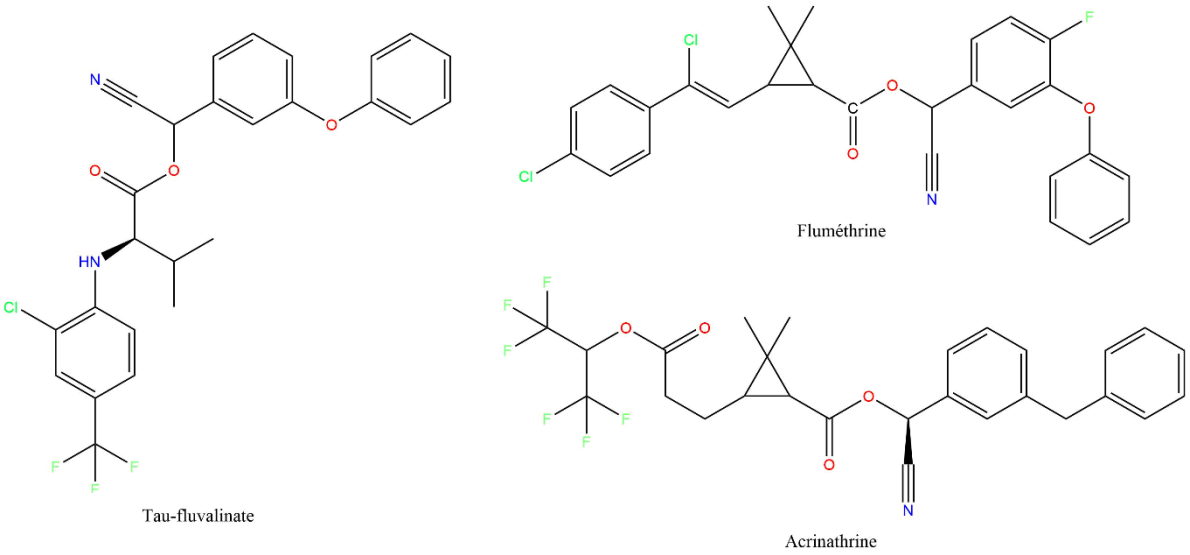


Figure 13. Structures du tau-fluvalinate, de la fluméthrine et de l'acrinathrine.

Le coumaphos appartient à la famille des organophosphates, il agit donc comme inhibiteur de l'acétylcholinestérase [149]. Il est la molécule active du médicament ChekMite+® (non autorisé en France). La détoxification du coumaphos nécessite l'intervention des cytochromes P450 [150], mécanisme également mentionné comme intervenant dans la détoxification du tau-fluvalinate. Cela pourrait expliquer la synergie de toxicité entre les deux molécules chez l'abeille [151].
Du fait de sa liposolubilité (logP = 4,1), le coumaphos tend à s'accumuler dans les différentes matrices de la ruche, notamment les cires et le miel. La concentration moyenne de coumaphos

en France atteignait 38 µg.g^{-1} de miel entre 2002 et 2005 [152] ; les auteurs présumaient l'emploi par certains apiculteurs de préparation de coumaphos hors prescription. Selon l'Agence européenne des médicaments EMA, la LMR du coumaphos dans le miel est de 100 µg.kg^{-1}, donc la commercialisation du miel contaminé ne semble pas devoir être remise en cause. Une étude portant sur les résidus dans le miel après un traitement avec les lanières CheckMite+ montre que les doses retrouvées respectent cette norme [153].

Le coumaphos est un contaminant quasi ubiquiste des cires en Amérique du Nord, où il est utilisé comme varroacide, avec en moyenne 33,6 mg.kg^{-1} détecté dans les cires des colonies, et jusqu'à 14,3 mg.kg^{-1} dans les cires neuves [139]. Se pose alors la question des effets de ces résidus sur la santé des colonies. Par contact, la DL_{50} sur 24 heures du coumaphos est de 20,3 µg par abeille [151]. L'exposition unique par voie thoracique à des doses sublétales de coumaphos n'affecte pas l'acquisition du réflexe PER et ne modifie pas les taux d'AChE mesurés dans le cerveau des abeilles [154]. En revanche, un effet négatif du coumaphos sur l'expression du gène lié à la synthèse de vitellogénine a été constaté [127]. Tout comme pour le tau-fluvalinate, une étude a montré l'effet négatif du coumaphos sur la santé des reines [148]. Une étude a en effet souligné que la présence de coumaphos dans la cire, à hauteur de 100 mg.kg^{-1}, peut aboutir à l'échec de l'élevage de nouvelles reines au sein des colonies [155].

L'hydrochlorure de cymiazole (N-(2,4-dimethylphenyl)-3-methyl-1,3-thiazol-2-imine) est un acaricide de la famille des formamidines, tout comme l'amitraze [156]. C'est la molécule active du traitement Apitol®, utilisé dans les colonies par dégouttement. La LMR du cymiazole est de 1 mg.kg^{-1} de miel. Étant soluble dans l'eau, la molécule peut être trouvée dans le miel à hauteur de 0,1 mg.kg^{-1} [157].

Le pyrazole fenpyroximate est la molécule active du produit commercial Hivastan® (non autorisé en France). C'est un acaricide et insecticide qui agit comme inhibiteur du complexe I (ou NADH-Coenzyme Q oxydoréductase) de la chaîne respiratoire mitochondriale [158], qui permet l'oxydation du NADH produit par le cycle de Krebs et la glycolyse, la génération d'un gradient de proton, pour permettre *in fine* la synthèse d'ATP. La chaîne respiratoire correspond à une association de cinq complexes protéiques présents au sein de la membrane interne de la mitochondrie. Le complexe I oxyde le NADH en NAD+, réduit le coenzyme Q en coenzyme QH2 et pompe des protons de la matrice vers l'espace intermembranaire. L'inhibition du complexe I ralentit l'utilisation par ce complexe du NADH, donneur d'hydrogène, et du coenzyme Q, receveur d'hydrogène. Il s'ensuit un ralentissement de la respiration, et un arrêt de la synthèse de l'ATP à partir de l'ADP et du phosphate. Aux États-Unis il fait partie depuis

2007 de la Section 18 de la *Federal Insecticide, Fungicide, and Rodenticide Act* (FIFRA), permettant à l'US.EPA d'autoriser, pour un État, l'usage ponctuel lors de situations d'urgences de médicaments non enregistrés.

Le bromopropylate (isopropyl 4,4'-dibromobenzilate) a été utilisé dans les débuts de la lutte contre le varroa (commercialisé en fumigation sous le nom de Folbex VA) (Ritter and Perschil 1983), en parallèle d'un usage agricole. Selon l'Insecticide Resistance Action Committee (IRAC), le mode d'action du bromopropylate n'est pas clairement caractérisé [159] ; www.irac-online.org/, mars 2017). Des hypothèses suggèrent une action que ce composé, analogue du DDT, pourrait avoir un effet sur les canaux sodium [160]. Son usage comme pesticide et médicament vétérinaire apicole est interdit en Europe depuis 2007 (Commission Directive 2004/59/EC). Des auteurs rapportent cependant que le bromopropilate était encore détecté en 2015 dans les cires de Belgique entre 10 et 90 $\mu g.kg^{-1}$ [161].

Un mélange de tetrafidon et de malathion (famille des diphényle et organophosphoré respectivement) a été proposé au début de la lutte contre le varroa sous les noms d'Apiakaridim et Danikoroper [162]. En revanche des résistances à ces traitements sont apparues très tôt [163].

1.5.2.2 Molécules biologiques

Les composants d'huiles essentielles

En 1999, Imdorf et collaborateurs [164] ont testé plus de 150 huiles essentielles par criblage en laboratoire et *in situ* afin d'évaluer leur toxicité, répulsivité, attractivité, ainsi que leurs effets sur la reproduction du varroa. Parmi tous les composants testés, le thymol a eu le meilleur résultat en apiculture pratique.

Le thymol (5-méthyl-2-(propan-2-yl)-phénol) est une molécule lipophile (pKa : 10,6) de la famille des monoterpènes. Il a été testé comme varroacide administré en poudre en différentes quantités et intervalles d'application [164], absorbé sur un support neutre comme la vermiculite (Apilife Var®) [165] , ou inclus dans un gel (Apiguard®) [166]. En plus de son action acaricide, l'ingestion au laboratoire de sirop sucré ou du candy contenant $0,1 mg.g^{-1}$ de thymol semble freiner le développement de *Nosema ceranae* dans le tube digestif des abeilles [167]. Chez les insectes, le thymol se fixe à la fois sur le récepteur de l'Acide γ-AminoButyrique (GABA) de type RDL [168,169], sur le récepteur de la tyramine [170] et sur les canaux cationniques Transient

Receptor Potential (TRP) [171]. Le thymol agit par sublimation et impacte les varroas phorétiques lorsque la température à l'extérieur de la ruche est optimale [165,172]. En dessous de 15 °C, il n'y a pas assez de vapeurs et le traitement est inefficace, et au-dessus de 30 °C ou 40 °C, il y a un risque de perturbation de la colonie et de mortalité du couvain et des abeilles. L'efficacité du traitement peut être améliorée de 20 % par une pratique d'encagement de la reine [173]. La DL_{50} du thymol est de 210,3 µg par abeille [174], ce qui en fait une molécule peu toxique lors d'un test de toxicité aiguë. Aucune LMR de thymol n'est définie par la réglementation. Le thymol est donc intéressant dans la lutte contre varroa, cependant il n'est pas sans effet sur l'abeille. L'exposition pendant 30 jours au traitement Apiguard® a un effet répressif significatif sur l'expression du gène lié à la synthèse de vitellogénine [127], suggérant un effet sur la durée de vie des abeilles. De plus, bien qu'aucune mortalité des abeilles adultes n'ait pu être remarqué, un effet négatif du thymol sur le développement des colonies a été observé [175], avec une surface de couvain moindre chez des colonies traitées à Apilife Var® ou à Apiguard®. L'exposition en laboratoire à des concentrations sublétales de 100 ng de thymol par abeille, ainsi que l'utilisation du traitement Apilife Var® perturbe le phototactisme des abeilles [176]. Des concentrations similaires n'entraînent pas d'effet sur l'expression du gène *Rdl* (codant pour le récepteur GABA), augmente celle du gène *trpl* (codant pour les canaux TRP) et diminue celle du gène *Amoa1* (codant pour un récepteur à l'octopamine) ce qui pourrait influencer à long terme les capacités de mémoire des ouvrières et donc leur performance au butinage [177]. Un premier report de résistance du varroa au thymol a été mentionné en 2015 [178].

Les acides organiques

L'acide formique, l'acide oxalique, et de façon plus marginale, les acides lactique et acétiques, sont utilisés pour lutter contre varroa. Ces substances sont présentes de manière naturelle dans le miel [179]. Selon la réglementation, aucune LMR n'est requise pour ces composés.

Encore appelé acide méthanoïque, **l'acide formique** (Figure 14) est secrété notamment par la fourmi et l'ortie. La première évocation de cet acide comme traitement anti-varroa est contemporaine de l'arrivée du varroa en Europe (Althen, 1979). C'est la molécule active de traitement vétérinaire tels que MAQS® et Varterminator®. L'acide formique est la seule molécule actuellement reconnue pour son action sur les varroas dans le couvain operculé [180]. L'acide formique semble agir comme inhibiteur du complexe IV (ou cytochrome oxydase) de la chaîne respiratoire mitochondriale [181,182] et avoir un effet neuro excitateur [183]. Néanmoins, avec une DL_{50} de 152 µg par abeille [184], l'acide formique est peu toxique pour celle-ci. Le traitement hivernal n'affecte pas la ponte de la reine même sur le long terme [185]. La mortalité

aiguë des reines augmente en revanche significativement lors de l'usage de doses élevées[186], rappelant l'importance du respect des doses recommandées. L'application du protocole du PER a permis de montrer l'absence d'effet de l'acide formique sur l'apprentissage associatif de l'abeille [187].

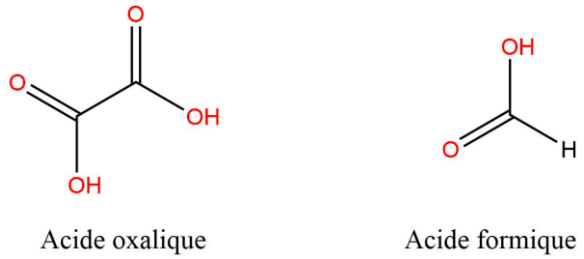


Figure 14. Structures de l'acide oxalique et de l'acide formique

L'acide oxalique est largement répandu dans le règne végétal (Figure 14) ; il est présent dans de nombreux légumes, comme l'épinard, la betterave rouge ou la rhubarbe [188]. La teneur naturelle du miel en acide oxalique est très variable (3,3–761,4 $mg.kg^{-1}$) et dépend de l'origine botanique du nectar [189]. Le mode d'action acaricide de l'acide oxalique n'est pas connu, mais chez les mammifère il interfère avec la chaîne respiratoire mitochondriale et induit une toxicité rénale [190]. Cet acide est peu toxique pour les abeille, avec une DL_{50} supérieure à 300 µg par abeille, mais possède probablement des sensibilités variables selon les souches d'abeilles [191,192]. Contre la varroose, l'acide oxalique peut être appliqué :

- par dégouttement dans une solution sucrée versée directement sur les abeilles dans les passages inter-cadres,
- sous forme de cristaux qui se subliment dans la ruche,
- par pulvérisation d'une solution aqueuse sur les abeilles qui se tiennent sur les rayons.

L'efficacité de l'acide oxalique semble dépendre de son mode d'application [193], et de l'absence de couvain au moment du traitement [194]. Après traitement en automne ou en hiver, la concentration d'acide oxalique augmente dans le miel ou dans les réserves d'hiver, puis les valeurs redescendent aux niveaux naturels au printemps suivant [189].

1.5.3 Lutte biologique et biomécanique

Dans le but de limiter l'utilisation des médicaments dans la ruche, plusieurs options sont envisagées. Certaines sont déjà appliquées par les apiculteurs, tandis que d'autres sont en voie de développement.

1.5.3.1 La sélection de souche d'abeilles tolérantes au varroa

Certaines abeilles comme *Apis cerana*, ou les sous-espèces *Apis mellifera capensis* et *Apis mellifera scutellata* du continent Africain [195] montrent une tolérance à *Varroa destructor*, laissant espérer que la sélection d'abeilles mellifères varroa-tolérantes soit possible à l'échelle globale. Les techniques d'élevage et de sélection sont des pratiques communes en apiculture. Sont généralement visés l'amélioration de traits comme la productivité en miel, le caractère doux et la faible propension à l'essaimage. La résistance aux agresseurs ou l'adaptabilité aux environnements locaux ne sont que des préoccupations contemporaines où le nourrissement artificiel des colonies et les traitements chimiques semblent atteindre leurs limites. La sélection d'abeilles tolérantes, qui a débuté dans les années 80, passe par deux approches :

1. L'élevage à partir de colonies ayant survécu pendant une dizaine d'années sans intervention : *live and let die*.
2. La sélection d'abeilles présentant des comportements spécifiques contre le varroa.

La tolérance des abeilles au varroa passe par deux réponses comportementales : le caractère d'épouillage des varroas phorétiques et les caractères agissant sur la reproduction des varroas.

Lors de l'épouillage ou « grooming » les abeilles peuvent décrocher les varroas phorétiques. L'évaluation de ce caractère est complexe, elle peut passer par le comptage des varroas morts sur le plancher d'une ruche ou par l'observation comportementale des abeilles en laboratoire. L'abeille asiatique *Apis cerana* semble plus efficace à décrocher varroa qu'*Apis mellifera* dans ces tentatives d'épouillage [196,197]. Cette caractéristique comportementale serait l'une des explications de l'équilibre hôte-parasite entre l'abeille mellifère asiatique et le varroa [198]. Au laboratoire, le comportement d'épouillage est altéré par l'usage d'acaricides comme le coumaphos, l'amitraze et le tau-fluvalinate [199].

Des travaux publiés en 2001 rapportent la sélection d'une souche d'abeille ayant la capacité de réduire la reproduction des varroas [200]. Dans le couvain de cette souche, 50 à 100 % des varroas fondatrices sont mortes ou bien sans descendance (contre environ 20 % pour le couvain d'abeilles standards). Avec ce caractère héréditaire appelé SMR pour *Suppression Mite*

Reproduction, les abeilles sont capables de détecter des nymphes infestées par des varroas femelles initiant l'oviposition et de les éliminer, alors qu'elles n'éliminent pas les nymphes infestées par des varroas incapables de se reproduire [201]. Le comportement SMR est une conséquence d'un comportement hygiénique de nettoyage des cellules qui contiennent des larves mortes [202]. Il a donc été recommandé de changer l'appellation SMR de cette souche par VSH, pour *Varroa Sensitive Hygiene* [203]. À l'heure actuelle, il persiste des confusions entre les deux acronymes ; nous retiendrons que la défense comportementale VHS peut être l'un des caractères exprimé par une colonie SMR supprimant la reproduction du varroa [204]. D'autres caractères peuvent agir sur la reproduction du varroa. Les conditions de température et d'humidité relative dans le couvain ont , par exemple, un impact direct sur la reproduction du varroa ; la régulation de ces paramètres peut être un facteur de tolérance au varroa [205,206], tout comme la durée d'operculation du couvain [41]. Tout varroa non mature à l'émergence de l'abeille est voué à mourir. Ainsi une désoperculation précoce permettrait de tuer les varroas immatures, et donc de ralentir la croissance de la population du parasite. Ce caractère semble cependant peu héréditaire, et donc difficilement sélectionnable [207].

Plusieurs programmes d'élevages ont suivi cet objectif d'abeille tolérante. Citons par exemple le programme utilisant la souche d'abeilles RHB (Russian Honey Bee) suivie par le ministère de l'Agriculture des États-Unis (USDA) [208]. La population de varroas s'accroit moins vite dans les souches RHB sélectionnées mais leur moindre productivité et leur agressivité en ont ralenti le commerce [209]. En Allemagne depuis 2003, le programme *Arbeitsgemeinschaft Toleranzzucht* (AGT) est mené pour la sélection d'abeilles productives, douces et résistantes au varroa. En France, le projet BeeStrong a débuté à l'été 2016 et vise l'identification de marqueurs génétiques spécifiques du caractère SMR. Ces abeilles pourraient représenter dans le futur une solution durable contre le varroa.

1.5.3.2 Piégeage des varroas dans le couvain

Il est généralement impossible d'employer des traitements contre varroa pendant la période de miellée. Le risque de résidus dans le miel est le principal frein à leur usage. Pour réduire la population de varroas à cette époque de miellée, il est possible d'utiliser des méthodes biotechniques. Ces méthodes sont fondées sur un principe simple : les varroas peuvent être piégés dans le couvain et ainsi retirés de la colonie. En effet, nous avons cité précédemment que le couvain peut servir au diagnostic de l'infestation par varroa, nous allons voir ici que l'apiculteur peux s'en servir comme moyen de contrôle du parasite.

Le retrait du couvain d'ouvrières semble plus délicat à mettre en œuvre que celui de faux-bourdons, d'une part car il faut en éliminer une quantité importante pour avoir un effet significatif sur la population de varroas, d'autre part parce que les apiculteurs sont réticents à l'idée de supprimer de futures ouvrières [210]. La première évocation du retrait de couvain de faux-bourdons date de 1980 [211]. Le retrait de couvain de faux-bourdons n'est pas suffisant pour réguler l'infestation [212] mais peut permettre de soulager la colonie, voire espacer les traitements chimiques. Une étude menée par Calderone (2005) n'a montré aucun effet négatif du retrait du couvain de faux-bourdons (à quatre reprises au cours de la saison) sur la santé globale des colonies, en terme de population d'ouvrières et de production de miel [213]. Cette étude soutient également l'effet positif de la suppression du couvain sur la pression parasitaire. Des résultats précédents avaient déjà montré l'intérêt de ce type de méthode [214]. Calderone conclu son étude sur l'intérêt de cette méthode biomécanique dans un programme de lutte intégré contre le varroa.

1.5.3.3 La lutte biologique

On entend par contrôle biologique (ou biocontrôle) l'emploi d'organismes vivants pour limiter ou supprimer la population d'un nuisible, afin de le rendre moins dommageable [215]. L'utilisation de prédateurs ou parasite naturels du varroa sont des pistes intéressantes, mais doit passer par des ennemis d'autres acariens car aucun ennemi naturel du varroa n'est connu. La publication de Chandler *et al*. (2001) offre une revue des différentes options envisagées pour le biocontrôle du varroa [216]. Les agents pathogènes potentiels pour les acariens varroas peuvent être divisés en groupes, selon la taxonomie des microorganismes : les arthropodes, les nématodes, les protozoaires, les champignons, les virus et les bactéries Rickettsiae. Néanmoins, ces dernières sont complexes à produire en quantité, et peuvent être dangereuses pour l'homme, ce ne sont donc pas des agents de biocontrôle potentiels.

Le biocontrôle du varroa par des Arthropodes, membres de la superfamille des Cheliferoidea (Ordre des Pseudoscorpionida) est une autre piste de lutte envisagée. Ces animaux sont ubiquistes des environnements terrestres [217]. Certains pratiquent le commensalisme avec des insectes volants, par exemple les abeilles, et les utilisent comme mode de dispersion (phorésie). Historiquement on trouvait une espèce de pseudoscorpion dans les ruches d'Europe - *Chelifer cancroides* -, six en Afrique et cinq en Inde [218]. *C. cancroides* semble avoir disparu des colonies européennes, sans doute avec l'apparition des ruches à cadres mobiles. Plusieurs de ces espèces (*N. gracilis*, *C. cancroides*, et *H. novaezealandiae*) sont des prédateurs de varroa [219,220]. Les observations sont cependant controversées par un manque de lien entre la présence naturelle de

pseudoscorpions et le contrôle du varroa [221,222]. L'hypothèse serait un régime trop généraliste pour permettre un biocontrôle efficace du parasite au sein des colonies. La détection des espèces se nourrissant de varroa, possible par des techniques de PCR [223], devrait permettre à terme d'identifier les espèces de pseudoscorpions réellement intéressantes. Elles pourraient ainsi servir d'agents de contrôle biologique non seulement contre les varroas, mais aussi contre les acariens causant l'acariose, les petits coléoptères de la ruche et les larves de fausse-teigne [224]. Si cette voie est choisie, les ruches devront probablement être modifiées pour fournir un environnement favorable au développement des pseudoscorpions.

Une piste évoque la réduction de l'espérance de vie des varroas naturellement contaminés par des particules virales [225], mais aucune suite n'a pour l'instant été donnée à ces travaux. Des recherches explorent également le pouvoir varroacide de certaines bactéries comme des souches de *Bacillus sp.* [226,227] ou des sous-produits d'origine bactérienne [228]. Deux souches de *Bacillus thuringiensis* en particulier ont montré un effet varroacide sans effet sur le développement des larves d'abeilles, ni la consommation de sirop, la locomotion ou l'acquisition du PER des ouvrières [226,229].

Enfin, parmi les multiples options, les champignons entomopathogènes semblent présenter l'avenir le plus prometteur [216]. Plusieurs isolats de différentes espèces (*Verticillium lecanii*, *Hirsutella spp.*, *Paecilomyces spp.*, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium spp.*, et *Tolypocladium spp.*) ont montré un effet varroacide intéressant [230]. Deux champignons ressortent particulièrement : *Beauveria bassiana* et *Metarhizium anisopliae* (Muerrle *et al.*, 2006). Des tests en champs réalisés avec l'espèce *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, Hypocreales: Clavicipitaceae), indiquaient une efficacité comparable au traitement Apistan. L'intérêt du traitement par ce champignon a été confirmé par une autre étude menée dans des colonies en Floride et au Texas [231,232]. Ces résultats n'ont cependant pas pu être reproduits [233] ce qui souligne la nécessité d'approfondir les recherches. Une formulation avec *Beauveria bassiana* (Balsamo, Hypocreales: Cordycipitaceae) a montré une efficacité anti-varroa lors de tests en ruche [234].
En plus de leur effet potentiel sur le varroa, *B. bassiana* et *M. anisopliae* montrent un profil intéressant pour la lutte contre le Petit Coléoptère des ruches *Aethina tumida* [235]. Cependant, la température et l'humidité influencent l'efficacité des champignons entomopathogènes [236] laissant présager une variabilité dans l'efficacité du biocontrôle par les champignons. Les défis avant de pouvoir les utiliser à grande échelle restent donc encore nombreux [237], et des tests normalisés devront être développés pour mieux cerner les interactions entre le varroa, la ruche et les champignons avant de les envisager comme moyen de lutte.

1.5.3.4 Extraits végétaux divers

HopGuard® se présente sous la forme de languettes cartonnées contenant des extraits de houblon *Humulus lupulus* avec 16 % d'acides beta comme ingrédient actif [189]. Le médicament n'est pas encore autorisé en Europe. Aux États Unis il fait partie de la Section 18 de la *Federal Insecticide, Fungicide, and Rodenticide Act* (FIFRA). Une étude menée au Canada par Vandervalk (2014) a montré un effet insuffisant du médicament HopGuard® lors de traitement printanier et automnal [238]. Des résultats similaires en présence de couvain ont été trouvés lors d'un essai technique en 2013 par la Chambre Agriculture de Région Alsace. En revanche des tests plus récents ont montré une efficacité varroacide moyenne de 90 % lors d'un traitement hivernal de quatorze jours [239]. Des extraits d'ifs et de feuilles et noyers ont été proposés comme traitement anti-varroa complémentaire [240], sans que le mode d'action soit définit.

La roténone est une molécule organique naturelle extraite des racines de certaines plantes tropicales, agissant comme inhibiteur du complexe I de la chaine respiratoire. Un test mené sur colonie suggère qu'un effet contre le varroa d'environ 80 % peut être atteint lors d'un traitement sur dix jours [241]. En revanche la molécule entraîne une forte mortalité du couvain [194]. Aucun dossier de LMR n'ayant été réalisé auprès de l'Agence Européenne du médicament, aucune préparation extemporanée à base de roténone ne peut être prescrite sous ordonnance vétérinaire. La roténone n'apparait plus comme candidate dans la lutte contre le varroa [242].

L'huile de neem est extraite des graines de l'arbre *Azadirachta indica* ou *Melia azadirachta*, dont les différentes parties sont utilisées dans la médecine traditionnelle, notamment en Inde. La principale molécule active de cette huile est l'azadirachtine, mais l'huile se montre plus active que l'azadirachtine pure. Les effets de l'azadirachtine chez les insectes sont multiples : antiappétant et reprotoxique, c'est également un composé qui altère le déroulement de la mue, ralentit le système digestif et la division cellulaire [243]. Ces effets négatifs sur le couvain d'abeilles [244] bloquent pour le moment son usage contre le varroa malgré une efficacité prometteuse [245–247].

1.5.3.5 Autres pistes de lutte

Quelques études montrent que la taille des cellules du couvain peut avoir de l'importance dans le processus d'infestation par les fondatrices. L'abeille africanisée est plus petite que l'abeille européenne, et les cellules construites pour l'élevage du couvain suivent la même tendance. La comparaison de l'infestation de ces deux types de cellules a permis de montrer que le varroa

infeste significativement plus les grandes cellules [248]. Une hypothèse explicative pourrait être le nombre de visites par les abeilles nourrices plus fréquente quand la taille du couvain grandi, augmentant ainsi la probabilité d'infestation. Cette « préférence » des fondatrices pour les cellules plus grandes a été confirmé en conditions naturelles dans des colonies d'abeilles européennes [249].

Certaines pistes visent l'amélioration de la résistance des abeilles au varroa par l'application de traitements homéopathiques, mais aucun résultat positif ne ressort pour l'instant [250]. Une étude porte sur la recherche de neuropeptides, ou dérivés, qui pourraient être sélectifs du varroa [251]. Enfin, Bee Gym™ (www.beegym.co.uk/, Figure 15) est proposé comme un dispositif d'aide au toilettage des abeilles, qui doit être placé sur le fond grillagé des ruches. Les abeilles, en venant se frotter contre les différentes parties du dispositif pourraient décrocher ou blesser les varroas phorétiques. Un essai mené en Angleterre n'a pas montré d'effet significatif sur la chute des varroas au fond des colonies suivies pendant 14 jours [252].

Figure 15. Dispositif Bee Gym™

1.5.4 Traitements anti-varroas autorisés en France

Toutes les spécialités pharmaceutiques doivent disposer d'une Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) avant de pouvoir être commercialisées en Europe. Les AMM pour les médicaments vétérinaires sont délivrées en France par l'ANSES après un processus d'évaluation technique et scientifique ou bien par la Commission européenne après avis du Comité des médicaments à usage vétérinaire (CVMP) de l'EMA. Ainsi, parmi toutes les molécules à propriétés anti-varroas connues, seules certaines sont actuellement autorisées en France.

Les médicaments vétérinaires autorisés avec AMM en France délivrés sur ordonnance chez les Pharmaciens, Vétérinaires, et dans les GDSA agréés sont les suivants :

- **Apivar®**, qui possède une AMM depuis mars 1995, est distribué par Vétopharma. Le traitement se présente sous forme de lanières à base d'un polymère plastique contenant chacune 500 mg d'amitraze. La posologie est de deux lanières par ruche (ou une lanière pour une ruchette), à laisser en place pendant six semaines au minimum. Les recommandations indiquent cependant actuellement des temps de pose de dix à douze semaines.
- **Apitraz®**, dont l'AMM date de novembre 2015. Le traitement se présente sous le même conditionnement et utilise la même molécule active qu'Apivar®.
- **Apibioxal®** : est disponible depuis son AMM le 14 Août 2015, à base d'acide oxalique. Avant l'autorisation de mise sur le marché d'Apibioxal©, existait la possibilité d'une prescription vétérinaire extemporanée (hors AMM) d'acide oxalique.

Il existe d'autres traitements, autorisés avec AMM, qui peuvent être accessibles aux apiculteurs sans demande préalable d'ordonnance :

- **Bayvarol®** : le médicament se présente sous la forme de lanières contenant de la fluméthrine (3,6 mg de substance active par lanière). L'AMM date, en France, de mai 2017.
- **VarroMed®** : en février 2017 la Commission européenne a délivré pour ce traitement à base d'acide oxalique dihydraté et d'acide formique une AMM valide dans toute l'Union européenne, y compris en France.
- **Polyvar Yellow®**, dont l'AMM date également de février 2017. Deux lanières, contenant de la fluméthrine, sont placées à l'entrée de la ruche de manière à ce que les abeilles ne puissent entrer ou sortir qu'en passant à travers les trous de celles-ci.
- **MAQS®** : ce médicament, distribué en France par Vétopharma, possède une AMM depuis mai 2014. La substance active est l'acide formique (68,2 g par bande). Il se présente sous forme de bandes qui peuvent être appliquées pendant la miellée.
- **Apilife Var®** : est une résine phénolique expansée de couleur verte, imprégnée de thymol (74 %) à laquelle est ajouté de l'huile essentielle d'eucalyptus (16 %), du menthol et du camphre (3,7 % chacun). L'AMM date de janvier 2010. Ce traitement est contre-indiqué pendant la miellée afin de ne pas altérer les qualités organoleptiques du miel et lorsque la température est supérieure à 30 °C.

- **Thymovar®**, dont l'AMM date de janvier 2007 est un produit sous forme de plaquettes contenant du thymol, à disposer sur les têtes de cadres.
- **Apiguard®**, produit ayant une AMM depuis décembre 2001. Ce sont des barquettes contenant du thymol (50 g de gel contenant 12,5 g de thymol). L'utilisation d'Apiguard nécessite un espace entre le haut de la barquette et le toit de la ruche, en retournant le nourrisseur par exemple.
- **Apistan®** : c'est le premier traitement à avoir eu une AMM en France, avec une autorisation datant de février 1989. Le médicament se présente sous la forme de lanières contenant du tau-fluvalinate.

Selon la réglementation, (CE) n° 1804/1999, la suppression du couvain mâle est autorisée pour limiter l'infestation.

1.5.5 Efficacité des traitements varroacides et phénomènes de résistances

1.5.5.1 Définition d'un traitement efficace

L'efficacité d'un traitement est évaluée par le rapport de la chute de varroas pendant la phase de traitement avec la chute de varroas pendant la phase de traitement et la phase de traitement de contrôle.

Selon l'Agence Européenne du Médicament (EMA), l'efficacité doit être :

- supérieure à 95 % pour les varroacides composés de molécules de synthèse,
- supérieure à 90 % pour les acaricides composés de substances d'origine naturelle synthétisées en laboratoire.

Ce critère est pris en compte lors de la demande d'AMM. Une bonne efficacité est essentielle pour permettre un contrôle sur plus long terme de la population de varroas (Figure 16). Avec un traitement efficace à seulement 80 %, le nombre de varroas peut atteindre la barre critique de mille par colonie en moins de trois mois. L'efficacité aide également à retarder l'apparition des résistances.

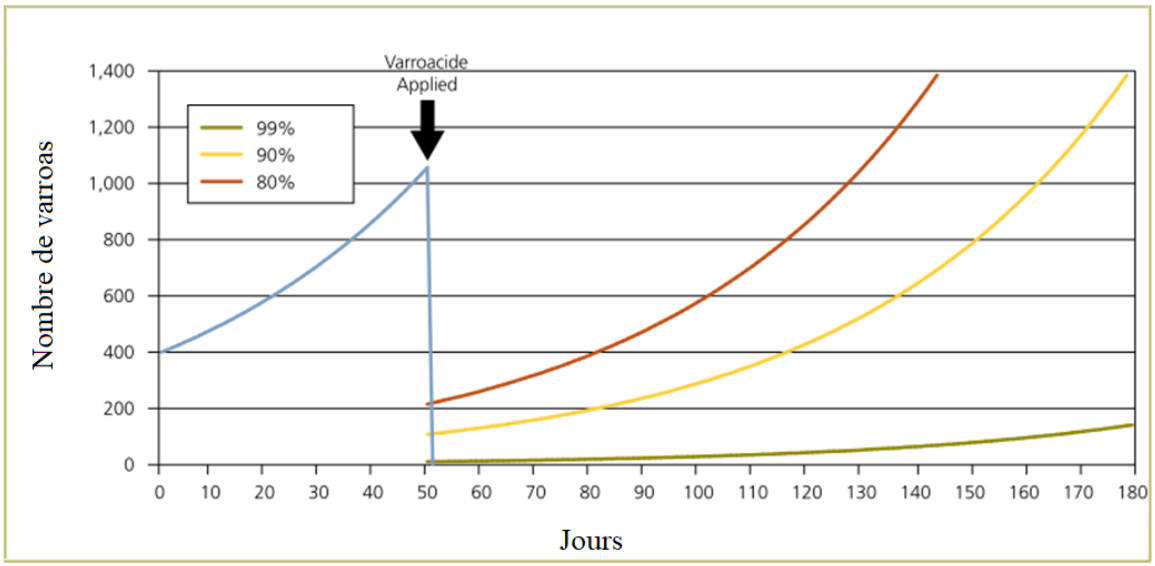


Figure 16. Courbe théorique de développement d'une population de varroas subissant un traitement. Source : Managing varroa - The Food and Environment Research Agency (2015).

1.5.5.2 Suivi de l'efficacité en France

Les multiples déclarations, par des apiculteurs, d'inefficacité des médicaments varroacides ont conduit le laboratoire de Montpellier SupAgro à mettre en place un suivi annuel de l'efficacité des traitements. Ces études, menées depuis dix ans en collaboration avec la FNOSAD sont fondées sur la coopération d'apiculteurs volontaires. Les résultats du suivi pour l'année 2016 ont été publiés en juin 2017 dans le journal La Santé de l'Abeille [253]. Cinq médicaments ont été évalués : Apivar®, Apitraz®, Apistan®, MAQS® et Apibioxal®. Un extrait des résultats est présenté dans la Figure 17.

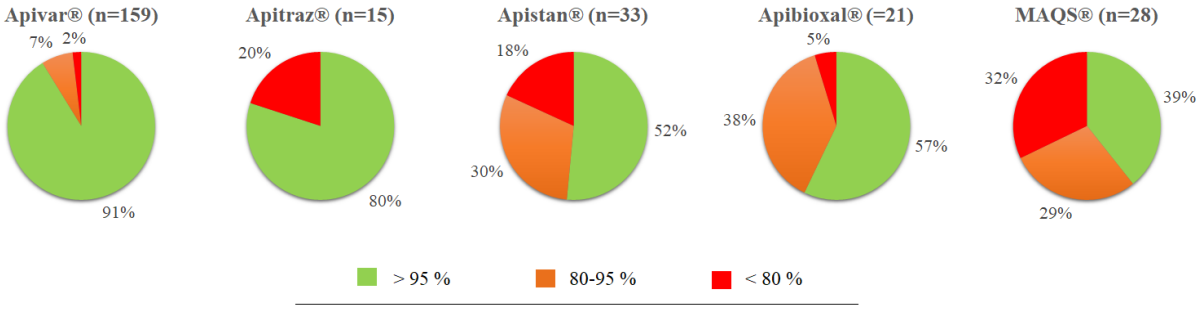


Figure 17. Pourcentages d'efficacité (n : nombre de colonies). Résultats d'après J. Vandame, 2017 [253].

Le pourcentage d'efficacité correspond au nombre de varroas impactés pendant la durée du traitement, rapport à l'infestation totale. Nous avons mentionné dans le paragraphe précédent que, selon les lignes directrices, une molécule de synthèse doit dépasser 95 % d'efficacité, et qu'une molécule dite d'origine naturelle doit avoir une efficacité supérieure à 90 %. Le médicaments Apivar®, incorporé dans l'étude pour la première fois, répond au critère dans plus de 90 % des colonies. Les résultats sont moins satisfaisants avec le médicament Apitraz®, dont seulement 80 % des colonies traitées ont obtenu un pourcentage d'efficacité supérieur à 95 %. En revanche les tests n'ont été conduit que sur 15 colonies, avec un traitement sur 6 semaines (contre 10 semaines pour Apivar®). Pour Apistan®, le traitement a eu une efficacité satisfaisante pour seulement 51% des colonies ; ces données sont similaires aux informations récoltées au court des campagnes précedentes. Le traitement Apibioxal® a été mis en œuvre par dégouttement après une période d'encagement de la reine pendant 25 jours afin d'éviter la présence de couvain. Concernant le médicament Apibioxal®, les résultats font ressortir que 90 % des traitements répondent à la réglementation de 90 % d'efficacité. Les résultats obtenus pour les tests réalisés avec le MAQS® sont sensiblement moins bons : 46 % des traitements ont permis d'atteindre les 90 % d'efficacité, parmi lesquels 49 % dépassent 95 % d'efficacité. Les médicaments Apivar® et Apibioxal® semblent les plus efficaces dans les conditions de l'étude.

1.5.5.3 Développement et propagation des résistances

L'apparition de résistance est dépendante de nombreux facteurs : le mode de reproduction de l'espèce, le degré de dominance du gène impliqué dans la résistance ainsi que la valeur adaptative qu'il confère, le degré d'exposition à la molécule ainsi que de facteurs écologiques variés [254]. Le varroa présente un renouvellement générationnel important, ce qui peut contribuer au développement des résistances. L'accouplement fortement consanguin du varroa favorise d'autant plus l'apparition de ces résistances [60]. En dehors des traitements contenant de l'acide formique, les acaricides disponibles sur le marché ne permettent d'éliminer que les varroas phorétiques. Les médicaments ont donc des galéniques à libération prolongée dans le temps, afin de toucher les varroas à leur sortie du couvain, mais la diminution des doses diffusées au cours du traitement implique un risque accru de sélection de souches résistantes [255]. Ce risque est d'autant plus fort lors d'éventuels non-respect des durées préconisées de traitements. Enfin, une étude suggère que la résistance peut s'étendre jusqu'à des ruchers non traités [254], une explication étant la propagation de la résistance lors de la dérive des abeilles, des phénomènes de pillages ou l'introduction d'abeilles parasitées lors de la gestion des ruches.

1.5.5.4 Mécanismes de résistance

De manière générale, la résistance envers un traitement peut découler de plusieurs mécanismes. Selon l'IRAC, ces mécanismes sont regroupés en quatre classes :

1. D'une part via une résistance du site ciblé par le traitement, qui se produit quand un allèle du gène codant pour la cible subit une mutation lui conférant une résistance.
2. D'autre part, la résistance métabolique qui survient lors d'un changement dans la capacité de détoxification, ou de séquestration, de la molécule acaricide. Les familles enzymatiques impliquées sont généralement les monooxygénases à cytochrome P450, les estérases et glutathion S-transférases.
3. Il existe également des mécanismes de réduction de la pénétration du composé dans l'organisme.
4. Enfin la résistance comportementale consiste en la modification du comportement de l'agent qui réduit la probabilité d'exposition à l'insecticide.

La première mention de la résistance du varroa au tau-fluvalinate date de 1991 [256]. Des varroas résistants ont très vite été détectés dans le Sud de la France, en Suisse et Slovénie [257]. Le phénomène s'est par la suite étendu au Royaume-Unis [258] et à l'Espagne [259]. L'expansion rapide, à travers toute l'Europe, de la résistance est attribuée aux déplacements de colonies par les apiculteurs [260]. En parallèle, des cas de résistance ont été détectés en Floride [261] puis se sont étendus sur le territoire Américain. La résistance du varroa au tau-fluvalinate est en partie expliquée par un accroissement de l'activité des monooxygénases à cytochrome P450 par un facteur 20, tandis que les estérases semblent jouer un rôle négligeable [254]. La résistance reste sans doute principalement liée à une mutation de la cible [262], et le séquençage de fragments de l'ADNc de varroa de souches sensibles et résistantes montre que la substitution d'une leucine par une valine pourrait expliquer la perte de sensibilité au tau-fluvalinate [263].

Le coumaphos est utilisé dans de nombreux pays comme traitement alternatif dans les zones ou la résistance au tau-fluvalinate en limitait l'emploi. Des résistances ont rapidement été rapportées en Europe et en Amérique [264–267]. Le mécanisme de résistance n'est pas décrit pour le varroa mais des données sont publiées pour d'autres acariens. Chez *Boophilus microplus*, le mécanisme de résistance au coumaphos se fait via une détoxification métabolique [268,269], mais la perte de sensibilité de l'AChE pour le pesticide reste sans doute la principale cause de résistance [270].

Des varroas résistants à l'amitraze ont été signalés dans l'État du Minnesota [271], en République Tchèque [272], en Serbie [266] et en Argentine [273]. Le mécanisme de résistance semble complexe et plusieurs voies ont été proposées, principalement lors d'études portant sur la tique *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* - la tique asiatique du bétail - considérée comme l'un des plus importants nuisibles du bétail. Un mécanisme de résistance métabolique à l'amitraze a été proposé [274] ; mais une résistance par perte de sensibilité de la cible semble la voie la plus probable. En Australie, Corley *et al.* [275] ont montré le lien entre la résistance à l'amitraze et la fréquence de mutation sur le gène du récepteur à l'octopamine β-adrenergique like (*RmβAOR*). La résistance, qui implique probablement plusieurs gènes, peut éventuellement varier selon la souche et l'espèce d'acarien [276,277]. La mécanistique de ce phénomène n'est actuellement pas décrite chez le varroa.

1.6 Enquête sur les pratiques de traitements anti-varroas dans le Calvados

La participation d'apiculteurs de la région a été un maillon essentiel au bon déroulement de ces travaux de thèse, tant pour la récolte de varroas que pour l'aide à la gestion des colonies du laboratoire. Ces rencontres ont également apporté de nombreuses occasions de discuter sur les différentes pratiques de gestions des ruchers, et notamment concernant le varroa. De ces échanges a finalement murie la volonté de mettre en place une enquête, auprès d'apiculteurs de la région du Calvados, sur les pratiques de traitements anti-varroas. Dans ce cadre, l'association Abeille Normande du Calvados (ANC) a permis d'exploiter la liste de ses apiculteurs adhérents afin de diffuser une enquête sur leurs pratiques de traitements anti-varroas.

1.6.1 Présentation de l'Abeille Normande du Calvados

L'ANC est implantée à Mondeville, dans le département du Calvados. Créée en 1906, cette association, présidée actuellement par Jean-Marie Godier, fédère aujourd'hui plus de 560 apiculteurs-adhérents ou sympathisants. La plupart de ces membres pratiquent une apiculture de loisir, ou sont dans une démarche de découverte active de l'apiculture. L'association propose en effet un rucher-école pour débutants, ainsi qu'un rucher-école de perfectionnement. Les formations, non diplômantes, sont données par des bénévoles de l'association ; elles fournissent aux élèves les bases de la gestion pratique et sanitaire de colonies.

L'ANC compte, parmi ces adhérents en 2016, 470 apiculteurs possédant au moins une ruche. Le questionnaire a été proposé en ligne via la plateforme Doodle. Le questionnaire (voir

Annexe A.5) sous Doodle ainsi que les courriels ont été gérés par Jacques Hue, trésorier de l'ANC. Pour les 63 adhérents ne possédant pas d'adresse courriel, un questionnaire a été envoyé par voie postale.

1.6.2 Résultats de l'enquête

Nous avons obtenu 76 retours valides au questionnaire, soit un taux de réponse de 16 %. Le taux de réponse est équivalent pour le format Doodle et par envoi postal.

Plus de 80 % des participants à l'enquête possèdent moins de 11 colonies (Figure 18). Ce résultat n'est pas surprenant : l'ANC fédère principalement des apiculteurs amateurs et le seuil d'imposition était fixé jusqu'en 2016 à partir de 11 ruches en production.

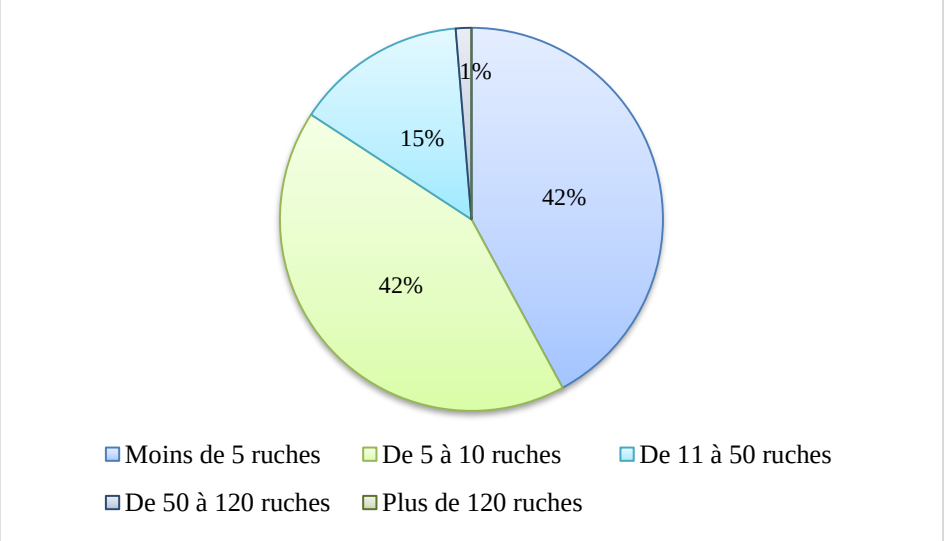


Figure 18. Taille des ruchers des participants au questionnaire.

Quatre-vingt-onze pour cent des participants indiquent évaluer le taux d'infestation par varroa dans leurs colonies. La méthode de comptage de chute naturelle sur un plateau positionné sous la ruche reste la plus utilisée : 58 % des apiculteurs contrôlant le taux d'infestation l'utilisent. En revanche 35 % des participants n'ont pas indiqué la méthode qu'ils utilisent pour ce contrôle. Trois apiculteurs mentionnent évaluer le taux d'infestation par désoperculassions du couvain de mâle, et un apiculteur par une estimation visuelle de la grappe. Aucun participant n'évalue l'infestation en varroas phorétiques par lavage des abeilles au CO_2, au sucre glace ou au détergent. Les abeilles aux ailes déformées sont souvent utilisées comme indicateur d'une forte infestation par varroa. Dans le cas de notre étude, 77 % des apiculteurs indiquent n'avoir vu que très peu, voir aucune abeille présentant des ailes déformées. Seize pour cent des apiculteurs

ont répondu ne pas savoir, et aucun n'a signalé une grande quantité d'abeilles aux ailes déformées.

Soixante-quatorze apiculteurs, représentant 97 % des répondants au questionnaire, mentionnent utiliser un moyen de lutte contre le varroa. Parmi eux, 74 % utilisent le traitement Apivar®.

En moyenne, les participants mettent en œuvre 1,3 fois par an un moyen de lutte contre le varroa. La tendance des apiculteurs à effectuer un traitement annuel unique a déjà été mis en avant lors d'un sondage chez 189 participants répartis sur le territoire [278]. La lutte biotechnique par retrait de couvain a été utilisée par six participants (dont deux ont pratiqué un retrait total du couvain) ; elle est systématiquement associée à au moins un traitement chimique dans l'année. Aucun apiculteur ne semble avoir encagé ses reines pour limiter la présence de couvain lors des traitements.

Parmi les apiculteurs utilisant un moyen de lutte contre le varroa, 43 % d'entre eux emploient au moins un acide organique. Concernant l'acide formique, nous pouvons répertorier onze utilisateurs du médicament MAQS® et sept utilisateurs de préparations extemporanées. Onze apiculteurs ont réalisé un traitement avec de l'acide oxalique par dégouttement entre décembre et janvier, mais aucun sous la forme du médicament Api-bioxal®. La même tendance sur l'emploi de l'acide oxalique en préparation extemporanée, et non avec Api-bioxal®, a également été constaté lors des enquêtes par la Chambre d'Agriculture d'Alsace [279]. Enfin trois apiculteurs mentionnent l'emploi de Beevital Hiveclean®. Une seule personne indique utiliser du tau-fluvalinate, via le traitement Apistan®, et l'a combiné avec un traitement hivernal par acide oxalique et un traitement Apivar®. Les traitements à base d'huiles essentielles sont mal adaptés aux conditions climatiques du nord de la France. De ce fait, seulement deux apiculteurs ont utilisé un médicament vétérinaire à base de thymol ; un autre mentionne avoir utilisé une solution extemporanée contenant du thymol. Dans ces trois cas les traitements sont effectués en août. Aucun autre participant au questionnaire ne semble utiliser d'huile essentielle.

Concernant les pratiques d'utilisation des lanières Apivar®, 44 % des apiculteurs positionnent les lanières en bordure du couvain. Placer les lanières entre le 1er et le 2ème cadre de couvain d'une part, et entre le dernier et l'avant dernier d'autre part concerne 38 % des utilisateurs ; les autres mettent les lanières au centre du couvain. La durée réelle du traitement des colonies s'avère hétérogène (Figure 19 A).

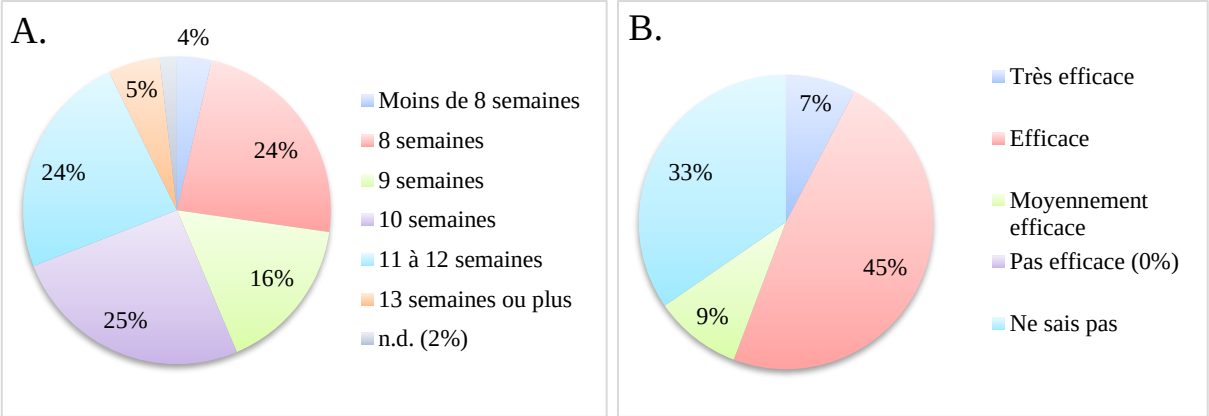


Figure 19. A : durée (en semaines) de traitement Apivar et B : évaluation de l'efficacité du traitement Apivar® par ces utilisateurs.

L'avis général des utilisateurs sur l'efficacité d'Apivar® semble positif, avec 52 % jugeant le traitement efficace, voire très efficace (Figure 19 B). Aucun participant n'a catégorisé le traitement comme non efficace, traduisant une bonne confiance de ce dispositif.

Si les lanières sont recouvertes de propolis et/ou de cire, il est recommandé de les gratter délicatement à mi- traitement à l'aide d'un lève-cadre. Ensuite, les lanières peuvent être replacées dans la ruche et repositionnées, si nécessaire, de façon à les situer dans la zone de couvain et de la grappe d'abeilles (si leur position a changé) [i]. Sur les 55 apiculteurs traitant leurs colonies avec Apivar®, 49 % d'entre eux pratiquent un déplacement des lanières après leur mise en place dans la colonie. Les lanières sont déplacées entre 4 et 6 semaines après le début du traitement, généralement en fonction des conditions climatiques. Le grattage des lanières, par exemple avec le lève cadre, pour les débarrasser des dépôts de cire et de propolis, est pratiqué par 16 % des utilisateurs. De plus, 49 % utilisent un dispositif pour descendre les lanières au plus près du flux d'abeilles.

[i] www.ircp.anmv.anses.fr/rcp.aspx?NomMedicament=APIVAR

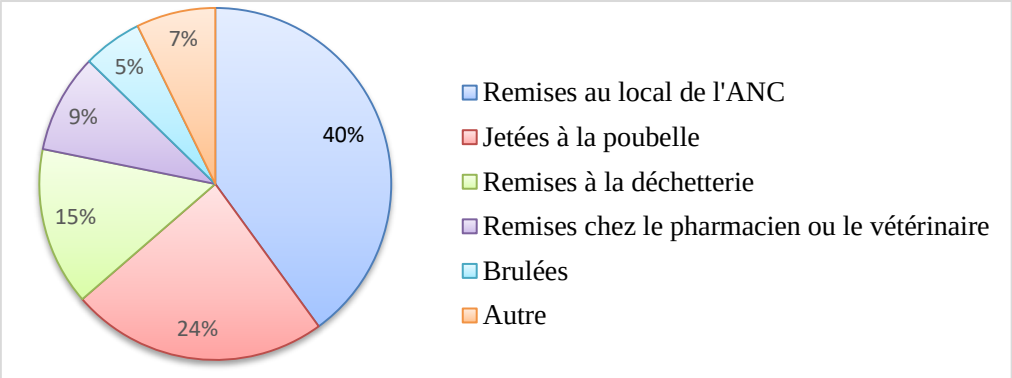


Figure 20. Devenir des lanières Apivar® usagées

Il est préconisé de ne pas jeter les lanières, ou les sachets vides, dans les cours d'eau car le produit peut être dangereux pour les poissons et les organismes aquatiques. Les apiculteurs ont la possibilité de rapporter leurs lanières usagées au local de l'association qui sert d'intermédiaire avec GDSA du Calvados. Le local met à disposition une poubelle pour déchets médicaux et vétérinaires, qui est ensuite celée et incinérée. Il reste 24 % des utilisateurs qui jettent leurs lanières dans les déchets ménagers. Ce point souligne qu'un rappel sur la bonne pratique de gestion des déchets des médicaments anti-varroas usagés pourrait être nécessaire.

Notre enquête sur les pratiques de traitements anti-varroas offre une photographie des méthodes de traitements anti-varroas pratiquées par des apiculteurs essentiellement amateurs. L'ANC apporte un soin particulier à la formation des jeunes apiculteurs, notamment concernant les règles sanitaires nécessaires à la bonne gestion d'un rucher ; l'enseignement de ces pratiques étant le premier point d'une lutte organisée contre les pathogènes auxquels est confronté le secteur apicole.

1.7 Conclusion

Le varroa est un parasite maintenant ubiquiste de l'abeille domestique. Le cycle de vie du parasite est parfaitement adapté à celui de son hôte. Les conséquences de la varroose sont nombreuses, tant à l'échelle de l'abeille que de la colonie. Il n'existe pas à l'heure actuelle un moyen de lutte durable, et seul l'emploi de traitements annuels, voire pluriannuel, permettent le maintien du secteur apicole.

En 2017 en France, onze traitements disposent d'une AMM. Ces médicaments vétérinaires donnent accès, au choix parmi trois molécules de synthèse (amitraze, fluméhrine et tau-fluvalinate), deux acides organiques (oxalique et formique) et des huiles essentielles (le thymol principalement). Avec la prise en compte des contraintes climatiques limitant l'usage de certaines molécules, des variations d'efficacité et des phénomènes de résistances, l'arsenal de lutte contre le varroa apparait trop limité. Dans l'attente de solution plus pérenne, telle que la sélection d'abeilles résistantes, la diversification des molécules à visé varroacide est essentielle, et est le point de départ de ces travaux de thèse.

Chapitre 2
La démarche de drug-design

2.1 Introduction

Il y a plus de cent ans, le prix Nobel Paul Ehrlich énonçait « *Corpora non agunt nisi fixata* » : *les substances n'agissent pas si elles ne sont pas fixées*. Cette citation met en avant que la complémentarité géométrique et chimique entre certaines molécules, les *ligands*, et leur cible macromoléculaire, généralement une protéine appelée *récepteur*, permet d'initier une réponse physiologique [280]. Un ligand est donc une molécule qui, en se fixant sur un récepteur, déclenche un effet.

2.1.1 Mode d'action des ligands

Les effets des ligands peuvent être mesurés par des paramètres qualitatifs, et on différencie alors les ligands agonistes des ligands antagonistes (Figure 21). La liaison d'un ligand agoniste à son récepteur spécifique provoque un effet comparable à celui du médiateur naturel. L'intensité de la réponse obtenue est variable selon les agonistes. Si la réponse biologique est maximale, équivalente à la réponse du médiateur naturel, c'est un agoniste entier. Si la molécule n'est pas capable d'atteindre la même efficacité, quelle que soit la dose, c'est un agoniste partiel. Un antagoniste se lie sans provoquer d'effet, mais il peut s'opposer à la liaison du médiateur naturel, bloquant ainsi son action. Les antagonistes compétitifs se lient sur le même site que le médiateur endogène alors que les antagonistes non compétitifs se lient à un autre site du récepteur. Certains récepteurs, les récepteurs couplés aux protéines G par exemple, ont une conformation et une activité constitutive (*i.e.* en absence de tout médiateur) ; un agoniste inverse ou antagoniste négatif inhibe cette activité spontanée et implique une activité intrinsèque négative [281].

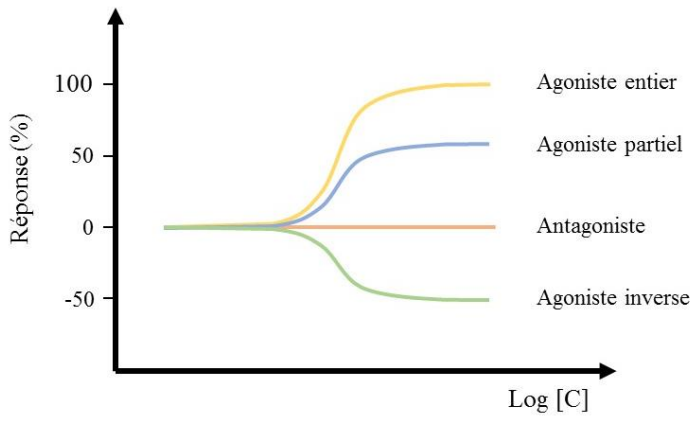


Figure 21. Représentation schématique du comportement pharmacologique de différents ligands.

2.1.2 Les étapes d'identification de molécules actives

La recherche d'un nouveau médicament est un processus long passant par plusieurs phases. La démarche commence par le choix de la cible, généralement de nature protéique. La mise en évidence d'un ligand avec une affinité détectable pour le récepteur visé est l'objectif majeur du processus. Le développement d'outils informatiques fiables, et de puissance croissante, a permis la mise en place d'un très large ensemble de techniques de simulation numérique. Le néologisme *in silico* sert à qualifier ces méthodes numériques, utilisées pour accélérer la découverte de nouvelles structures *lead* (molécule active biologiquement mais devant passer par des phases d'optimisations). Les méthodes *in silico* ne peuvent remplacer l'expérience, et sont complémentaires des études expérimentales *in vivo* et *in vitro*.

L'identification de molécules actives peut suivre différentes démarches :

- Les essais de criblage à haut débit (*high-throughput screening* HTS) consistent à tester de façon automatisée un grand nombre (jusqu'à 100 000 par jour) de molécules [282]. Face au criblage HTS, on trouve les méthodes informatiques de criblage virtuel.
- La recherche de nouvelles molécules fait face à la démarche de réorientation de médicaments - ou *drug repositioning* - qui vise à trouver de nouveaux usages à des molécules déjà utilisées [283].

2.2 Les méthodes de criblage virtuel

Le terme criblage virtuel regroupe l'ensemble des techniques *in silico* ayant pour objectif la recherche de molécules d'intérêt par l'exploration de bases de composés [284]. On distingue deux principaux types de criblage virtuel : les approches fondées sur la connaissance des ligands (*ligand-based*) et les approches fondées sur la structure du récepteur (*structure-based*, comme par exemple le docking). Si les secondes approches ne peuvent être employées que lorsque la structure 3D du récepteur est connue, les méthodes basées sur les ligands sont particulièrement pertinentes quand les informations sur le récepteur sont peu abondantes (voir Tableau 2).

Tableau 2. Méthodes de screening virtuel, modifié d'après Sheridan et Kearsley (2002) [285].

	Ligand-based			Structure-based
	Recherche par sous-structures	Recherche par similarité	QSAR	Docking
Principes	Les molécules présentant les mêmes sous-structures ont potentiellement la même activité	Les composés chimiquement similaires présentent potentiellement des activités biologiques similaires	Les molécules ayant l'activité prédite la plus forte sont plus susceptibles d'être actives	Les composés ayant une forte affinité prédite sont susceptibles d'interagir avec la cible
Entrées	Sous-structures communes aux molécules actives	Au moins une molécule active sur le récepteur	Données d'activités sur un nombre suffisant de composés	Structure 3D du récepteur

2.2.1 Recherche par similarité de structure

La recherche par similarité de structure est fondée sur le principe suivant : des composés de structures chimiques similaires vont présenter des activités biologiques également similaires. Ce principe a été appuyé par des travaux démontrant que la similarité d'activité entre des composés augmente avec leur similarité structurale [286].

2.2.1.1 Les descripteurs

La structure moléculaire d'un composé organique ou inorganique détermine ses propriétés. Cette structure peut être décrite par des valeurs que l'on appelle les descripteurs moléculaires. Les descripteurs moléculaires sont donc des valeurs numériques utilisées pour caractériser les propriétés des molécules.

The molecular descriptor is the final result of a logic and mathematical procedure which transforms chemical information encoded within a symbolic representation of a molecule into a useful number or the result of some standardized experiment

Todeschini & Consonni, Handbook of molecular descriptors [287]

Il existe des milliers de descripteurs possibles, qui peuvent être obtenus de manière empirique ou expérimentale. Les descripteurs moléculaires sont fréquemment classés par rapport à la dimensionalité de la représentation moléculaire sur laquelle ils sont calculés.

2.2.1.2 Descripteurs constitutionnels (0D)

Les descripteurs constitutionnels décrivent des propriétés globales du composé. Il s'agit par exemple des atomes qui le constituent, ou de sa masse molaire.

2.2.1.3 Descripteurs de sous-structure (1D)

Ces descripteurs se rapportent aux fragments qui constituent la molécule. Une grande variété de fragments peut être définie [288], comme par exemple des chaînes, des cycles ainsi que la représentation linéaire SMILES (Simplified Molecular Input Line Entry Specification).

2.2.1.4 Descripteurs obtenus à partir de la formule développée (2D)

Ces descripteurs contiennent des informations liées à la connectivité ou aux fragments moléculaires, mais aussi des estimations des propriétés physico-chimiques. On trouve dans cette catégorie les descripteurs suivants :

Les indices topologiques – Ces indices considèrent la structure du composé comme un graphe, les atomes étant les sommets et les liaisons étant les arêtes [289]. De nombreux indices quantifiant la connectivité moléculaire ont été développés en se basant sur cette approche, comme par exemple l'indice de Wiener [290] qui compte le nombre total de liaisons dans les chemins les plus courts entre toutes les paires d'atomes. On retrouve également les indices topologiques circulaires ECFPs (Extended Connectivity Fingerprints) et FCFPs (Functional Connectivity Fingerprints). Un indice circulaire est un descripteur où à chaque atome est attribué selon un processus itératif une valeur unique, dépendante de sa connectivité. Les descripteurs de type ECFPs attribuent aux atomes une valeur qui est fonction [291] : de la nature de l'atome (charge, masse, valence et numéro atomique), de son nombre de connexions avec des atomes voisins - autres que les atomes d'hydrogène - et prend en compte l'appartenance de l'atome à un cycle.

La valeur attribuée à chaque atome par les descripteurs FCFPs dépend, elle, de la présence de donneur de liaison hydrogène, d'accepteur de liaison hydrogène, d'atomes positivement ou négativement ionisables, d'atomes halogènes ou de noyaux aromatiques. Il existe pour ces deux descripteurs circulaires plusieurs versions (ECFP_2, ECFP_4, FCFP_2, FCFP_4, …) en fonction du diamètre de connectivité considéré [292]. Les chiffres associés au sigle du descripteur indiquent le diamètre (en nombre de liaisons) d'exploration des atomes.

Les indices constitutionnels – Ces indices se basent sur des motifs sous-structuraux. Par exemple, l'approche des clés MDL, un descripteur moléculaire binaire développé par Molecular Design Limited qui code la présence ou l'absence de 166 sous-structures prédéfinies.

Les indices de propriétés – Ces indices décrivent les propriétés physicochimiques de la molécule. L'un des plus utilisés est le logarithme du coefficient de partage octanol-eau (logP).

2.2.1.5 Descripteurs obtenus à partir de la conformation 3D de la molécule

Les descripteurs 3D sont également appelés descripteurs géométriques. Ils proviennent en effet de la représentation des atomes de la molécule dans un repère cartésien selon les axes *x*, *y* et *z*. Ces descripteurs sont calculés à partir de la structure tridimensionnelle de la molécule [293], qui est déterminée soit par des méthodes de simulation informatique, soit par des méthodes expérimentales (par exemple par diffraction aux rayon X).

On distingue plusieurs familles de descripteurs 3D parmi lesquels on peut citer :

Les descripteurs pharmacophoriques - Les pharmacophores peuvent être définis comme un ensemble tridimensionnel de groupement fonctionnels, formant les conditions nécessaires, mais non suffisantes, pour l'activité biologique de la molécule. Bien que ces descripteurs soient employés principalement pour la conception moléculaire assistée par ordinateur, ils peuvent également être utilisés pour des calculs de similarité [294].

Les descripteurs faisant appel à la chimie quantique – Ces descripteurs permettent de quantifier différents types d'interactions inter- et intra-moléculaires, de grande influence sur l'activité biologique de molécules. Par exemple, les énergies de la plus haute orbitale moléculaire occupée (HOMO) et de la plus basse vacante (LUMO) sont des descripteurs fréquemment sélectionnés. Le moment dipolaire, le potentiel d'ionisation, et différentes énergies relatives à la molécule sont d'autres paramètres importants.

Les descripteurs spectroscopiques - Les molécules peuvent être caractérisées par des mesures spectroscopiques, par exemple par leurs fonctions d'ondes vibrationnelles. Les vibrations sont

une caractéristique fondamentale des molécules, qui dépendent de la masse des atomes et des forces d'interaction entre ceux-ci ; ces vibrations fournissent donc des informations sur la structure de la molécule et sur sa conformation. Les spectres infrarouges peuvent être déterminés soit de manière expérimentale, soit par calcul théorique, après recherche de la géométrie optimale de la molécule. Le descripteur EVA [295], par exemple, est basé sur les fréquences de vibration de chaque molécule.

2.2.1.6 Les descripteurs conformationnels (4D)

Les descripteurs conformationnels représentent l'arrangement spatial thermodynamiquement stable des atomes dans une molécule.

2.2.1.7 Les empreintes moléculaires (1D/2D/3D)

Les empreintes moléculaires (ou *fingerprints*) sont une classe de descripteurs très utilisés en chémoinformatique, notamment pour la recherche par similarité et pour les études de diversité. Un fingerprint est un vecteur de *bits* (ou valeurs binaires), chaque bit prenant la valeur 0 ou 1. Cette valeur code la présence ou l'absence de certains motifs (fragment structural, atome, liaison, etc.) et permet de représenter de façon compacte la structure chimique d'une molécule. Il existe deux grandes classes de fingerprints [296] : (1) les fingerprints basés sur un ensemble de motifs fixes préalablement établis et (2) les fingerprints hachés, dont le nombre d'éléments du vecteur n'est pas pré-déterminé.

Parmi les fingerprints basés sur un ensemble de motifs, on retrouve celui développé par Molecular Design Limited : le MDL Maccs Public Key. Lors de l'étude d'une nouvelle molécule, chacune des 166 sous-structures prédéfinies est recherché. Si le fragment est présent alors le bit correspondant prend la valeur de 1, et la valeur 0 sinon.

Les fingerprints hachés se basent eux sur le graphe moléculaire, et génèrent, de manière généralement exhaustive, une liste de fragments en utilisant des règles spécifiques de l'algorithme utilisé. Ils présentent donc l'avantage d'être spécifiques des molécules à décrire, plutôt que d'être une fonction d'une liste prédéfinie de fragments [297]. Parmi les plus utilisés, on peut citer les fingerprints ECFP et FCFP ou encore MOLPRINT2D.

2.2.1.8 Coefficient de similarité

Les molécules sont donc représentées en bits, ce qui permet d'associer à chaque molécule une représentation appelée *molecular fingerprint*. La comparaison entre deux molécules peut ensuite être réalisée par le calcul de coefficients de similarité.

Il existe plus d'une vingtaine de coefficients, mais celui de Jaccard/Tanimoto [298] est le plus utilisé en pratique. La similarité de Tanimoto entre deux objets A et B est donnée par le nombre de bits partagés entre les deux objets, normalisé par le nombre de bits égales à 1 dans l'un ou l'autre de ces objets :

$$T = \frac{c}{a + b - c}$$

Avec : a : nombre de bits présents seulement dans le *fingerprint* A
b : nombre de bits présents seulement dans le *fingerprint* B
c : nombre de bits en communs entre les *fingerprints* A et B.

Ce coefficient fournit une valeur comprise entre 0 (pas de similarité) et 1. Deux structures sont généralement considérées comme similaires quand T > 0,85.

2.2.2 Méthodes basées sur la structure du récepteur

La structure 3D du récepteur tient une position centrale pour expliquer l'activité biologique d'un composé. Prédire l'affinité d'un composé pour un récepteur peut ainsi servir à prévoir son activité biologique. Dans cette approche il faut disposer :

- de la structure 3D du récepteur,
- d'une technique de prédiction du positionnement du ligand dans le site actif (étape de *docking*),
- d'une méthode de prédiction de l'énergie d'interaction entre les deux structures (étape de *scoring*).

On distingue les méthodes interactives des méthodes automatiques [299]. Les premières reposent sur la génération des complexes ligand-cible avec la sélection d'une molécule potentiellement active. Des contraintes de distances entre des atomes du ligand et de la cible peuvent être appliquées. Ces méthodes, au cas par cas, permettent essentiellement de comprendre des mécanismes d'interactions entre le récepteur et le ligand. Au contraire, les méthodes automatiques permettent le criblage d'un grand nombre de ligands.

2.2.2.1 Détermination expérimentale de la structure

La première structure 3D expérimentale d'une protéine a été obtenue en 1958 [300]. Depuis 1971, la Protein Data Bank (PDB, www.rcsb.org/pdb/) [301] répertorie les informations structurales des macromolécules biologiques. À chaque structure de la PDB est assigné un code de quatre caractères - le PDB ID - servant de clé d'identification. En août 2017, la PDB contenait 134

436 structures expérimentales de protéines, groupées en 2 738 familles de structures et 1 375 repliements uniques (Statistiques PDB consultées en octobre 2017).

Le but des analyses expérimentales est d'obtenir une "image", ou plus précisément un jeu de coordonnées de la molécule étudiée. Pour ce faire, trois méthodes expérimentales peuvent être utilisées :

- la diffraction aux rayons X (RX),
- la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN),
- la microscopie électronique.

Ces approches peuvent être, en pratique, complémentaires [302].

La RMN est une branche de la spectroscopie fondée sur la propriété des noyaux atomiques, placés dans un champ magnétique, à absorber des fréquences spécifiques du rayonnement. En d'autres termes, des noyaux différents absorbent les énergies électromagnétiques à des fréquences qui leur sont propres. La RMN permet d'obtenir un ensemble de contraintes de distances inter-atomiques. En combinant ces contraintes spécifiques à la protéine avec des données génériques, il est possible d'obtenir une série de modèles satisfaisant ces contraintes. Le spectre RMN produit fournit des informations sur la conformation et la structure moléculaire et la dynamique interne de la molécule. La RMN s'applique aux molécules en solution donc a priori dans des conditions plus proches des milieux biologiques et permet d'étudier la structure dans un milieu dynamique. Comme la protéine n'est pas immobile en solution, la fluctuation du repliement engendre un ensemble de contraintes reflétant cette mobilité. C'est pour cette raison que la RMN propose un ensemble de modèles. La méthode était historiquement limitée aux petites molécules (< 25 kDa) mais les progrès techniques élèvent petit à petit cette borne [303].

Contrairement à la RMN, les macromolécules étudiées en RX ne sont pas en solution mais dans un réseau cristallin. La méthode peut être appliquée aux grosses molécules (> 100 kDa). Lorsque les rayons X frappent le cristal, les électrons entourant chaque atome diffractent le faisceau de rayons. Les données de diffraction permettent de générer la densité électronique en 3D dans le cristal.

La microscopie électronique à transmission (MET) génère un faisceau fixe d'électrons et permet de réaliser des études structurales sur des virus ou des complexes protéiques isolés. L'image est une projection 2D d'un échantillon en 3D. Il est possible, grâce à ce type de microscope et après traitement informatique des images, d'obtenir un modèle 3D d'objets

biologiques comme la capside de l'adénovirus. Cependant, une reconstruction 3D en MET ne permet que rarement d'avoir des informations structurales à l'échelle atomique sur l'objet que l'on étudie. Seulement 1 768 structures ont été résolues par microscopie électronique (Statistiques PDB consultées en octobre 2017).

2.2.2.2 Niveau de confiance des structures

Le contenu informationnel d'une structure est défini par sa résolution. La notion varie selon qu'il s'agisse de données de RX ou de spectroscopie.

Nous avons évoqué que les méthodes de RMN produisent une série de modèles. Plus les structures sont similaires, plus la valeur du RMSD (*root mean square deviation*) sera faible.

La résolution est une mesure de distance, en angstrœm (Å). C'est la distance minimale entre les atomes, qui peut être distinguée au cours de l'expérience de diffraction des rayons X. Les atomes séparés par une distance inférieure à la résolution maximale ne sont pas distingués sur la carte de densité électronique. Plus la distance est petite, meilleure est la résolution. Pour référence, une liaison covalente C-C mesure 1,5 Å. Aujourd'hui une structure à 2,7 Å, ou moins, est considéré comme de confiance suffisante [304].

2.2.2.3 Les modèles par homologie de séquence

Malgré le nombre croissant d'entrées dans la PDB, on constate une forte redondance de l'information. Le nombre de séquences d'acides aminés non redondantes est de plus de 554 000 en 2017, ce qui souligne l'écart entre les structures expérimentales déterminées et les séquences annotées disponibles.

En l'absence de structure expérimentale, les méthodes informatiques sont utilisées pour prédire le modèle 3D de protéines et donner un aperçu de leur structure et leur fonction. La modélisation par homologie permet de prédire la structure de la protéine cible à partir de sa séquence en acides aminés. La démarche est fondée sur le principe suivant : la structure tertiaire (agencement dans l'espace des hélices α et des feuillets β) est mieux conservée que la séquence. Cette affirmation, appuyée par des mesures expérimentales [305,306], est à la base de nombreuses discussions sur les protéines.

La modélisation par homologie de séquence suit une succession d'étapes (Figure 22), la première étant l'identification du *template*. Le *template* est une protéine homologue (c'est-à-

dire de séquence en acides aminés proche à celle étudiée), dont la structure 3D est connue. Le choix du *template* est crucial dans la démarche par homologie de séquence car il servira de fondation, de calque, pour la construction du modèle de la protéine d'intérêt. La recherche de protéines homologues est basée sur la comparaison des séquences d'acides aminés des protéines de structures connues avec la séquence d'acides aminés de la protéine que l'on veut construire. Plusieurs outils tel que Fasta (*Fast Alignment*), Blast (*Basic Local Alignment Search Tool*)[307] et HHsearch [308] sont disponibles pour aligner les séquences et ainsi rechercher le *template* à partir de la séquence de la protéine à étudier. Sont privilégiées les structures avec la plus grande homologie de séquence avec la séquence étudiée, ainsi que les modèles ayant la meilleure résolution.

La seconde étape est l'alignement entre la séquence de la protéine cible et celle du *template*. L'alignement généré par un programme peut être modifié manuellement afin de prendre en compte certaines informations, comme la conservation des structures secondaires. Les dernières étapes incluent la construction et la validation du modèle 3D de la protéine étudiée.

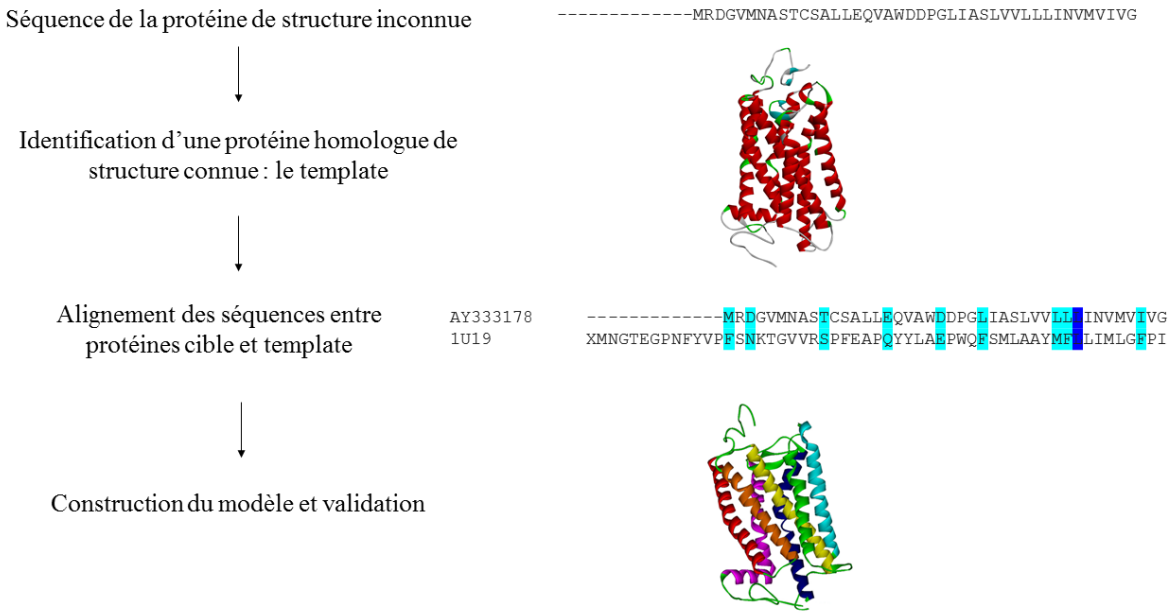


Figure 22. Illustration des étapes mises en œuvre lors de la démarche par homologie de séquence d'après Bishop et al. (2008) [309].

La construction d'un modèle par homologie possède plusieurs avantages. Il est en tout cas bien plus rapide d'effectuer les calculs que d'obtenir une structure expérimentale. C'est une méthode

rapide, permettant de débuter des simulations sans attendre de structure expérimentale. C'est aussi une méthode peu onéreuse qui s'affranchit des coûts liés à l'expérimentation, en exploitant les travaux déjà publiés. La modélisation par homologie peut donc contribuer grandement aux recherches. Cependant, la qualité et la précision du modèle dépendent de deux facteurs principaux : le niveau de résolution de la structure utilisée comme *template* et le degré d'identité de séquence entre la protéine cible et le *template* [309]. Si plus de 50 % de ces deux séquences sont identiques, les prédictions sont de très haute qualité : il a été montré que ces modèles sont aussi pertinents que des modèles RX à faible résolution. Entre 30 et 50 % d'identité de séquence, la position de 80 % des carbones α est estimée à moins de 3,5 Å de leur position réelle. À moins de 30 % d'identité de séquence, le risque que le modèle contienne des erreurs importantes augmente [310].

2.2.2.4 Prédiction de l'orientation du ligand par docking moléculaire

Le processus de docking (amarrage moléculaire en français) permet la prédiction de la conformation et du positionnement du ligand dans la poche du site actif.

Il existe plusieurs programmes commerciaux de docking, citons par exemple :

- Le programme de docking Glide [311], développé par la société Schrödinger (www.schrodinger.com/Glide/), utilise un algorithme de docking ayant pour principe une série de filtres appliqués successivement afin d'éliminer rapidement les conformations du ligand dont les interactions avec la protéine ne sont pas favorables.
- Le programme libre de docking AutoDock, développé par le groupe de Arthur J. Olson au "Scripps Research Institute" (www.autodock.scripps.edu/), est basé sur un algorithme génétique.
- Le programme commercial de docking GOLD (Genetic Optimisation for Ligand Docking [312]) développé par « Cambridge Crystallographic Data Center » (www.ccdc.cam.ac.uk/), utilise un algorithme génétique. Dans le cadre de nos travaux, nous utiliserons le programme GOLD.

2.2.2.5 Flexibilité

Le mécanisme de liaison du ligand à son récepteur a d'abord été considéré comme un processus statique. Le ligand de forme complémentaire au récepteur constitue une clé capable d'ouvrir

une serrure (modèle « lock-and-key ») [313]. Ces modèles qui considèrent le ligand et la protéine comme rigides peuvent correctement prédire la structure de certains complexes mais ne peuvent décrire tous les aspects des interactions ligand/récepteur [314]. Les algorithmes de recherche permettant de traiter la flexibilité du ligand peuvent être classés en trois grandes catégories : les algorithmes de recherche systématique, les algorithmes de recherche aléatoire (ou stochastique) et les algorithmes de recherche déterministe ou de simulation dynamique [315].

La prise en compte de la flexibilité du ligand est maintenant classiquement proposée par les logiciels. Elle permet d'explorer les conformations adoptées par le ligand lors de la fixation au site de liaison. Les algorithmes stochastiques procèdent à des changements aléatoires en termes de translations, rotations et torsions ce qui génère de nouvelles conformations de ligands. Les changements sont acceptés, ou rejetés, à l'aide d'une fonction de probabilité. Quatre types d'algorithmes appartiennent à cette classe : les méthodes de Monte-Carlo, les algorithmes génétiques, les algorithmes de recherche tabou et les algorithmes d'optimisation en essaim. Le processus de docking du logiciel GOLD est dirigé par un algorithme génétique afin de gérer la flexibilité des ligands. L'algorithme génétique utilise la notion de sélection naturelle définie par Charles Darwin, pour ne garder que les meilleurs résultats à chaque étape de la recherche. L'organisation d'un ligand en complexe avec un récepteur peut être définie par un jeu de paramètres, ou *gènes*, décrivant la position, l'orientation et la conformation du ligand par rapport au récepteur. Plusieurs conformations potentielles d'un ligand sont générées aléatoirement. Chaque état défini du ligand est assimilé à un *chromosome* portant des informations sur les différents *gènes*. Une fonction de score, appelée fonction de survie ou « fitness function » permet de déterminer dans la population initiale les meilleures conformations qui constituent les *chromosomes parents*. Des paires aléatoires d'individus sont combinées (*crossover*) pour donner des individus *enfants* qui héritent de gènes provenant de leurs deux parents. De plus, certains *enfants* peuvent être le résultat de mutations où un gène est modifié de façon aléatoire. La sélection des individus *enfants* constituant la nouvelle génération est basée sur la qualité de leur interaction avec le récepteur : les solutions qui s'ajustent aux mieux au récepteur de leurs parents persistent alors que les autres disparaissent. La fonction de survie et les opérateurs génétiques sont appliqués jusqu'à l'obtention d'une population satisfaisante.

La flexibilité de la protéine reste plus complexe à appréhender et les algorithmes de docking ne prennent pas, ou peu, en compte la flexibilité de la protéine. Les études par cristallographie aux RX et par spectroscopie RMN fournissent une première idée sur le fonctionnement des protéines mais il s'agit cependant d'une vision statique et limitée de systèmes dynamiques. Les mouvements internes des macromolécules sont importants pour les processus comme la liaison au ligand, la reconnaissance inter-molécules ou l'action de catalyse des enzymes [316,317]. Les mouvements atomiques sur une courte échelle de temps (pico et nanosecondes) servent d'intermédiaires aux mouvements plus lents et à plus grande échelle (milliseconde) [318]. Les méthodes de simulations informatiques de dynamique moléculaire aident donc à obtenir les informations qui ne peuvent être obtenues par les techniques expérimentales. Les premières simulations de dynamique de protéines datent de 1977, avec la simulation de 9 picosecondes de l'état natif de l'inhibiteur de trypsine pancréatique bovine [319]. Parmi les méthodes de simulations, celles de Dynamique Moléculaire (DM) et de Monte Carlo (MC) sont les plus courantes [320]. Certains logiciels de docking permettent également, et c'est le cas du logiciel GOLD, la prise en compte de la flexibilité des chaines latérales de quelques résidus de la protéine pendant le docking, alors que la DM permet de traiter la flexibilité de la protéine en amont de l'opération de docking.

2.2.2.6 La simulation par dynamique moléculaire

De manière générale, les simulations par dynamique moléculaire ont recours à des approches théoriques permettant de décrire les variétés de mouvement qu'effectuent les molécules en solution, en fonction du jeu de coordonnées initiales de la molécule étudiée et de l'énergie d'interaction des atomes selon leurs positions relatives [321]. La DM permet actuellement de simuler l'évolution d'une molécule sur plusieurs microsecondes.

Minimisation - Afin d'éviter de générer des trajectoires aberrantes (quand les forces initiales sont trop importantes), il est nécessaire de « minimiser » l'énergie totale du système. La minimisation est une étape préalable à toute simulation par dynamique moléculaire. Dans les programmes de DM, la minimisation a essentiellement pour but d'ajuster la structure initiale d'une molécule (longueurs et angles de liaisons) et d'éliminer les contacts stériques importants. Plusieurs méthodes de minimisation sont utilisables (*e.g.* la méthode de la plus grande pente *« steepest descent »*, ou celle des gradients conjugués), seules ou de façon consécutive.

Conditions Périodiques - Pour réaliser une simulation de dynamique moléculaire en milieu de solvant explicite, il est nécessaire de définir une boîte de simulation contenant les molécules de

solvant (eau et ions). La forme la plus courante pour cette boîte est le parallélépipède rectangle. Dans les simulations des macromolécules en solution, la taille finie du système pose des problèmes d'effets de bords à l'interface avec le vide environnant. Les conditions périodiques sont utilisées afin d'éviter les effets de bord, tout en ayant un système contenant un nombre fini de particules. Dans ce cas, les molécules de solvant sont placées dans une boîte qui est répliquée dans toutes les directions de l'espace de manière à créer un système de dimension infinie.

Dynamique Moléculaire - Une fois donnée une position initiale, les étapes de la dynamique sont générées par intégration des équations de mécanique newtonienne :

$$F_i = m_i \times a_i$$

L'algorithme permet de calculer au temps t l'accélération a_i s'appliquant sur chaque atome i de masse m_i. À partir de la position de la particule i à l'instant t, on peut déterminer les positions aux instants ($t \pm \Delta t$) où Δt représente le pas d'intégration. Pour cela, on utilise un algorithme de Verlet [322] obtenu à l'aide d'un développement de la série de Taylor.

Champs de force - Un champ de force est un jeu de paramètres et d'équations décrivant les interactions entre :

- Les atomes liés : ces interactions correspondent à des énergies de déformation des liaisons, des angles de valence, des angles de torsion et des angles dièdres impropres.
- Les atomes non liés dans un système moléculaire : les interactions entre atomes non liés sont représentées par les énergies de van der Waals et électrostatiques ainsi que par l'énergie des liaisons hydrogènes.

Les champs de forces sont utilisés pour les étapes de minimisation et de DM.

Nos simulations de dynamique moléculaire ont été effectuées avec le programme CHARMM (Chemistry and HARvard Molecular Mechanism) et le champ de force CHARMM36 [323].

2.2.2.7 Estimation de la force de liaison par scoring

Le succès de la démarche de docking repose, entre autres, sur l'existence de fonctions de score permettant de classer les différentes poses des ligands dans le récepteur (par pose on entend les spécifications sur la position relative et l'orientation du ligand dans le site actif, ainsi que sa conformation rotamérique). Le score est une donnée numérique qui estime la force de la liaison, en général non covalente, entre le ligand et le récepteur.

Expérimentalement la force de la liaison, ou affinité, peut être mesurée par une constante d'association K_a ou de dissociation K_d.

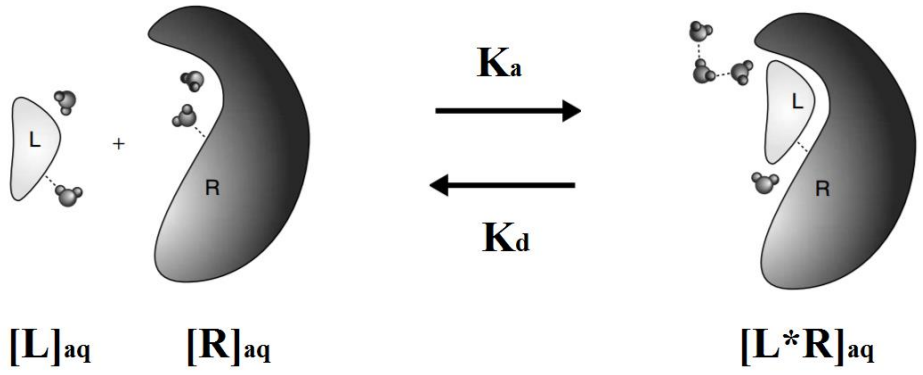


Figure 23. Formation d'un complexe ligand-récepteur et les constantes associées à cette formation.

*Avec : K_a : constante d'association = [L*R] / [L] + [R]*
K_d : constante de dissociation = 1 / K_a

Les interactions entre la protéine et le ligand sont également caractérisées par l'énergie libre, l'entropie et l'enthalpie associées à la réaction de liaison. Les méthodes informatiques cherchent ainsi à estimer l'affinité grâce à la variation de l'énergie de Gibbs ΔG :

Équation 1

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

Avec T la température en Kelvin. La variation de l'enthalpie ΔH est liée à la variation de l'énergie totale du système. L'entropie S représente, en thermodynamique, le degré de désordre de ce système et est pondérée par la température T. La relation entre l'énergie de Gibbs et la constante d'association est indiquée dans l'équation 2 :

Équation 2

$$\Delta G = -RT \ln K_a$$

Avec R la constante des gaz parfaits. L'équation 2 souligne le lien entre l'énergie de Gibbs et l'affinité du ligand pour le récepteur. La liaison entre le ligand et la protéine n'a lieu que si ΔG est négative [324]. Une augmentation de l'entropie signifie une diminution de l'enthalpie et a pour conséquence l'amélioration de l'affinité entre la protéine et le ligand.

Une fonction de scoring cherche donc à estimer les valeurs ΔG. Le score permet d'une part de retenir la meilleure pose parmi toutes celles proposées pour un ligand, mais également de

classer les meilleures poses de différents ligands afin d'identifier les meilleurs d'entre eux. Plus que les faux-négatifs, ce sont les faux-positifs (*i.e.* avec un bon score mais une faible affinité) qui sont problématiques dans la démarche [325,326], et les fonctions de scores doivent limiter au maximum leur apparition.

Trois classes de fonctions de scores peuvent être distinguées : les fonctions empiriques, les fonctions fondées sur les champs de force de mécanique moléculaire et les fonctions de type « knowledge-based » [327]. Enfin, plusieurs fonctions de score de nature différente peuvent être combinées pour former des fonctions de score dites *consensus* [328].

1. **Les fonctions empiriques** estiment l'énergie de liaison ΔG par addition d'un ensemble de termes connus pour jouer un rôle sur la formation du complexe ligand -récepteur, comme par exemple les liaisons hydrogènes ou les contacts hydrophobes entre le ligand et la protéine. Chacun de ces termes est pondéré par un coefficient issu de régressions sur des complexes protéine-ligand pour lesquels les données d'affinités et les structures 3D sont connues expérimentalement [329].
2. **Les fonctions de score basées sur les champs de force**, déterminées par mécanique moléculaire, somment l'énergie d'interaction ligand-récepteur et l'énergie interne du ligand [327]. Les calculs prennent notamment en compte les énergies d'interactions électrostatiques et de van der Waals. Pour des raisons de temps de calculs, ces méthodes sont peu utilisées pour le criblage de grandes banques de données [330].
3. **Les fonctions de score de type « knowledge-based »** reposent sur le même principe de reproduction de données expérimentales que les fonctions de score empirique. Cependant, les fonctions de score basées sur les connaissances ne s'intéressent pas à l'énergie de liaison. Elles sont développées à partir de l'analyse statistique de structures de complexe ligand-protéines expérimentales. L'hypothèse est que les interactions entre les paires d'atomes protéine/ligand les plus fréquemment observées sont les plus favorables pour la stabilité du complexe [331].

Le logiciel GOLD, que nous utiliserons, propose quatre fonctions de score différentes. La fonction de score « ChemScore » issue des données d'affinité connues pour 82 complexes ligand-récepteur [332] et la fonction de score « ChemPLP » [333] sont toutes deux de type empirique. La fonction de score « ASP (Astex Statistical Potential) » est de type « *knowledge-based* », et la fonction de score « GoldScore » est fondée sur les champs de force de mécanique

moléculaire. C'est cette dernière que nous avons utilisée dans nos travaux. Cette fonction prend en compte quatre éléments : l'énergie des liaisons hydrogènes, et de van der Waals, entre le ligand et la protéine, l'énergie interne de van der Waals et les contraintes de torsions pour la conformation du ligand (Équation 3) :

Équation 3

$$GoldScore = -(1.375 \times S_{wdv_ext} + S_{H_ext} + S_{vdw_int} + S_{int_tor})$$

Avec : S_{H_ext} scores des liaisons hydrogènes entre la protéine et le ligand.
S_{vdw_ext} scores des liaisons de van der Waals entre la protéine et le ligand.

Le score S_{vdw_ext} est multiplié par 1,375, un facteur de correction empirique utilisé pour valoriser les contacts hydrophobes. Pour la conformation du ligand, S_{vdw_int} et S_{int_tor}, correspondent aux scores associés aux énergies de liaisons de van der Waals et aux contraintes de torsions [334]. Un cinquième élément, l'énergie intramoléculaire des liaisons hydrogènes du ligand, peut être ajouté.

2.2.3 La procédure de criblage GOLD

Dans le but de trouver de nouvelles molécules contre le varroa, nous avons exploité la banque de molécules présente au laboratoire. La chimiothèque du CERMN correspond actuellement à une banque de plus de 17 000 composés issus des travaux du laboratoire (dont 9 788 disponibles au démarrage des travaux). Le criblage permet de docker chaque molécule dans le modèle 3D du récepteur, et de les classer selon leur score. Plus la valeur de ce score est élevée, plus le logiciel prédit une forte affinité de la molécule pour le récepteur. Le criblage a été réalisé grâce au logiciel de docking GOLD [335] en appliquant la fonction de score GoldScore (GS).

La version informatique de la chimiothèque est une version brute (structures en 2D des molécules) qui nécessite une préparation avant de pouvoir être utilisée pour un criblage. Cette préparation a été faite grâce au logiciel ChemAxon (www.chemaxon.com/). Ce logiciel comporte plusieurs fonctions et outils, dont Standardizer (JChem Suite) qui a été utilisé pour ajouter les hydrogènes, aromatiser les cycles des structures, retirer les fragments qui ne font pas partie de la molécule (en cas de substances sous formes de sels) et générer les structures 3D de chaque molécule à partir de la structure 2D. La protonation des molécules (transfert de proton H^+) joue un rôle important dans les interactions protéine/ligand. Cette protonation a été prédite au pH physiologique de 7,4 grâce à l'application Cxcalc de ChemAxon.

Une fois les modèles 3D du récepteur étudié, et les molécules de la chimiothèque préparées, le criblage peut débuter. Les résultats finaux dépendent cependant du paramétrage défini sur GOLD. Deux paramètres sont notamment essentiels :

- la définition du site actif où vont se docker les molécules,
- la sélection, ou non, d'acides aminés flexibles.

Ces paramètres sont définis au cas par cas, en fonction des connaissances disponibles sur le récepteur.

2.3 Tests *in vitro*

Les tests *in vitro* permettent de vérifier l'activité des molécules candidates sur la cible étudiée. Dans le cadre de nos travaux, l'approche présente également l'avantage d'être indépendante de la saison, alors que les tests *in vivo* ne peuvent être réalisés que pendant la saison apicole.

L'inhibition de l'AChE a été utilisé de nombreuses fois chez l'abeille, comme biomarqueur , afin d'évaluer les effets délétères de pesticides [336–338]. Généralement, les tests *in vitro* développés sur abeilles le sont dans le cadre d'une démarche d'évaluation des risques engendrés par les produits phytosanitaires. Un test *in vitro* sur larves a été développé par Aupinel *et al.*, (OCDE 237, 2013) et permet d'établir pour un produit donné, la dose à partir de laquelle ce produit présente une toxicité aigüe larvaire. Plus récemment, l'unité Abeille & Environnement de l'INRA d'Avignon [339] a contribué au développement d'un test *in vitro* sur ovocytes d'amphibiens exprimant des canaux sodiques d'abeilles ciblés par les principaux insecticides neurotoxiques. Il n'existe, à notre connaissance, aucun test *in vitro* développé sur varroa et/ou dans le cadre d'une démarche *drug-design* abeille versus varroa.

2.3.1 Test d'inhibition de l'acétylcholinestérase

Le test d'inhibition de l'AChE a été mis en place au laboratoire et utilisée sur l'abeille et sur le varroa. Il a pour objectif de mesurer l'inhibition de l'AChE par un composé. Le protocole est dérivé de la méthode d'Ellman [340], qui est la méthode standard utilisée pour détecter et quantifier une inhibition de l'AChE. Le principe se fonde sur le clivage de l'acétylthiocholine par l'AChE ; cette réaction produit de la thiocholine. Le réactif d'Ellman, ou DTNB (5, 5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)), réagit avec l'extrémité -SH libre et se clive pour donner un produit coloré jaune à 412 nm : le TNB. Cette réaction a été adaptée pour un usage en microplaques à 96 puits, permettant l'analyse simultanée d'un grand nombre d'échantillons tout en réduisant la quantité de réactifs.

Les abeilles utilisées pour les tests étaient issues des colonies du laboratoire, les varroas provenaient du couvain de divers ruchers du Calvados (voir §2.4 pour la récolte de varroas). Les animaux ont été tués dans l'azote liquide, puis ont été conservés à -20 °C jusqu'aux analyses. Les têtes d'abeilles, ou les varroas entiers, ont été broyés manuellement dans du tampon Tris (10 mM, pH : 7,0) contenant 1 M de NaCl, 1 mM d'ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) et 1 % (w/v) de Triton X-100. Les proportions ont été d'une tête, ou cinquante varroas, pour 1 mL de tampon. Les broyats ont été centrifugés à 15 000 G pendant 15 minutes, à 4 °C. Les surnageants étaient utilisés immédiatement pour les tests.

Les composés testés ont été solubilisés à 10^{-2} M dans du diméthyle sulfoxyde (DMSO). Du tampon phosphate (0,1 M, pH = 7,4) a été utilisé pour les dilutions successives. Pour l'étape de criblage, les molécules ont été testées à 10^{-4} M. Chaque puits contenait 50 µL de la solution de la molécule à tester, 150 µL d'un mélange de surnageant et de DTNB (concentration finale de DTNB : 0,4 mM).

Les analyses ont été faites à 412 nm par un lecteur de microplaque Tecan Infinite. Une lecture de l'absorbance avant le début de la réaction a permis de corriger chaque puits par son absorbance au temps zéro (T0). Ensuite, 50 µL d'une solution d'acétylthiocholine 1 mM étaient ajoutés automatiquement par le lecteur de microplaque, afin de débuter la réaction. L'inhibition a été évaluée par la lecture de l'absorbance à 412 nm, cela 30 minutes après l'ajout de l'acétylthiocholine pour le varroa et 10 minutes pour l'abeille.

Un blanc, pour lequel un volume de 50 µL de tampon phosphate remplaçait les molécules à étudier, a servi à corriger l'absorbance selon l'équation suivante :

$$Inhibition\ (\%) = \frac{Abs_{blanc} - Abs_{corr}}{Abs_{blanc}} \times 100$$

Avec Abs_{blanc} : absorbance du blanc corrigée par son absorbance à T0
Abs_{corr} : absorbance corrigée par l'absorbance à T0 du puits

Le formétanate a été systématiquement utilisé comme témoin positif. Le test est validé si le formétanate inhibe au minimum 80 % l'AChE du varroa et 90 % l'AChE de l'abeille. Un pourcentage d'inhibition de l'enzyme du varroa supérieur à 30 %, couplé d'une faible inhibition de l'AChE de l'abeille, sont recherchés. Ce protocole a été utilisé pour tous les tests d'inhibition de l'AChE réalisés au cours de cette thèse.

2.3.2 Test de liaison aux récepteurs à l'octopamine

La première option est un test de liaison par compétition au récepteur par scintillation liquide. Le test permet de savoir si la molécule candidate se fixe au récepteur, grâce à une mesure de radioactivité [^{3}H]-octopamine. La seconde option permet de savoir si la molécule est active, par une mesure de la production d'AMP_c. Aucune des méthodes n'est décrite actuellement chez le varroa. Le développement d'un test *in vitro* spécifique pour cette cible a été envisagé au sein du laboratoire, mais cette option n'a finalement pas été retenue, pour des raisons de coût et de temps.

2.4 Tests *in vivo* sur abeilles et varroas

Une partie essentielle de nos travaux a été l'évaluation expérimentale de l'efficacité des molécules par les tests *in vivo*. L'objectif est d'évaluer l'efficacité des molécules candidates sur des varroas vivants. Trois paramètres principaux sont à fixer :

1. L'origine des varroas.
2. La nourriture fournie aux varroas.
3. Le mode d'exposition à la substance.

2.4.1 Récoltes de varroas dans le couvain

Le premier paramètre, c'est-à-dire l'origine des varroas, est fixé par les contraintes techniques d'accès à des colonies contaminées et de météorologie. De manière générale, les varroas peuvent être récupérés dans du couvain ou sur des abeilles adultes.

L'extraction de varroas du couvain, grâce à la participation d'apiculteurs de la région, a été utilisée pour les tests réalisés au CERMN. Afin d'organiser la récolte, une réunion a été organisée annuellement, en fin d'hiver, avec les apiculteurs volontaires. Début avril, trois cadrons (128 x 104 mm) ont été introduit dans chaque colonie par les apiculteurs. À cette période de l'année, les ouvrières construisent préférentiellement des cellules pour couvain de mâles, et la ponte de la reine a repris activement. Une fois les cellules de couvain operculées, les cadrons ont été apportés directement au laboratoire, et placés en couveuse (34 °C) jusqu'au moment de la désoperculation. Les cellules de couvain ont été ouvertes une à une, les abeilles extraites et les varroas présents recueillis à l'aide d'une pince. Cette approche a permis la récolte d'un grand nombre de varroas (Tableau 3).

Tableau 3. Bilan des récoltes de varroas dans le couvain grâce à la participation volontaire d'apiculteurs. Le nombre de varroas correspond aux femelles adultes uniquement.

	Année 2014	Année 2015	Année 2016
Nb apiculteurs	7	13	11
Nb cellules ouvertes	12 671	15 005	6 609
Nb varroas	1 989	3 242	1 658

L'envoi de couvain par colis a été mise en place en partenariat avec Vétopharma. Le trajet est cependant inadapté pour du matériel biologique aussi fragile que du couvain et cette démarche a été abandonnée.

2.4.2 Récolte de varroas phorétiques

Les tentatives de récoltes de varroas phorétiques menées dans des ruchers du Calvados ont montré la limite de la démarche : faibles rendements, distances à parcourir et problématiques pour le rapatriement des varroas. Les tests *in vivo* ont donc été menés au laboratoire de Wyjolab à Chaillac (36) notamment avec l'aide de Gaël Charpentier. Le site est le lieu de production des lanières anti-varroas, et la société Vétopharma y maintient également une centaine de colonies. Un protocole de « concentrateurs à varroas » permet, depuis l'été 2016, l'obtention d'un grand nombre de parasites dans une même colonie, et de ce fait, d'un nombre suffisant de varroas phorétiques pour tester *in vivo* les molécules.

2.4.3 Maintien des varroas au laboratoire

Les varroas ne peuvent être nourris qu'avec l'hémolymphe d'abeilles vivantes. Un dispositif de nourrissement à travers une membrane en polymère de chitosan a été breveté [341] mais n'est pas disponible pour les tests en routine. Les abeilles utilisées pour maintenir en vie les varroas peuvent être au stade larvaire, nymphale ou adulte. Le stade larvaire, trop délicat à manipuler, n'a pas été retenu pour nos essais.

Les premiers tests ont été mis en œuvre avec des varroas récoltés dans le couvain, et nourri avec des nymphes. La molécule à tester était alors solubilisée, puis déposée dans des boîtes de Pétris. Une fois le solvant évaporé, les varroas étaient exposés par contact pendant quatre heures avant d'être transférés en boîtes de Pétris propres. La récolte de varroas dans le couvain est cependant chronophage, et trop aléatoire pour l'obtention d'un nombre journalier de varroas suffisant pour

le lancement de tests *in vivo*. Les varroas de couvain ont donc été congelés pour servir aux tests *in vitro*.

Un protocole de test en cagettes a finalement été mis au point. Les tests en cagette permettent d'utiliser des varroas phorétiques. La source de nourriture des varroas se trouve dans des ouvrières adultes d'âge indéterminé, récupérées dans les colonies en parallèle de la récolte des varroas phorétiques.

2.4.4 Protocole du test en cagettes

Les tests *in vivo* sont réalisés en cagettes (Figure 24 C) dans lesquelles sont introduits dix ouvrières et dix varroas phorétiques. Les animaux sont récupérés le matin même pour chaque jour d'expérimentation. Le dispositif présente l'avantage de tester l'efficacité des molécules sur le varroa, et de vérifier simultanément leur innocuité à court terme sur l'abeille.

Les varroas sont récupérés dans les colonies « concentrateurs à varroas » grâce à du sucre glace. Pour cela, des paquets d'abeilles sont versés dans un shaker à deux compartiments (Figure 24 A), séparés par une grille de mailles permettant le passage des varroas mais pas celui des abeilles. Les abeilles sont secouées plusieurs minutes en présence de sucre glace, le sucre ayant pour fonction de décrocher les varroas phorétiques. Un tamis sert à récupérer les varroas et à les séparer grossièrement du sucre (Figure 24 B). Les varroas récoltés sont rapidement rapportés au laboratoire, séparés du sucre glace restant et déposés, à température ambiante, sur un linge humide jusqu'au début de l'exposition en cagette.

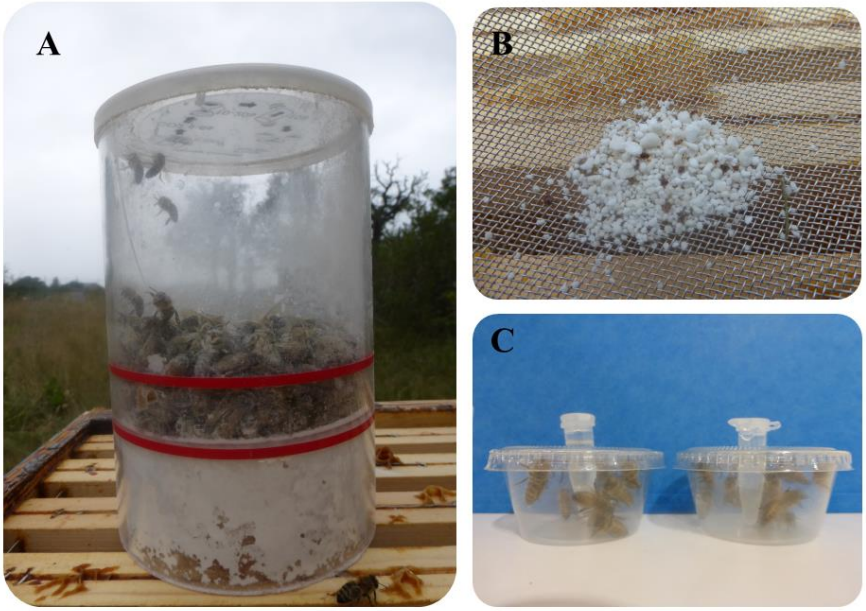


Figure 24. Illustration des tests in vivo. A : shaker (fournisseur : Icko-apiculture, référence produit : GB025) utilisé pour décrocher les varroas des abeilles avec du sucre glace. B : tamis avec varroas dans du sucre glace. C : cagettes utilisées pour les tests in vivo. Photographies personnelles.

Les abeilles sont récoltées en parallèle des varroas, dans des colonies saines. De retour au laboratoire, l'endormissement des abeilles est une étape indispensable pour faciliter le dépôt thoracique de la substance testée, et la répartition des abeilles dans les cagettes. À ce jour, deux méthodes ont pu être utilisées dans le cadre de nos tests :

1. Endormissement par le froid : passage successif au réfrigérateur (temps indéterminé) puis au congélateur (quelques minutes, en fonction du nombre d'abeilles à endormir)
2. Endormissement au CO_2 : les abeilles sont exposées à un flux de CO_2 (3 L.heure^{-1}) pendant 20 secondes, puis conservées 2 minutes dans un récipient hermétique ; protocole mis en place par Testapi (SARL expérimentations apicoles, études résidus et consultance).

La première méthode, pratiquée au laboratoire du CERMN, présente deux inconvénients. D'une part elle n'est pas reproductible selon un protocole précis car elle dépend i) de la température du réfrigérateur utilisé et ii) du nombre d'abeilles présentes. D'autre part, il existe un taux de mortalité des abeilles lié à la procédure, d'environ 10 %. La méthode au CO_2 pallie ces deux inconvénients, mais le réveil des abeilles est trop rapide pour permettre le retrait des varroas

présents avant le début de l'expérience. L'endormissement au CO_2 a été la méthode utilisée pendant les campagnes d'expériences sur le site de Chaillac.

Dans chaque cagette sont introduites dix abeilles avant leur réveil, et dix varroas. Un tube Eppendorf percé, contenant du sirop sucré (50 % m/v) permet de nourrir *ad libitum* les abeilles.

Les pourcentages de mortalité à 24 heures sont déterminés en appliquant la correction d'Abbott selon l'équation suivante :

$$Mortalité\ corrigée = \frac{V_{témoin} - V_{test}}{V_{témoin}}$$

Avec $V_{témoin}$: nombre d'individus vivants à 24 heure dans les boîtes témoins
V_{test} : nombre d'individus vivants à 24 heures pour la molécule étudiée

Une mortalité moyenne des varroas de 30 % est tolérée dans les témoins, pour répondre à la forte variabilité observée chez les témoins ; au-delà le test n'est pas validé. Le dépôt de 0,1 µg d'amitraze par abeille sert de témoin positif.

Chapitre 3
L’acétylcholinestérase

3.1 Introduction

Les enzymes sont classées selon le type de réaction qu’elles catalysent. Il existe 6 grandes familles, dont la nomenclature est indiquée entre parenthèses, à savoir les oxydoréductases (1.), les transférases (2.), les hydrolases (3.), les lyases (4.), les isomérases (5.), et les ligases (6.). Les estérases (3.1) appartiennent à la famille des hydrolases. L’acétylcholinestérase (E.C.3.1.1.7) est une estérase. La découverte de l’acétylcholinestérase (AChE) découle des travaux de Sir Henry Dale et du Pr. Otto Loewi, qui partagèrent en 1936 le prix Nobel de physiologie et de médecine pour leurs travaux sur la neurotransmission chimique.

3.1.1 Rôle biologique

La plupart des neurotransmetteurs (par exemples : la dopamine, la noradrénaline, le glutamate, la sérotonine) sont retirés de la fente synaptique par recapture à l'aide de transporteurs protéiques spécifiques [342]. La transmission cholinergique en revanche fait appel à l'AChE pour hydrolyser l'acétylcholine (ACh, Figure 25).

L'acétylcholine est synthétisée dans le cytosol des neurones cholinergiques, à partir de choline et d'acétylcoenzyme A [343]. L'ACh est une petite molécule (PM : 146,2 $g.mol^{-1}$) qui présente une fonction ester et une fonction ammonium quaternaire. On constate une charge formelle positive portée par l'atome d'azote [149], particularité essentielle aux interactions avec le récepteur.

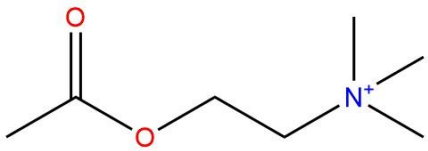


Figure 25. Structure de l'acétylcholine

L'ACh joue un rôle crucial dans les systèmes nerveux centraux et périphériques. Chez les insectes, l'ACh a également depuis longtemps été détectée au niveau du système nerveux central. L'ACh est le neurotransmetteur excitateur le plus abondant dans le cerveau des insectes [344].

Les récepteurs post-synaptiques capables de lier l'ACh sont classés en deux types : les récepteurs nicotiniques et muscariniques (Figure 26). La transduction de l'ACh semble être principalement liée à l'action sur les récepteurs muscariniques chez les vertébrés. Chez les insectes, l'action se fait essentiellement via les récepteurs nicotiniques [345]. Chez l'abeille, l'activation de ces récepteurs est impliquée à la fois dans les fonctions motrices et dans les mécanismes de mémorisation, d'apprentissage et d'olfaction [346–348]. Des marquages immuno-histochimiques ont montré la présence d'ACh au niveau de structures impliquées dans le traitement des informations olfactives et gustatives, dans les processus cognitifs (corps pédonculés, lobes antennaires et ganglion sous-œsophagien) [349]. La transmission des informations olfactives traitées par les lobes antennaires jusqu'aux calices des corps pédonculés repose donc sur une neurotransmission cholinergique.

Après son action de messager, l'ACh doit être rapidement dégradée pour éviter tout blocage de l'influx nerveux, qui provoquerait la paralysie puis la mort de l'individu. C'est l'acétylcholinestérase qui remplit ce rôle.

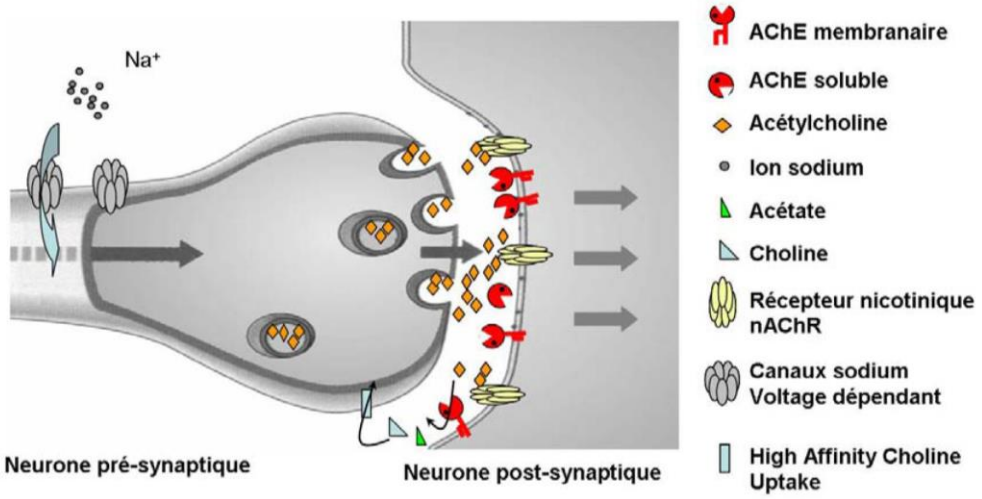


Figure 26. Hydrolyse de l'acétylcholine par l'AChE au niveau de la synapse cholinergique [350]

L'AChE est une protéine appartenant à la famille des sérines hydrolases. L'acétylcholinestérase a une très grande efficacité, avec une constante de catalyse (k_{cat}) de 10^3 - 10^4 s^{-1}, correspondant au nombre de molécules d'ACh qui peuvent être hydrolysées par seconde. L'AChE permet une repolarisation de la membrane de la cellule post-synaptique en l'espace d'environ 1 ms. La vitesse d'hydrolyse est liée avec la structure de l'enzyme, qui est détaillée plus loin. Chez l'abeille, l'AChE est principalement localisée dans la tête [351].

3.1.2 Polymorphisme structural

3.1.2.1 De la structure…

L'AChE se présente sous différentes formes structurales qui correspondent à diverses structures quaternaires et types d'ancrages à la membrane. Dans les tissus musculaires des vertébrés, l'AChE existe sous deux formes : globulaires et asymétriques [352]. Les différentes formes moléculaires de l'enzyme peuvent être caractérisées sur gradient de saccharose [353]. Les formes globulaires sont constituées de monomères (G_1), dimères (G_2) et tétramères (G_4) ; elles peuvent être hydrophile, ou amphiphile, et alors liées à la membrane cellulaire par un domaine non catalytique hydrophobe ou un ancrage de type glycophosphatidyl inisitol [354]. Les formes asymétriques (A_4, A_8, A_{12}) sont attachées par une queue collagénique et sont constituées d'un à trois tétramères catalytiques [355].

Chez les insectes, seules les formes globulaires semblent présentes [356]. De manière générale, la présence des formes asymétriques n'a été montrée que chez les vertébrés [354]. Le polymorphisme

de l'AChE d'abeille, solubilisée en présence et en absence de détergent (Triton), a été révélé par la présence d'une forme soluble et d'une forme membranaire, cette dernière étant la forme majoritairement présente dans la tête des abeilles, représentant 94 à 97 % de l'activité cholinestérasique totale [357]. Les travaux de Badiou [350] ont par la suite montré l'existence de deux fractions d'AChE membranaire, désignées $AChE_{m1}$ et $AChE_{m2}$ pour AChE membranaire 1 et 2. L'analyse électrophorétique des formes d'$AChE_{m1}$, d'$AChE_{m2}$ et de l'AChE soluble montre une masse moléculaire de 66 kDa pour chacune des formes.

3.1.2.2 …aux gènes

Chez les vertébrés, l'AChE est codée par un gène unique, qui peut cependant engendrer plusieurs variants par épissage alternatif dans la région 3' des transcrits [358]. Ces variants ont la même activité catalytique d'hydrolyse de l'acétylcholine, mais déterminent la localisation fonctionnelle de l'AChE, soit en assurant son ancrage dans les membranes cellulaires soit en l'intégrant dans la matrice extracellulaire.

Les mouches cyclorrhaphes (Diptera: Muscomorpha), telles que la drosophile, possèdent un seul locus pour le gène *ace* codant pour l'AChE. En revanche ce gène est dupliqué chez certains arthropodes (insectes, arachnides) et chez les nématodes. Les nématodes et arachnides peuvent avoir de multiples loci pour le gène *ace*. Chez les insectes, il peut exister deux loci (*ace1* et *ace2*), codant pour deux enzymes AChEs distinctes. L'un de ces gènes est un orthologue au gène de la drosophile (*DmAChE*, GenBank : AAF54915.1), l'autre est un paralogue [i]. Les fonctions majeures dans le système cholinergique peuvent être attribuées à l'une ou l'autre des AChEs selon les espèces d'insectes [359].

3.1.3 Structure tridimensionnelle générale

La première structure 3D d'AChE a été résolue pour la raie électrique *Torpedo californica* (*Tc*AChE) en 1991 avec une résolution de 2,8 Å [360]. Ce poisson fut choisi pour son organe électrique où l'AChE est présente en quantité importante sous la forme d'un homodimère lié à la membrane. Ont suivi une série de structures de *Tc*AChE en complexe avec divers inhibiteurs, ainsi que les structures de l'AChE de la drosophile *Drosophila melanogaster* [361] (Figure 27), de la souris *Mus musculus* [362] et de l'humain [363]. La PDB compte à ce jour 199 entrées correspondant à l'AChE pour sept organismes.

[i] Parmi les gènes homologues on distingue les gènes orthologues, issus de la spéciation, des gènes paralogues issus d'un évènement de duplication

L'AChE appartient à la classe des protéines α/β [364], dont chaque monomère est constitué par l'alternance de onze feuillets β et quatorze hélices α. Les dimères sont formés par l'association de deux monomères, reliés par un empilement de quatre hélices α (« four-helix bundle »). La partie la plus remarquable de la structure est une gorge profonde de 20 Å, bordée par quatorze résidus aromatiques fortement conservés et menant au site actif, ou triade catalytique, située au fond de cette cavité [360].

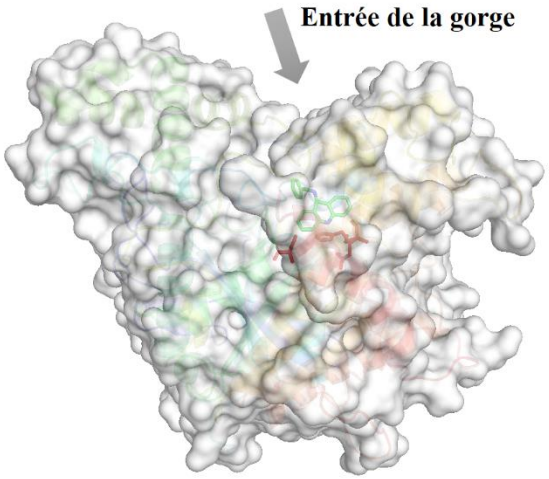


Figure 27. Structure (surface) de l'AChE de Drosophila melanogaster en complexe avec la tacrine (en vert). Les résidus rouges appartiennent à la triade catalytique.

3.1.3.1 Le site actif

Le site actif, au sein duquel se trouve la machinerie catalytique, se trouve au fond de la gorge. Il est subdivisé en un sous-site estérasique et un sous-site « anionique ». Cette structure est commune aux AChEs des différentes espèces, notamment chez l'abeille. Nous utiliserons dans ce paragraphe, sauf indication contraire, la numérotation pour la *TcAChE*.

Le site estérasique correspond à la triade catalytique. Trois résidus : le glutamate Glu327, l'histidine His440 et la serine Ser200, forment cette triade [365] qui rappelle le site catalytique des sérines protéases [366]. Ces résidus sont disposés de tel façon que : (i) le glutamate forme une liaison hydrogène avec l'histidine, permettant de maintenir cette dernière dans une orientation favorable pour que (ii) l'atome d'azote du noyaux imidazole de l'histidine puisse accepter un proton de la sérine.

La sérine ainsi rendue nucléophile réalise une catalyse covalente en attaquant l'atome de carbone du groupement carbonyle (C=O) de l'ACh [367]. Le résultat de cette étape dite d'acylation

est la formation d'un premier intermédiaire tétraédrique avec un oxygène négatif appelé l'oxyanion. Cet intermédiaire chargé négativement est stabilisé par le trou oxyanion de l'enzyme formé par les résidus Gly118, Gly119 et Ala201 [368]. L'histidine ayant accepté un proton devient un acide et retransfère ce proton au carbone α de l'intermédiaire tétraédrique. L'ACh est alors clivée, et la portion choline (R'NH2) est expulsée par diffusion. L'oxyanion redevient (C=O) et reste attaché de manière covalente à la sérine : c'est l'intermédiaire acyl-enzyme, fixé par une liaison ester entre la moitié "carbonyle" du substrat d'origine et l'oxygène de la fonction alcool de la sérine. Ensuite a lieu la déacétylation, qui régénère l'enzyme libre en libérant l'acétate. Pour cela, une molécule d'eau donne un proton à l'histidine ; l'oxygène de l'eau rendu nucléophile attaque l'atome de carbone de l'acyl-enzyme, formant un autre intermédiaire tétraédrique avec un oxyanion. Comme précédemment, l'histidine, devenue un acide, redonne son proton à l'intermédiaire tétraédrique. Cela permet la libération du second produit : l'acétate (RCOOH), et la sérine revenue à son état initial est prête pour réagir avec une nouvelle molécule de substrat.

Le site anionique regroupe le tryptophane Trp84, Glu199 et Phe330. La charge positive de l'ACh amena l'hypothèse que le site actif de l'AChE puisse être constitué de résidus acides (chargés négativement au pH physiologique), d'où sa dénomination de site *anionique* ; en réalité, ce site est plutôt aromatique. Il permet la stabilisation de la charge positive portée par la portion choline de l'ACh. Le tryptophane, et dans une moindre mesure la phénylalanine, stabilisent l'azote quaternaire de l'ACh par des interactions de type π-cation [369,370]. Le Glu199, chargé négativement, participe à la stabilisation par des interactions électrostatiques [371]. Enfin les résidus aromatiques Phe288 et Phe290 forment la poche acyle impliquée dans la sélectivité de l'AChE [368].

3.1.3.2 La gorge aromatique

La gorge aromatique forme une cavité de 20 Å de profondeur, de la surface de l'AChE vers le site actif. Les 14 résidus qui la tapissent sont principalement aromatiques. La gorge guide et oriente les substrats, sans doute par des mécanismes électrostatiques [372].

À mi-hauteur, au niveau des résidus Tyr121 et Phe330 (numérotation pour la *TcAChE*), la gorge présente un resserrement (*bottleneck*) [373]. Des simulations de dynamique moléculaire ont montré que ce resserrement est à l'origine d'un état fermé et d'un état ouvert de la gorge [371,374]. Dans la structure native, le diamètre de la gorge à cet endroit est d'environ 3 Å, insuffisant pour laisser pénétrer l'ACh jusqu'au site actif, la gorge est donc fermée [375]. L'ouverture de la gorge,

condition requise pour l'acheminement du substrat jusqu'au site actif, est rendue possible grâce à la flexibilité du résidu Phe330 [376,377]. Ce resserrement semble impliqué dans la sensibilité aux carbamates et organophosphates. En effet, chez l'invertébré *Branchiostoma floridae* qui présente deux AChEs, la résistance de son AChE1 par rapport à l'AChE2 est associée à la substitution de la Phe330 par un tryptophane ; cette substitution serait à l'origine d'un rétrécissement du *bottleneck*, limitant l'accès des inhibiteurs au site actif [378]. Chez la drosophile, la Tyr121 est substituée par une méthionine, et la Phe330 est substituée par une tyrosine [361]. Ces substitutions engendrent une déviation de la trajectoire de la gorge de l'AChE de plusieurs angströms chez la drosophile par rapport à celle de la raie électrique.

3.1.3.3 Le site périphérique

À l'entrée de la gorge menant au site actif, l'AChE possède un autre site de fixation pour les ligands : le site périphérique (PAS pour « Peripheral Anionic Site »). Il est composé, chez la raie électrique, de cinq résidus : Tyr70, Asp72, Tyr121, Trp279 et Tyr334. Les résidus du PAS ne sont pas systématiquement conservés entre les espèces ni entre les AChE1 et AChE2 au sein d'une espèce (voir pour exemples le Tableau 4).

Tableau 4. Résidus du site périphérique chez Torpedo californica (TcAChE) chez Homo sapiens (HAChE), Drosophila melanogaster (DmAChE) et les acétylcholinestérases d'Apis mellifera (AmAChE1-2).

TcAChE	Tyr70	Asp72	Tyr121	Trp279	Tyr334
HAChE	Tyr	Asp	Tyr	Trp	Tyr
DmAChE	Glu	Tyr	Met	Trp	Tyr
AmAChE1	Ile	Asp	Tyr	Trp	Tyr
AmAChE2	Glu	Tyr	Met	Trp	Tyr

Le ligand se fixe de façon transitoire au site périphérique qui contribue à améliorer l'efficacité catalytique de l'enzyme [379,380]. Une forte concentration en ACh inhibe l'activité de l'AChE alors qu'il existe une accélération de la réaction catalytique aux basses concentrations de substrat [381]. Le PAS est suspecté d'intervenir dans ces phénomènes en agissant comme un régulateur de l'activité catalytique, en adaptant l'efficacité de l'AChE à la concentration d'ACh [381,382]. Des discussions persistent néanmoins quant au degré d'implication du PAS [383]. Le rôle du PAS pourrait ne pas être uniquement d'ordre stérique : très tôt, il lui fut associé un rôle de régulateur allostérique de l'activité de l'AChE [384]. Il est maintenant admis qu'il existe un lien conformationnel entre le site périphérique et le site actif de l'AChE [385,386].

3.1.4 Inhibition de l'acétylcholinestérase

De par son rôle physiologique essentiel, l'AChE est la cible d'un éventail de toxine d'origine animale, végétale et fongique, et de poisons synthétisés par l'homme. C'est également une cible thérapeutique pour combattre des maladies neuromusculaires comme la myasthénie et la maladie d'Alzheimer [387,388].

Parmi les toxines naturelles pouvant inhiber l'AChE se trouvent notamment les fasciculines - trois iso-fasciculines sont connues (FASI-III) – qui sont de petites protéines isolées des venins de serpent *Dendrouspis ssp.* [382,389]. Ce sont des inhibiteurs sélectifs des AChEs de mammifères et raies électriques, mais qui n'ont que peu d'effet sur l'AChE des insectes et les oiseaux [390]. Des expériences de mutagenèse dirigées ont montré l'importance de trois résidus aromatiques : Tyr70, Tyr121 and Trp279, dans l'interaction avec la FAS-II [391]. La détermination de la structure expérimentale du complexe *Tc*AChE / FAS-II a confirmé l'importance de Tyr70 et Trp279, ce dernier réalisant une interaction de type stacking avec une méthionine de la fasciculine [392,393]. La structure primaire de l'AChE de *Drosophila melanogaster*, déduite à partir de la séquence d'ADN codant met en évidence l'absence de ces trois résidus [394] ; chez le poulet, Tyr70 et Trp279 sont également absents, ce qui explique le peu d'effet de la fasciculine chez ces espèces. D'autres molécules se lient au site périphérique : le propidium, la gallamine et le d-tubocurarine. Là encore l'AChE du poulet est moins sensible à ces trois ligands que l'AChE de la raie électrique [395]. L'edrophonium est un ligand du site anionique, et entraîne le même effet sur l'AChE du poulet et de la raie [395].

Le mode d'action des ligands du site périphérique est sujet à débat. Lors de la liaison de petits ligands comme le propidium et la gallamine, l'inhibition semble davantage liée à un blocage stérique [396]. Dans cette situation, la liaison d'un ligand sur le site périphérique est sans effet sur l'affinité du substrat pour le site actif. Pour la fasciculine, l'observation de la structure cristallographique du complexe AChE / FAS-II suggère un effet stérique du ligand [397], mais il semble qu'une inhibition allostérique se combine au processus [379,398]. En effet, le transfert de protons pendant l'étape d'acylation est ralenti lors de la fixation de la fasciculine [399], et l'orientation du Trp84 du site anionique est affectée [398]. De plus, une simulation de dynamique moléculaire suggère un rétrécissement de la largeur de la gorge de l'AChE et une perturbation de l'arrangement de la triade catalytique [374].

Parmi les inhibiteurs de l'AChE, les molécules appartenant à la famille des organophosphorés (OP) et à celle des carbamates sont les plus répandues. Ces molécules agissent au niveau de la sérine du site actif. **Les organophosphorés** sont composés d'un atome de phosphore pentavalent, lié à quatre substituants : un atome d'oxygène (ou de soufre) par une double liaison (Y), un groupement partant (X), un groupement (R1) lié par un atome d'oxygène, et à un autre groupement (R2) (Figure 28).

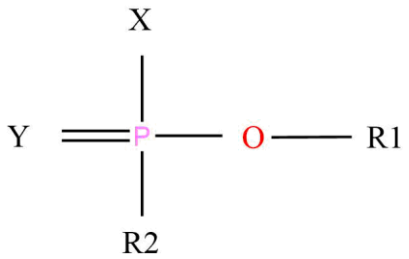


Figure 28. Structure générale d'un organophosphoré. Y : O ou S. X : groupement partant (halogène, thiocyanate, carboxylate, phenoxy, ...).

Lorsque l'OP arrive près de la serine catalytique, cette dernière attaque l'atome de phosphore. Cela conduit à la rupture de la liaison entre le phosphore et le groupe partant X et à la formation d'un intermédiaire tétraédrique. La sérine est alors phosphorylée, d'une manière analogue à la réaction d'acétylation de l'AChE. Par rapport à l'enzyme acétylée, qui est rapidement régénérée en libérant de l'acide acétique, l'enzyme phosphorylée est très stable. Dans le cas de certains OP, une réaction secondaire de *vieillissement*, qui correspond à une déalkylation de l'enzyme phosphorylée, rend la régénération de l'enzyme libre impossible ; l'enzyme est alors inactivée de façon irréversible.

Les carbamates sont des dérivés de l'acide carbamique (Figure 29). Il existe un carbamate naturel, l'ésérine (ou physostigmine) extraite d'une fève et autrefois utilisée à des fins judiciaires dans certaines provinces d'Afrique de l'ouest [400]. Lorsque le soufre substitue un ou deux atomes d'oxygène de la structure de l'acide carbamique, on parle de thio- ou dithiocarbamates respectivement [401].

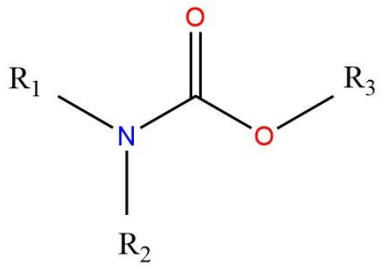


Figure 29. Structure générale d'un carbamate

Les carbamates sont parfois séparés en deux groupes - les carbamates et les oximes carbamates - qui présentent néanmoins un mode d'action similaire [402]. L'inhibition de l'AChE par un carbamate suit un mécanisme quasiment identique à celui décrit lors de l'inhibition de l'AChE par un OP. Comme les OP, les carbamates ont un groupe partant qui est hydrolysé lors du la formation du complexe ligand-AChE. Il s'ensuit une carbamylation du groupement hydroxyle de la sérine. La différence majeure dans le processus est que l'AChE est régénérée directement à partir du complexe carbamate/AChE, et qu'il n'existe pas de processus de vieillissement. Il en résulte une régénération plus rapide de l'AChE lors de l'inhibition par un carbamate que par un organophosphoré. Une autre différence notable de leur mode d'action est que les OP, contrairement aux carbamates, passent par une étape d'activation métabolique avant de mener l'inhibition de l'AChE.

L'un des premiers axes de développement mis en œuvre au cours de ces travaux de thèse a été de rechercher, parmi les inhibiteurs d'AChE existant, une molécule candidate pour un nouveau traitement anti-varroa.

3.2 Résultats

3.2.1 Réorientation d'acaricides

La réorientation de molécules (*drug repositioning* ou bien *drug repurposing*) vise, dans un contexte de manque de productivité de nouvelles molécules efficaces, à trouver de nouveaux usages, ou à améliorer, des médicaments déjà existants [403]. C'est une pratique de l'industrie pharmaceutique, qui peut présenter plusieurs avantages par rapport à la conception *de novo*, c'est-à-dire la conception d'un médicament entièrement nouveau. Le processus permet un gain de temps, et présente donc un intérêt financier non négligeable. Il permet aussi la réduction des risques éventuellement liés au développement dans l'urgence d'un nouveau traitement. La démarche est appliquée ici pour trouver, parmi des acaricides existants, un nouveau traitement anti-varroa.

3.2.1.1 Test *in vitro* de pesticides de la famille des carbamates

Les organophosphorés et les carbamates sont des molécules réputées pour leur action inhibitrice de l'AChE (voir Chapitre 3 § 3.1.4 page 94). De nombreux organophosphorés doivent passer par une étape d'activation métabolique avant de pouvoir exprimer leur activité anticholinestérasique. Cette contrainte rend les OP inadaptés au test *in vitro* utilisé au laboratoire ; ce sont donc des carbamates qui ont été sélectionnés pour cette phase de l'étude.

Des travaux antérieurs au sein de l'équipe du CERMN ont montré l'intérêt d'un carbamate : le pirimicarbe [404], qui a montré une spécificité d'action intéressante, et souhaitée dans le cadre d'une action anti-varroa. Afin de vérifier si d'autres carbamates possèdent un profil similaire, autres composés de la même famille ont été testés *in vitro*. Les résultats sont présentés dans le Tableau 5.

Tableau 5. Récapitulatif des résultats d'inhibition in vitro de l'AChE par les carbamates.

		% inhibition [a] (10^{-5} M)	
Carbamate	Usage	Abeille	Varroa
Formétanate	Acaricide - Insecticide	93 % (± 0,025)	82 % (± 0,046)
Méthiocarbe	Insecticide - acaricide	90 % (± 0,020)	74 % (± 0,058)
Propoxur	Acaricide - Insecticide	89 % (± 0,039)	79 % (± 0,021)
Pirimicarbe	Acaricide - Insecticide	20 % (± 0,025)	67 % (± 0,025)
Promécarbe	Insecticide	93 % (± 0,031)	75 % (± 0,058)
Ethiofencarbe	Insecticide	39 % (± 0,045)	49 % (± 0,010)
Bendiocarbe	Insecticide	94 % (± 0,036)	79 % (± 0,025)
Fénoxycarbe	Insecticide	3 % (± 0,025)	8 % (± 0,017)
Thiodicarbe	Insecticide	90 % (± 0,035)	94 % (± 0,022)
Chlorprophame	Herbicide	2 % (± 0,040)	1 % (± 0,010)

[a] moyenne (± écart-type)

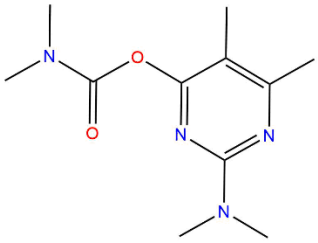
Les pourcentages d'inhibitions obtenus pour le pirimicarbe sont similaires à ceux publiés en 2014 (*i.e.* 21 % et 66 % d'inhibition pour l'AChE de l'abeille et du varroa respectivement [404]). On retrouve donc le profil recherché d'une inhibition plus importante de l'AChE du varroa par rapport à celle de l'abeille. Ce profil n'est pas retrouvé chez les autres carbamates étudiés. Le formétanate, le méthiocarbe, le propoxur, le promécarbe, bendiocarbe et le thiodicarbe sont tous de puissants inhibiteurs de l'AChE du varroa mais aussi de l'abeille. Le fénoxycarbe est un

carbamate mimétique de l'hormone juvénile, il agit donc comme un régulateur de croissance, et non comme un neurotoxique, ce qui justifie les résultats obtenus. Le chlorprophame étant avant tout un herbicide, l'absence d'activité n'est pas étonnante.

Parmi les carbamates testés, seul le pirimicarbe inhibe préférentiellement l'AChE du varroa par rapport à celle de l'abeille. Nous avons souhaité chercher, dans la chimiothèque du CERMN, des molécules de structure proche à celle du pirimicarbe, afin de voir si ce profil d'inhibition peut être conservé.

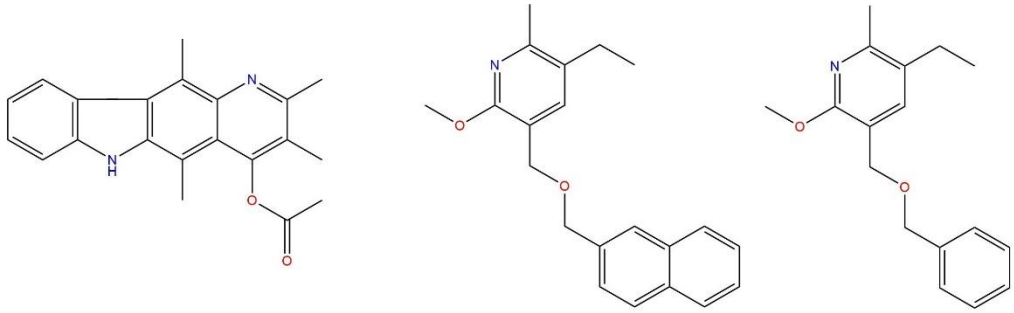
3.2.1.2 Similarité de structure avec le pirimicarbe

Une approche par similarité de structure a été utilisée pour la recherche, dans la chimiothèque du CERMN, de molécules de structures proches de celle du pirimicarbe (Figure 30). Nous avons opté pour une procédure type *workflow*, avec un protocole construit sur la plateforme Pipeline Pilot (Accelrys). Pipeline Pilot permet aux utilisateurs de composer graphiquement des protocoles, en utilisant différents composants configurables pour des opérations (récupération de données, manipulation, filtrage, l'affichage, etc.). Les descripteurs ECFP4, FCFP4 et MDL ont été utilisés (voir Chapitre 2 § 2.2.1.1 page 66), et les résultats ont été classés selon l'indice de similarité de Jaccard/Tanimoto. Parmi les 100 molécules ayant la plus grande similarité avec le pirimicarbe, les molécules proposées par les trois descripteurs ont été sélectionnées. Six molécules ont ainsi été testées *in vitro* pour estimer leur activité anticholinestérasique ; les résultats, ainsi que les structures de ces molécules, sont présentés sur la Figure 31.



Inhibition AchE (10^{-5} M)	
Varroa	67 %
Abeille	20 %

Figure 30. Structure du pirimicarbe



MR14072

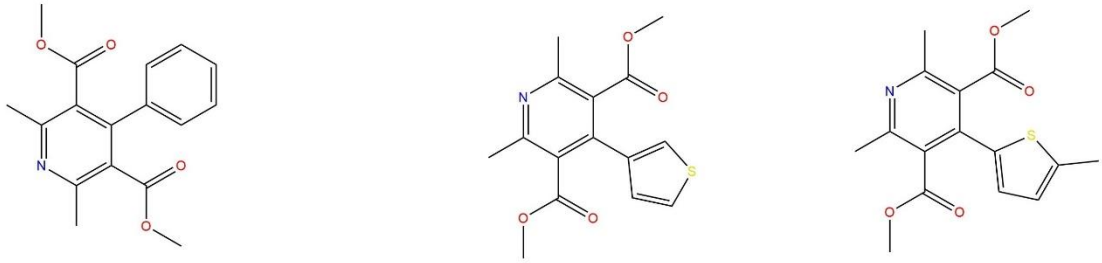
Inhibition AChE (10^{-5} M)	
Varroa	9 %
Abeille	8 %

SR6321

Inhibition AChE (10^{-5} M)	
Varroa	5 %
Abeille	0 %

SR6382

Inhibition AChE (10^{-5} M)	
Varroa	0 %
Abeille	0 %



SR3254

Inhibition AChE (10^{-5} M)	
Varroa	15 %
Abeille	7 %

SR4226

Inhibition AChE (10^{-5} M)	
Varroa	9 %
Abeille	7 %

SR1495

Inhibition AChE (10^{-5} M)	
Varroa	12 %
Abeille	5 %

Figure 31. Structures de molécules et résultats des tests in vitro pour les molécules issues du criblage de similarité de structure avec le pirimicarbe.

Deux molécules : SR3254 et SR1495 inhibent l'AChE du varroa entre 10 et 20 % à 10^{-5} M. Les quatre autres molécules ne sont pas actives sur l'AChE.

Il n'a pas été possible de tester plus de molécules suivant la piste de la réorientation d'acaricides, par manque de varroas récoltés. Les six molécules issues de la similarité de structure avec le pirimicarbe n'ont pas montré d'activité anticholinestérasique suffisante. Le pirimicarbe reste donc actuellement le meilleur candidat. Afin de mieux connaitre son potentiel anti-varroa, une évaluation *in vivo* de son efficacité a été réalisée.

3.2.1.3 Tests *in vivo* du pirimicarbe

L'efficacité *in vivo* du pirimicarbe a été évaluée selon le protocole des tests en cagettes (pour la description du protocole, voir Chapitre 2 § 2.4.4 page 84). Les concentrations testées s'étendent de 0,0001 µg à 1 µg par abeille. L'amitraze a servi de point de référence. Pour l'amitraze, comme pour le pirimicarbe, aucune des doses testées n'a conduit à de la mortalité à

24 heures chez les abeilles. Les résultats de la mortalité des varroas sont donnés dans le diagramme ci-dessous (Figure 32).

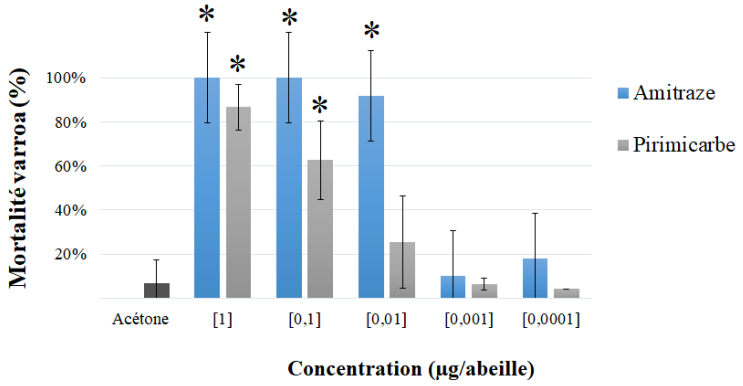


*Figure 32. Mortalité moyenne (± écart-type) des varroas phorétiques à 24 heures (n=4). * Différence significative, par rapport au témoin solvant, selon test post-hoc de Tukey (p-value < 0,01).*

L'amitraze et le pirimicarbe ont des profils d'activité différents, avec globalement un facteur de 10 µg de décalage dans l'efficacité anti-varroa (Figure 32). L'amitraze perd en effet son efficacité à partir de 0,001 µg/abeille, alors que le pirimicarbe n'est plus efficace à 0,01 µg/abeille. La DL_{50} par contact de l'amitraze est estimée à 27 µg par abeille, contre 14 µg par abeille pour le pirimicarbe [405]. Les DL_{50} par contact des deux molécules sont donc du même ordre, avec une toxicité vis-à-vis de l'abeille légèrement supérieure pour le pirimicarbe. La fenêtre de sécurité, marge entre une dose toxique pour l'abeille et une dose efficace sur varroa, risque donc d'être plus restreinte pour le pirimicarbe que pour l'amitraze.

Le pirimicarbe est à l'heure actuelle le composé retenu par l'équipe ayant le profil anti-varroa le plus prometteur, mais évaluer les effets du pirimicarbe sur l'abeille reste une priorité avant de pouvoir l'envisager comme nouveau composé varroacide.

3.2.1.4 Conséquences d'une exposition par voie orale à du pirimicarbe sur le comportement d'alimentation des abeilles

Les travaux de Dulin *et al.*, ont montré, lors d'un test de toxicité aigüe par contact, l'efficacité varroacide du pirimicarbe à la concentration de 250 ppm. Cette concentration correspond à la DL_{50} par contact, pour l'abeille, divisée par un facteur 100.

Les travaux de thèse de Badiou ont montré le pouvoir d'inhibition du pirimicarbe sur l'$AChE_{m1}$ et l'$AChE_{m2}$ de l'abeille [406]. L'action neuronale d'un composé peut avoir des répercutions

physiologiques, notamment sur les capacités musculaires, les fonctions cognitives, la respiration ou la digestion [407]. Il a de plus été observé que l'exposition continue par voie orale à des inhibiteurs de l'AChE affecte la locomotion des abeilles et augmente la transcription du gène codant pour l'AChE dans l'intestin et le cerveau [408]. Des atteintes sur des programmes neuronaux régulant le cycle de vie de l'abeille (horloge interne, communication, …) ainsi que sur l'activité de butinage sont également envisageable [407,409]. Enfin, Nigg *et al.,* ont montré que l'exposition par voie orale à 3 ppm du carbamate sulfoxyde d'aldicarbe entraîne une diminution de la prise alimentaire des abeilles [410].
Suivre le comportement d'alimentation des abeilles peut donc être un indicateur de la bonne santé des individus, et servir de marqueur précoce d'effets sublétaux. L'efficacité d'activation du système immunitaire des insectes notamment, peut être compromise en cas d'apport énergétique insuffisant [411], mais est restaurée et lors du retour à un régime alimentaire satisfaisant [412]. Un stress énergétique peut de plus diminuer le succès de butinage [413].

Dans l'objectif de mieux appréhender les conséquences du pirimicarbe sur la colonie, nous nous sommes intéressés à ces effets sur l'abeille lors d'une exposition par voie orale. La concentration efficace contre le varroa de 250 ppm a été conservée pour les tests.

Une première expérience, menée en 2015, a permis d'observer une diminution de la prise alimentaire des abeilles lorsque le sirop contient du pirimicarbe. Une seconde expérience en 2016 a eu pour objectif de confirmer les premiers résultats, en allongeant la période d'exposition. L'hypothèse d'un retour vers une consommation normale après l'arrêt l'exposition au pirimicarbe a également été explorée. Ce sont les résultats de cette seconde campagne d'expérience qui sont présentés dans ce paragraphe.

Description du dispositif expérimental

Les cages, de dimension interne 20 cm x 10 cm x 9,5 cm, sont constituées par des plaques de PVC (côtés), polycarbonate blanc opaque (plancher) et polystyrène transparent assemblées entre elles. Le dispositif utilisé a été développé par le Dr. Michel Sokolowski, à partir d'une version de vol libre [414]. La ventilation est assurée par 32 trous de 3,5 mm de diamètre. Chaque boîte est équipée d'un nourrisseur automatisé : disque de polyamide de 50 mm de diamètre percé au centre d'un trou de 6 mm de diamètre et de 17 mm de long. L'orifice est équipé d'un capteur infra-rouge.

À chaque visite d'une abeille, 2 µl de sirop sont distribués, par le fond du trou, grâce à une pompe doseuse. Après la consommation des 2 µl, une abeille doit ressortir du trou puis y rentrer à nouveau pour obtenir une nouvelle distribution.

Afin de normaliser la consommation de sirop par abeille vivante, chaque boîte est équipée d'un « chapeau » doté d'un capteur photographique cadrant le plancher de la cage (Figure 33 A). Une photo a été prise automatiquement chaque heure de manière à réactualiser l'effectif d'abeilles vivantes. Les cadavres ont été retirés des boîtes au fur et à mesure de l'expérience.

À la fin de chaque essai, la tuyauterie en silicone de la pompe a été purgée et nettoyée, et les boîtes lavées à l'eau légèrement savonneuse.

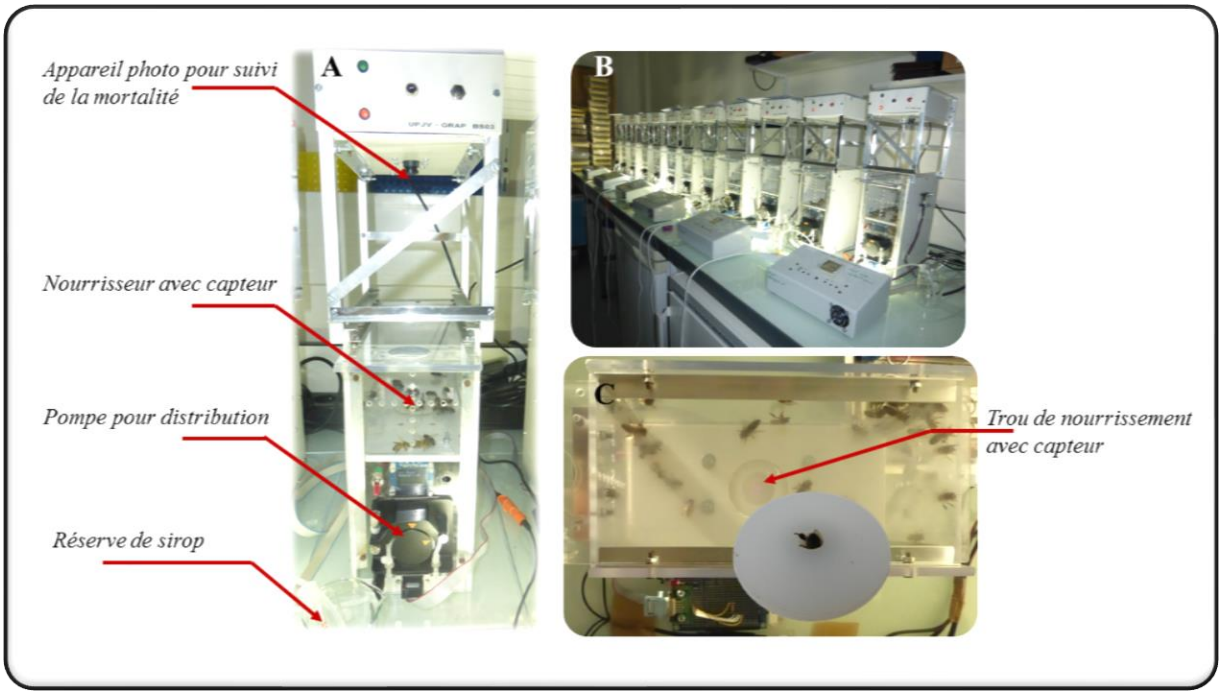


Figure 33. A : photographie légendée d'une boîte servant au suivi de la consommation des abeilles au laboratoire. B : installation des douze boîtes. C : une boîte vue de dessus avec un zoom sur le trou du nourrisseur.

Design expérimental

Vingt abeilles ouvrières d'âge indéterminé sont introduites dans chaque cage. Les abeilles sont récoltées dans une colonie du laboratoire du CERMN. Une batterie de 12 boîtes (Figure 33 B) fonctionnant en parallèle a été utilisée pour l'expérience. Après une période d'acclimatation de 24 heures, les cages ont été réparties selon trois conditions expérimentales (Figure 34) :

1. La condition « témoin » dans laquelle les abeilles sont nourries uniquement avec du sirop sucré.
2. La condition « pirimicarbe ».
3. La condition « retrait ».

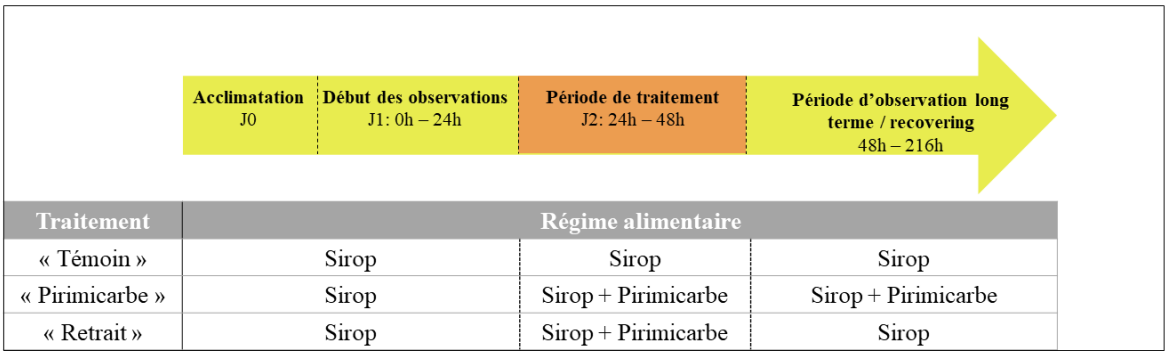


Figure 34. Schéma explicatif du design expérimental appliqué lors de l'expérience en laboratoire de consommation du pirimicarbe.

Le sirop sucré était constitué de saccharose (50 % m/v). Le pirimicarbe (Sigma-Aldrich) a été solubilisé dans du DMSO, puis du sirop de saccharose a été ajouté de façon à obtenir une concentration finale de 250 ppm de pirimicarbe dans 0,5 % de DMSO. Un taux équivalent de DMSO a été fourni pour les trois conditions, tous au long des expérimentations.

Quatre cages sont allouées à chaque condition expérimentale. Les cages sont disposées dans une pièce à température ambiante, et la photopériode est contrôlée (cycle de 14 heures d'éclairage / 10 heures de nuit).

Traitement statistique des résultats

À partir des données brutes enregistrées, le premier traitement a consisté à obtenir la consommation et le nombre de réponses pour chaque heure de l'expérience, et à diviser ces

valeurs par l'effectif d'abeilles vivantes au cours de cette même période. Ce travail a été fait avec un logiciel écrit en pascal sous Lazarus.

Le comportement de nourrissement enregistré au court des expériences est apparu fortement cyclique, se calquant sur l'alternance des périodes de jour et de nuit. Les abeilles visitent le nourrisseur pendant la journée, avec une activité croissante jusqu'aux environs de midi, puis décroissante, pour atteindre une activité minimale pendant la période nocturne. Le caractère cyclique de la consommation est une source de variabilité ; afin de s'affranchir de cette variabilité, la variable « activité cyclique » a été définie. Cette variable a été calculée par la fonction $-\cos\left(\frac{x\pi}{7}\right)$, avec « x » prenant les valeurs ci-dessous :

Temps	0h-7h	7h-8h	8h-9h	9h-10h	10h-11h	11h-12h	12h-13h	13h-14h	14h-15h	15h-16h	16h-17h	17h-18h	18h-19h	19h-20h	20h-21h	21h-24h
x	0	1	2	3	4	5	6	7	7	6	5	4	3	2	1	0

La variable périodique « activité cyclique » permet de prendre en compte l'alternance entre les périodes diurnes et nocturnes. Sur la Figure 35, les valeurs calculées de l'activité cyclique sont représentées par rapport aux valeurs observées de la consommation de sirop.

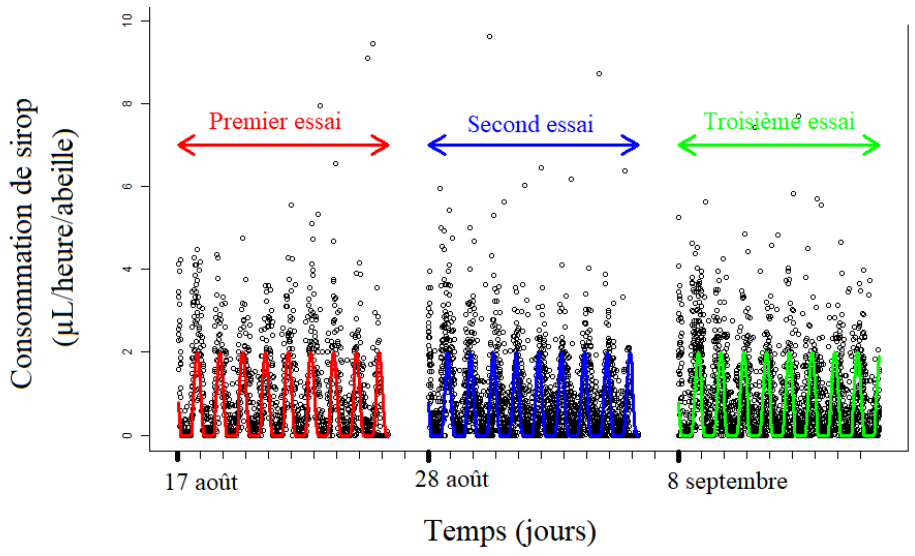


Figure 35. Variation temporelle observée de la consommation par heure et par abeille (cercles gris).

La consommation de sirop a été régressée par rapport à la variable « activité cyclique » afin de rectifier les résidus liés aux cycles circadiens. La consommation étant exprimée par heure, l'activité cyclique a été considérée comme une variable catégorielle à huit modalités. La consommation étant également divisée par le nombre d'abeilles vivantes, elle est une variable discontinue. Les données ont donc été traitées selon un modèle linéaire généralisé (et non un modèle linaire), en spécifiant une distribution d'erreurs de quasi-poisson et une fonction de lien logarithme. Les résidus issus de ce modèle ont été utilisés pour les étapes suivantes de l'analyse.

L'effet du pirimicarbe a été évalué sur les résidus obtenus précédemment, en considérant les trois essais expérimentaux séparément.

Les effets à long terme de l'exposition au pirimicarbe ont d'abord été évalués. Les observations faites du Jour 0 au Jour 2 (voir Figure 34) ont été supprimées du jeu de données, afin de constater les effets du retrait du pirimicarbe sur la consommation. Pour chaque essai, un modèle linéaire $Y = a \cdot Traitement + b$ a été ajusté aux données pour estimer l'effet du traitement. Un test de Fisher a permis de comparer les changements de comportements alimentaires entre les trois traitements.

Enfin, la dernière étape de l'analyse a consisté à évaluer l'effet à court terme de l'introduction du pirimicarbe dans le sirop, en se focalisant sur un éventuel rétablissement de la variable lors du retrait du carbamate. Pour ce pan des analyses, seules les 96 premières heures des trois essais ont été exploitées (J1 à J4, voir Figure 34), afin de couvrir la période d'exposition au pirimicarbe et les 48 heures suivant son retrait dans le groupe expérimental « retrait ». Pour chaque essai, le modèle linaire $Y = a \cdot Traitement + b \cdot Jour + c \cdot (Traitement \times Jour) + d$ a été ajusté aux données. Un test de Fisher a permis de vérifier l'effet global du traitement, du jour et des interactions sur la consommation. Le test post-hoc de Différence Significative Minimale (LSD) de Fisher a été utilisé pour comparer les variations journalières au sein des traitements.

Toutes les analyses ont été réalisées avec l'aide de Julien Normand (IFREMER) et sur le logiciel R (www.R-project.org/).

Résultats

Effets sur la mortalité des abeilles

La mortalité, à l'issue des dix jours d'expérimentation, dans les témoins a été de 32, 15 et 7 % pour les trois essais respectivement. En moyenne, une différence de 6 % de mortalité a été

observée entre les groupes « témoins » et « pirimicarbe », et entre les groupes « témoins » et « retrait ». Les tests du X^2 n'indiquent aucune différence significative des mortalités entre les trois conditions expérimentales de chaque essai (Tableau 6). L'exposition par voie orale à la dose testée de pirimicarbe n'implique donc pas de changement significatif dans la survie des abeilles dans les conditions du test.

Tableau 6. Taux moyens de survie (± écart-type), à l'issue des essais, selon le traitement. df : degrés de libertés et p : p-value des tests du X^2.

Essais	Traitement	Taux de survie	*df*	*p*
1	Témoin	0,675 (± 0,075)	3	0,401
	Pirimicarbe	0,800 (± 0,064)		
	Retrait	0,775 (± 0,067)		
2	Témoin	0,853 (± 0,039)	9	0,924
	Pirimicarbe	0,875 (± 0,037)		
	Retrait	0,863 (± 0,039)		
3	Témoin	0,925 (± 0,030)	9	0,425
	Pirimicarbe	0,900 (± 0,033)		
	Retrait	0,863 (± 0,039)		

Effets à long terme

Comme mentionné précédemment, les analyses sont effectuées sur des résidus des modèles utilises pour décrire la variable. Une valeur positive (respectivement négative) de résidu, signifie une consommation de sirop supérieure (respectivement inférieure) à la consommation moyenne de la population. La figure ci-dessous montre les consommations résiduelles (µL/heure/abeille) selon le traitement et pour les trois expériences, après le retrait du pirimicarbe des groupes expérimentaux « Retrait ».

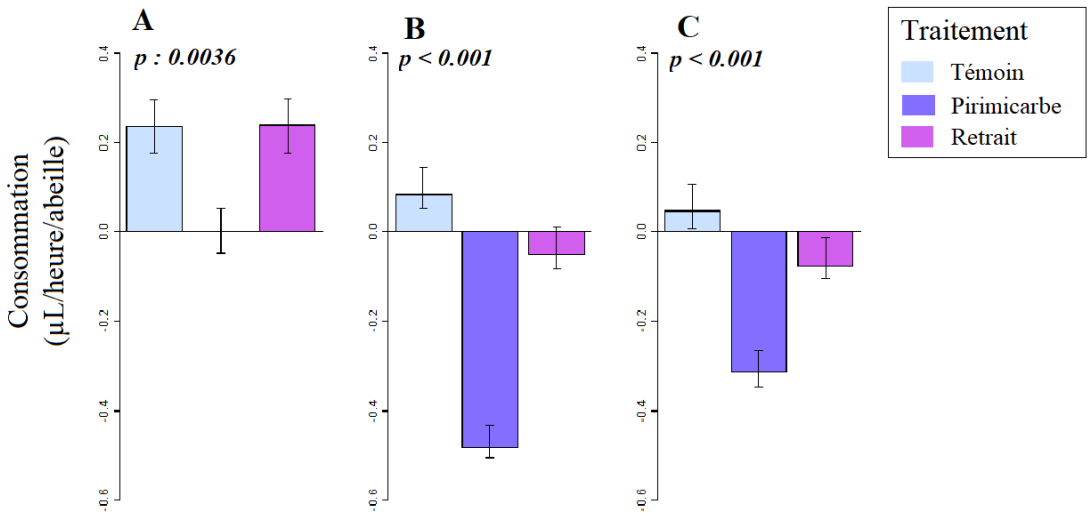


Figure 36. Effet des traitements sur les résidus du modèle de la consommation moyenne (± écart-type) de sirop. A, B and C signifient le premier, second et troisième essai respectivement.

Les tests statistiques révèlent un effet significatif des trois différentes conditions expérimentales (Figure 36, $p < 0,05$) sur la consommation de sirop par les abeilles. Des résidus négatifs sont associés systématiquement au traitement « pirimicarbe », ce qui traduit une moindre consommation de sirop par ce groupe dans les trois essais. La différence entre les résidus des groupes « témoin » et « retrait » est moins nette, ce qui peut suggérer une reprise de la consommation suite au retrait du pirimicarbe du sirop.

Les résultats permettent de voir que la réponse au pirimicarbe est variable selon les essais. Le premier essai (Figure 36 A) suit un schéma différent des deux autres (Figure 36 B et C).

Tous groupes témoins confondu, la consommation moyenne de sirop est de 23 µL par jour et par abeille. Concernant le groupe « pirimicarbe » la consommation chute à 20, 10 et 3 µL de sirop, ce qui implique que les abeilles ingèrent en moyenne 3,6 µg de pirimicarbe de jour. L'absence de mortalité significative par rapport au témoin (Tableau 6) apparait en désaccord avec la DL_{50} orale du pirimicarbe fixée à 3,8 µg/abeille [415]. Nos données suggèrent qu'il existe une toxicité orale variable, selon le protocole d'exposition. L'ingestion en une seule prise d'une quantité donnée d'un produit, par exemple lors d'un test de toxicité aigüe, peut produire une réponse différente de celle provoquée par l'ingestion d'une dose équivalente, mais sur une plus longue période.

Effet à court terme

Comme expliqué dans la description des analyses statistiques, l'intérêt est ici porté sur les quatre premiers jours (du jour J1 au jour J4, Figure 34).

Les résultats sont présentés sur la Figure 37.

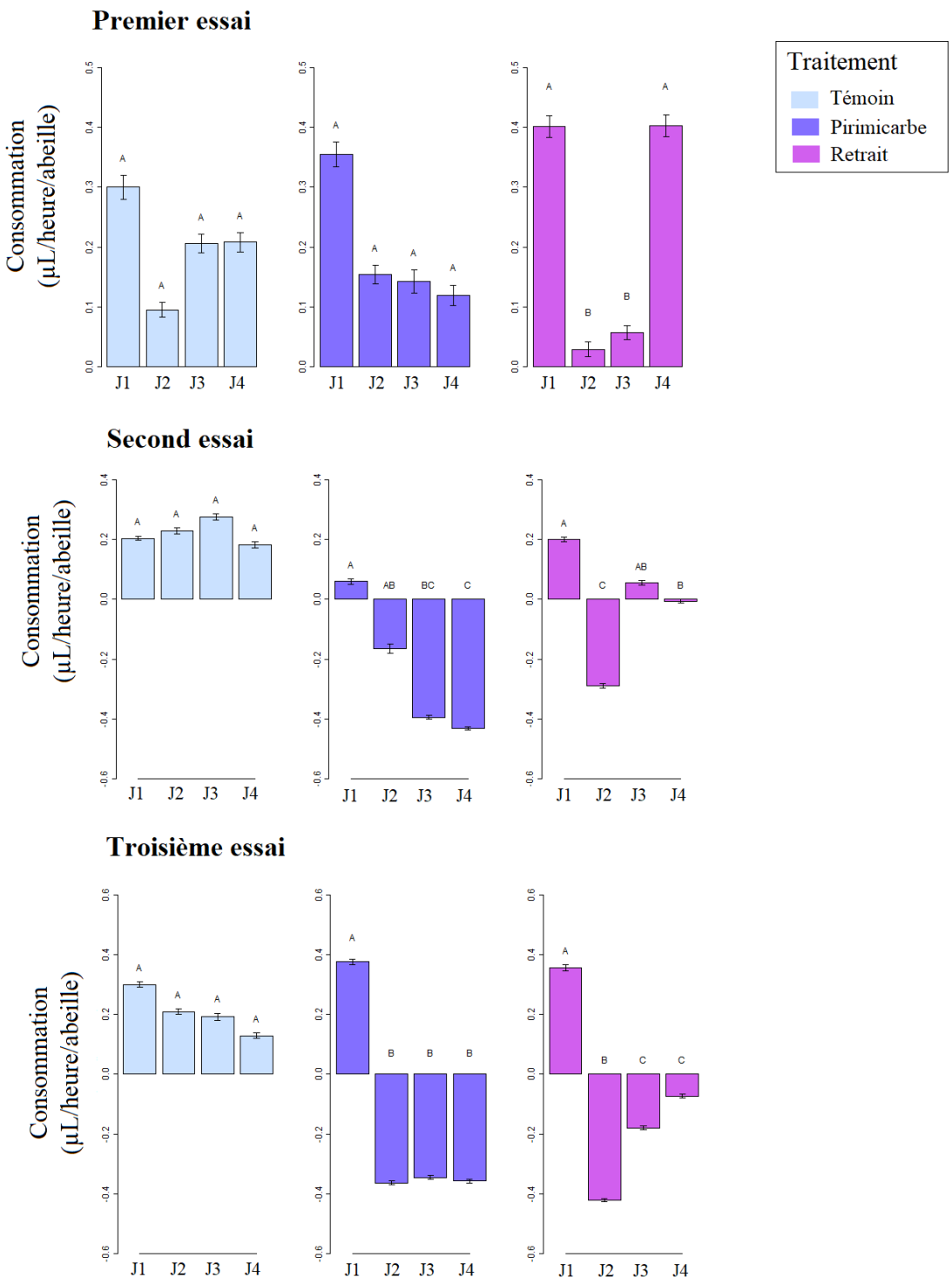


Figure 37. Consommation de sirop (moyenne ± écart-type) pendant les premiers jours des trois essais. J1, J2, J3 et J4 : du premier au quatrième jour de l'expérience respectivement. Des tests de Fisher (P=0,05) ont été fait, des lettres différentes indiquent une différence significative.

En dehors d'une légère baisse non significative au deuxième jour du premier essai, la consommation de sirop par les abeilles des groups témoins reste stable. Lors des deux derniers essais, l'introduction de pirimicarbe dans le sirop (groupes « pirimicarbe » J2) implique une baisse rapide, statistiquement significative, de la consommation. On observe la même tendance lors du premier essai, mais la baisse n'y est pas significative. Il n'y a pas de retour de la consommation initiale dans ces groupes, la prise de nourriture reste faible mais stable. La même réduction de la consommation des abeilles est observée à J2 dans les groupes « retraits ». La consommation du groupe « retrait » revient à l'état initial au jour quatre du premier essai. La restauration complète de la prise alimentaire n'est en revanche pas atteinte pour les deux autres essais, malgré une reprise progressive de la consommation par abeille.

Discussion et conclusion

Les trois essais successifs démontrent qu'il existe une variabilité temporelle dans le schéma de réponse des abeilles exposées par voie orale au pirimicarbe, avec une moindre sensibilité lors du premier essai, comparé aux deux suivants. Les changements saisonniers et journaliers de la sensibilité des abeilles au pirimicarbe ont déjà été mentionnées [416] : l'étude de Piechowicz *et al.*, suggérait une moindre sensibilité des abeilles lors d'une exposition au printemps qu'en été. Notre étude s'étale sur une période plus restreinte, du 17 août au 17 septembre, mais cela est suffisant pour observer des différences inter-expériences.

Dans le premier chapitre ont été mentionnés les différents mécanismes qui peuvent être impliqués dans la résistance à un pesticide (§ 1.5.5.4). Dans la situation de variations saisonnière, une résistance métabolique semble le mécanisme le plus probable. Les abeilles sont sujettes à des changements physiologiques au fil des saisons - incluant entre autres les niveaux en neurotransmetteurs, le métabolisme des protéines, les taux d'hormones juvéniles, la concentration sanguine de sucre - et à des changements comportementaux [417–421]. Ces changements peuvent modifier la sensibilité des abeilles aux xénobiotiques [421,422].

Les résultats de l'étude montrent un impact négatif de la présence de pirimicarbe dans le sirop sur le comportement d'alimentation des abeilles. Trois hypothèses peuvent être évoquées pour expliquer le phénomène :

1. Le pirimicarbe a une action anti-appétente qui, après ingestion, entraîne un refus des abeilles pour se nourrir.

2. Le pirimicarbe présent dans le sirop est à l'origine d'une aversion gustative, un processus par lequel un animal apprend à éviter un aliment qu'il a associé à un trouble interne, généralement gastro-intestinal [423].
3. Le pirimicarbe a une action neurotoxique.

L'évitement du sirop, à cause d'un mauvais gout, devrait s'accompagner d'un retour rapide à une consommation normale. Le délai nécessaire à la récupération semble davantage compatible avec l'hypothèse d'aversion, mais l'absence de rétablissement dans les deux derniers essais ne soutient pas l'hypothèse. L'absence d'activité intestinale anormale (excès de fèces par exemple), observée lors des expériences, ne plaide pas en faveur de la deuxième hypothèse. La dernière hypothèse serait liée à l'action neurotoxique du carbamate, dont l'activité inhibitrice de l'AChE expliquerait le changement de comportement d'alimentation des abeilles. La susceptibilité *in vitro* de l'AChE au pirimicarbe est dépendante de l'âge des abeilles [424], et les effets d'une molécule sont également dépendant de la période d'élevage des ouvrières d'été (abeilles d'été ou ouvrières élevées en hiver) [425]. La réversibilité, ou non, des effets du pirimicarbe peut donc découler de plusieurs facteurs tels que la saison et l'âge des ouvrières au moment de leur exposition.

Les expériences avec un dispositif de suivi en temps réel de la consommation des abeilles offrent une nouvelle opportunité de déceler, de façon précoce, les conséquences de l'exposition par voie orale à une molécule, que ce soit dans le cadre d'un traitement anti-varroa administré par dégouttement, ou de de manière plus générale. Nos résultats soulignent l'importance du protocole d'exposition (toxicité aigüe ou chronique) dans l'évaluation du risque. La variabilité saisonnière de la sensibilité des abeilles aux pesticides apparait également comme paramètre pertinent à prendre en compte lors de l'évaluation du risque. Les résultats de cette expérience ont fait l'objet d'une publication actuellement en révision : C. Riva, M.B.C. Sokolowski, J. Normand, J. Sopkova-de Oliveira Santos, M.P. Halm-Lemeille. **Real time effect of oral exposure to the acaricide pirimicarb, a new varroacide candidate, on Apis mellifera feeding rate** ; soumise à *Pest Management Science*, le 10 septembre 2017.

Avant de recommander le pirimicarbe comme traitement anti-varroa, il est important d'aller plus loin dans l'évaluation de ces effets, sur les abeilles adultes et sur le couvain. Avec un logP de 1,7, le pirimicarbe est peu lipophile, mais la molécule risque de s'accumuler dans le miel. Comprendre le devenir de cet acaride dans les matrices de la ruche sera donc également primordial.

Les résultats de cette expérience d'exposition par voie orale concluent nos travaux sur la réorientation d'acaricides connus. Cette première piste sur le développement d'un nouveau traitement ciblant l'acétylcholinestérase a permis d'approfondir les connaissances sur les effets du pirimicarbe sur l'abeille et le varroa. La seconde piste explorée a été d'évaluer le potentiel varroacide de composés synthétisés au CERMN dans le but d'inhiber l'AChE humaine.

3.2.2 Étude à partir de composés inhibiteurs de l'AChE humaine

3.2.2.1 Le donécopride et ces dérivés

Le CERMN travaille sur la synthèse de composés inhibiteurs de l'AChE humaine. Parmi ces composés, le donécopride a particuliairement attiré l'attention. Développé dans le cadre d'un projet MTDL (multitarget-directed ligands), le donécopride (structure sur la Figure 38) agit comme inhibiteur de l'AChE humaine et comme agoniste partiel des récepteurs 5-HT_4. L'objectif est ici de voir si les molécules synthètisées pour inhiber l'AChE humaine peuvent avoir un effet varroacide.

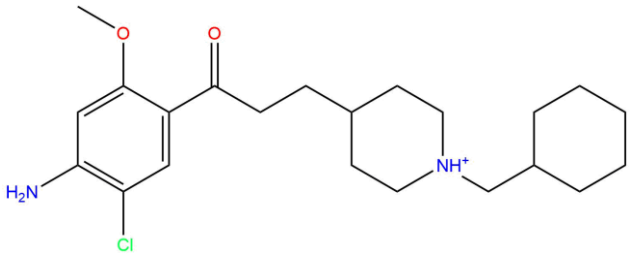


Figure 38. Structure du donécopride (MR31147).

3.2.2.2 Résultats

Le donécopride et 27 molécules de la même famille ont été testés *in vitro* à 10^{-5} M, sur l'AChE de l'abeille et du varroa. Les résultats sont présentés sur la Figure 39. Les structures des molécules de la famille du donécopride ne sont pas présentées pour des raisons de confidentialité.

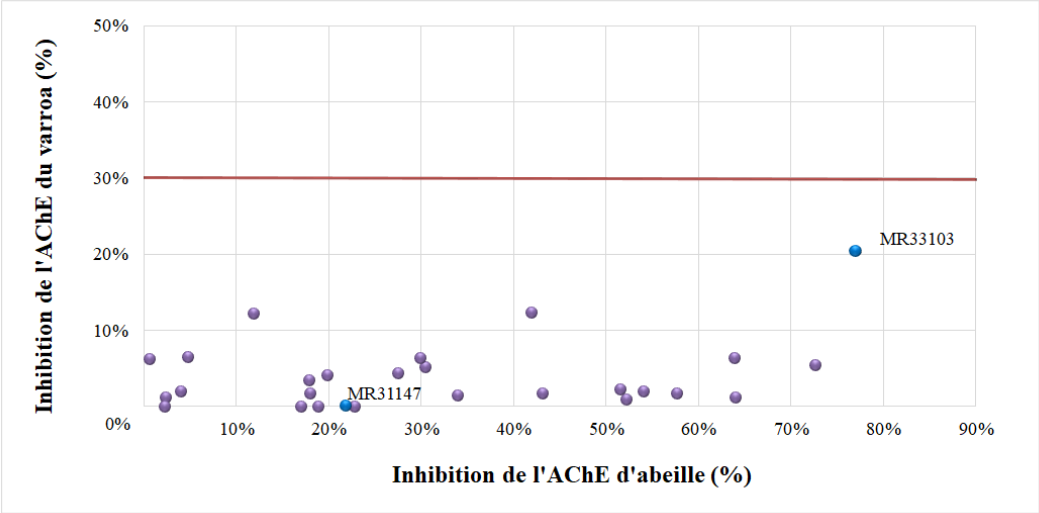


Figure 39. Pourcentages moyens (n=2) d'inhibition in vitro de l'AChE de l'abeille (en abscisse) et de l'AChE de varroa (en ordonnée). Chaque point représente une molécule. La ligne rouge indique le seuil des 30 % recherché pour l'inhibition minimum de l'AChE du varroa.

Les résultats montrent un effet de certaines molécules sur l'AChE de l'abeille. Huit des molécules testées inhibent à plus de 50 % l'AChE de l'abeille. En revanche, le seuil de 30 % d'inhibition de l'AChE du varroa n'est jamais atteint. Le plus fort taux d'inhibition de l'AChE du varroa est à 20 % et a été obtenu pour le composé MR33103, mais il s'accompagne également du plus fort taux d'inhibition de l'AChE de l'abeille qui est de 77 %. L'inhibition de l'AChE de l'abeille et une faible activité sur le varroa est contraire au profil recherché.

3.2.2.3 Discussion et conclusion

Nous pouvons tenter d'expliquer les résultats obtenus lors des tests *in vitro* pour les composés de la famille du donécopride en s'attardant sur la structure de l'AChE du varroa, de l'abeille et de l'homme. La structure expérimentale de l'AChE humaine en complexe avec le donépezil (code PBD : 4EY7), ainsi que l'analyse par docking du donécopride dans l'AChE humaine a souligné l'importance de plusieurs résidus [426,427]. Le cycle cyclohexane du donécopride, et le cycle benzène du donépézil, sont tous deux orientés vers le résidus Trp84 (numérotation selon l'AChE humaine, référence Uniprot : P22303) pour former une interaction de type hydrophobe et de π-stacking respectivement. L'azote chargé positivement du cycle pipéridine du donécopride (Figure 38) interagie, par l'intermédiaire d'une molécule d'eau, avec les résidus Tyr337 et Tyr341. De plus, le donécopride est positionné de façon à permettre une liaison hydrogène entre le groupe carbonyle et la Phe295, et le tryptophane du PAS (Trp286 chez l'humain) est situé à une distance idéale du cycle benzène du ligand en faveur d'interactions de

π-stacking. En dehors de la Phe295, substituée par une isoleucine, tous ces résidus sont conservés dans les séquences d'AChE de la drosophile et de l'abeille. Chez le varroa en revanche, aucun de ces résidus n'est conservé (Tableau 7).

Tableau 7. Résidus impliqués dans les interactions entre le Donécopride et l'AChE humaine [426], et les résidus correspondants chez Drosophila melanogaster, Apis mellifera et Varroa destructor.

Humain	Drosophile	Abeille	Varroa
Trp86	Trp83	Trp116	Arg62
Trp286	Trp321	Trp336	Leu270
Phe295	Leu328	Leu343	Thr276
Tyr337	Tyr370	Tyr385	Phe318
Tyr341	Tyr374	Tyr389	Ala322

Le donépezil est la substance active du traitement Aricept®, utilisé pour traiter les symptômes de démence associés à la maladie d'Alzheimer. Il agit comme inhibiteur de l'AChE. La Figure 40 montre la zone du site actif de la structure expérimentale 4EY7, ainsi que la position estimée par docking du donécopride dans l'AChE de l'abeille et du varroa (la construction de ces modèles est décrite dans le § 3.2.3 de ce chapitre). La conservation des deux tryptophanes chez l'abeille permet le maintien des interactions, à travers d'une molécule d'eau, avec l'azote protoné du ligand. Leur substitution, dans l'AChE du varroa, altère fortement la formation du complexe donécopride/AChE. La plus grande homologie de l'AChE de l'abeille avec l'AChE humaine explique les profils d'activité observés *in vitro* pour les molécules de la famille du donécopride.

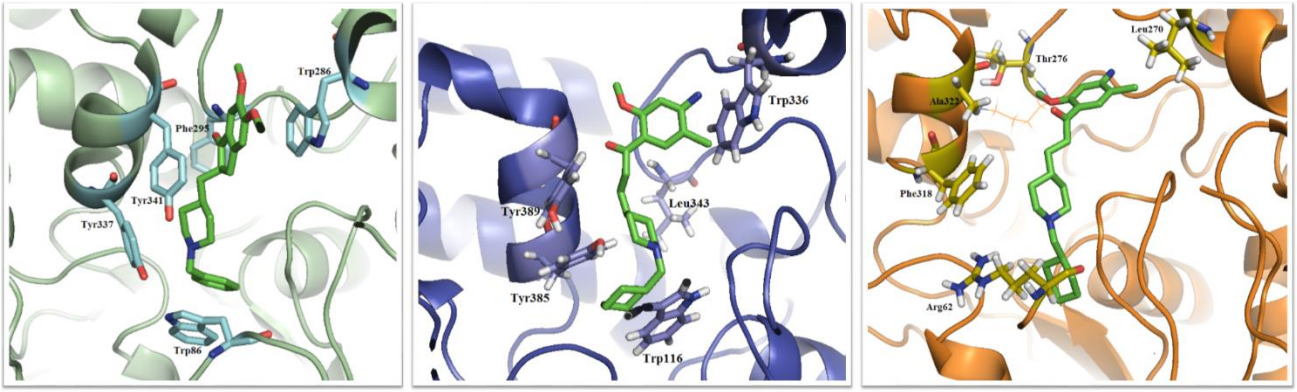


Figure 40. À gauche : structure expérimentale de l'AChE humaine en complexe avec le Donépezil (code PBD : 4EY7). Au milieu et à droite, positionnement par docking du Donécopride (ligand en vert) dans l'AChE de l'abeille et du varroa respectivement.

La seconde piste explorée a été d'évaluer le potentiel varroacide de composés ciblant l'AChE humaine. Les résultats concernant la famille du donécopride soulignent la nécessité de s'éloigner des molécules synthétisées au laboratoire dans le but d'inhiber l'AChE humaine. Certains résidus essentiels dans les interactions avec les ligands sont conservés entre les AChEs de l'abeille et de l'homme, et ne le sont pas chez l'enzyme du varroa. Dans le but d'étendre nos recherches parmi les molécules synthétisées au CERMN, la troisième piste suivie a été un criblage virtuel de la chimiothèque. Pour cela, les modèles des AChEs du varroa et de l'abeille ont été modélisés par homologie de séquence.

3.2.3 Construction des modèles par homologie de séquence

Nous avons précédemment mentionné que chez les insectes peuvent exister deux loci (*ace1* et *ace2*), codant pour deux enzymes AChEs distinctes. Le serveur Uniprot (www.uniprot.org/) [428] recense quatre entrées correspondant à la requête « acétylcholinestérase *Apis mellifera* », qui sont présentées dans le Tableau 8.

Tableau 8 – Références disponibles pour l'acétylcholinestérase de l'abeille sur Uniprot.

	Nom du gène codant	Nombre de résidus	Annotation
A0A087ZWF0	AChE-1	657	**
Q9GQP7	AChE	492	**
Q4LEZ2	AChE	628	**
A0A087ZSR6	AChE-2	628	**

Les trois dernières séquences du Tableau 8 sont en réalité redondantes, donc cela correspond bien avec l'existence des deux AChEs. L'AChE2 correspond à l'expression du gène *ace2*, orthologue de *DmAChE*.

Pour le genre *Apis*, c'est l'*AmAChE2* qui est principalement responsable de l'activité catalytique, et permet la transmission synaptique [429,430]. La séquence Q4LEZ2 a donc été utilisée pour modéliser l'acétylcholinestérase de l'abeille.

Concernant le varroa, la recherche de séquence a été faite à partir du génome brut, déposé auprès de NCBI Genbank sous le numéro d'accès GCA_000181155.2, et vérifiée par qPCR [404].

La construction des modèles de l'AChE de l'abeille et du varroa est antérieure aux travaux réalisés au cours de la thèse [431,431]. L'enzyme *DmAChE* co-cristallisée avec la tacrine (un

inhibiteur de synthèse) à une résolution de 2,7 Å par diffraction aux rayons X (code PBB :1DX4) a été utilisé comme *template*. Les alignements des séquences de l'abeille et du varroa avec la séquence du *template* 1DX4 sont présentés sur les Figure 41 et Figure 42 respectivement.

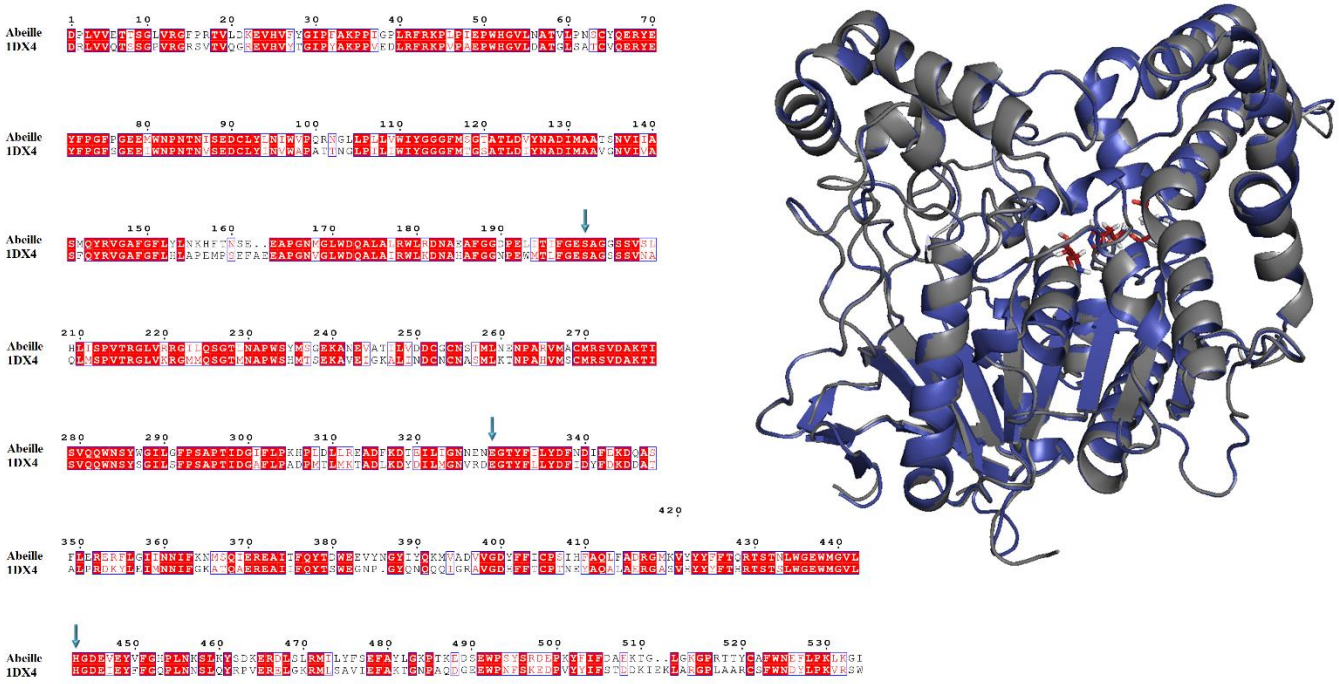


Figure 41. Alignement des séquences d'acétylcholinestérase de l'abeille (Q4LEZ2) et de la drosophile (code PDB : 1DX4). Les flèches bleues sur l'alignement de séquences signalent les trois résidus de la triade catalytique. A droite : superposition du template (en gris) et du modèle de l'AChE de l'abeille (en bleu). Les résidus rouges sur les modèles correspondent à la triade catalytique.

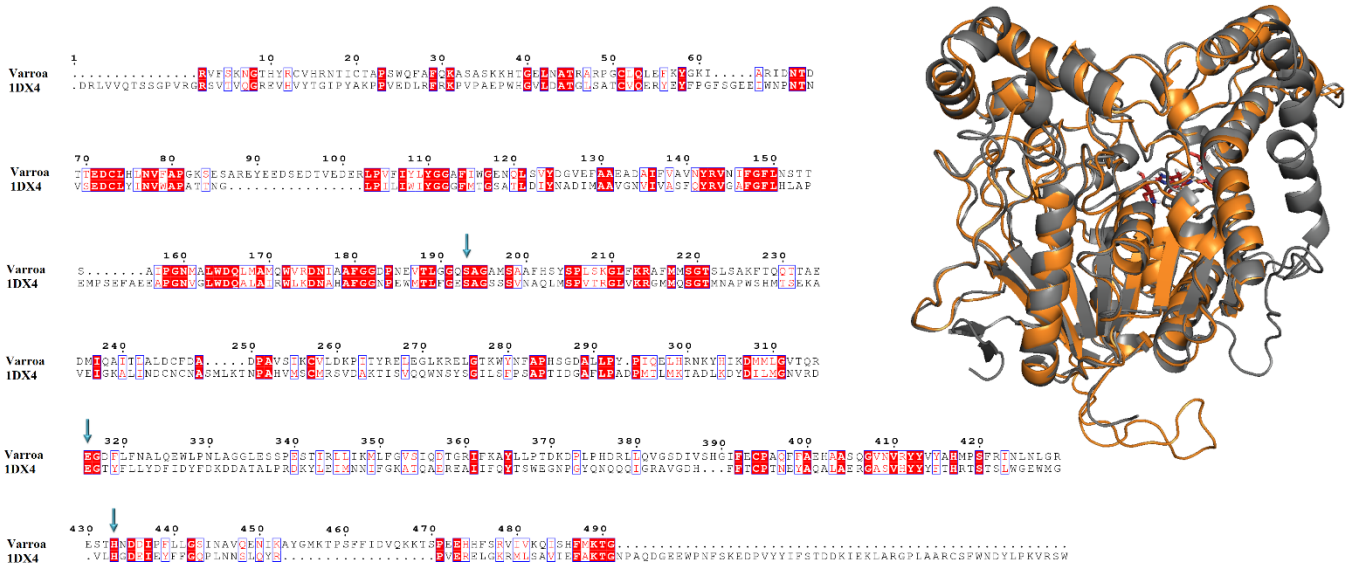


Figure 42. Alignement des séquences du varroa et de la drosophile (code PDB : 1DX4). Les flèches bleues signalent les trois résidus de la triade catalytique. À droite : superposition du template (en gris) et du modèle de l'AChE du varroa (en orange).

La séquence de l'abeille présente 60 % d'identité avec celle du *template*, alors que celle du varroa n'a que 21 % d'identité avec la séquence de *DmAChE*. Le risque d'erreur lors de la construction du modèle de l'enzyme du varroa est donc augmenté.

Parmi les 20 acides aminés qui constituent les protéines, sept d'entre eux (arginine, acide aspartique et glutamique, cystéine, histidine, lysine et tyrosine) présentent une fonction acido-basique sur leur chaine latérale, et peuvent être présents dans la structure de la protéine sous une forme acide (protoné) ou basique (non protoné). Il est courant de parler de l'état de protonation standard d'un acide aminé, qui est l'état de protonation de sa chaîne latérale à pH neutre, alors que la forme sous laquelle se trouve chaque acide aminé au sein de la protéine est l'état de protonation individuel. L'état de protonation individuel dépend de la position et de l'état de protonation individuel des autres acides aminés de la protéine, et peut jouer un rôle important dans les interactions avec le ligand et sur les calculs de dynamique moléculaire. Dans leur état standard, l'acide aspartique et l'acide glutamique sont sous leurs formes non protonées, et sont chargés négativement. La tyrosine et la cystéine sont sous leurs formes protonées et neutres. L'arginine, la lysine et l'histidine sont sous leurs formes acides, protonées et cationiques. L'histidine est un cas particulier car sous sa forme basique, non protonée, il existe deux possibilités concernant l'azote du cycle imidazol qui ne porte pas de proton.

Le comportement de la protéine lors des simulations de dynamique moléculaire est influencé par l'état de protonation des résidus. Le phénomène a été constaté lors de simulation pour l'AChE de la souris *Mus musculus* avec différents états de protonation pour deux acides glutamiques (Glu202 et Glu405) situés à proximité du site actif de l'enzyme [432]. Ces résidus sont conservés chez l'abeille (Glu251 et Glu501), mais ne le sont pas chez le varroa (Gln219 et Phe465). La vérification de l'état de protonation des résidus de la protéine a été effectuée avec le programme PROPKA [433] (champs de force CHARMM, pH=7,4), qui prend en compte l'impact de la structure tridimensionnelle de la protéine sur le déplacement des pKa des résidus. Pour l'étude du modèle du varroa, le programme PROPKA indique que les résidus Glu343 (de la triade catalytique), Glu145, Glu324 et Glu343 (chez le varroa) ont leur pKa qui est supérieur à 7,4 (au lieu de la valeur habituelle de 4,50), ces résidus prédominent donc sous leur forme acide (-COOH). La lysine Lys253 voit son pKa basculer de 10,50 à 5,50, rendant la forme non protonée prédominante à pH=7,4. Les états de protonation ont été manuellement pris en compte pour la construction du modèle de l'AChE du varroa.

3.2.4 Criblage de la chimiothèque dans le modèle de l'AChE du varroa

3.2.4.1 Paramétrage du modèle

La construction du modèle de l'AChE du varroa a permis de mener un criblage de la chimiothèque du CERMN.

Avant de commencer la simulation, une procédure de minimisation de l'énergie potentielle a été réalisée pour éliminer les zones d'énergie élevée. Le protocole suivant a été suivit :

- 500 pas de l'algorithme « *steepest descent* »,
- 1000 pas de la méthode des gradients conjugués,
- autant de pas de l'algorithme ABRN nécessaires pour que le RMS du gradient de l'énergie soit inférieur à 10^{-4} kcal.mol^{-1}.Å^{-1}.

Pour avoir un environnement correct lors de simulations, les molécules d'eau en bordure de boîte ont été répliquées à l'aide de l'algorithme IMAGE afin d'introduire les conditions périodiques aux limites (voir Chapitre 2 § 2.2.2.6 page 75).

Une simulation de dynamique moléculaire a ensuite été réalisée pendant 6 millisecondes à la température de 300 K. Le pas de simulation utilisé a été de 2 femtosecondes La structure de l'AChE représentative de la simulation a finalement été définie comme étant la structure moyenne de toutes les structures enregistrées lors de la dynamique. Pour finir, la structure

moyenne a été à nouveau minimisée afin d'éliminer les aberrations pour les chaines latérales des résidus les plus flexibles.

Pour le criblage, trois chaines latérales de résidus proches de la cavité du site actif ont été considérées flexibles : Trp115, Gln191 et Lys277. La cavité a été définie comme une sphère ayant un diamètre de 6 Å autour du NH de la Lys277.

3.2.4.2 Sélection des composés issus du criblage *in silico*

Du fait de la contribution de la taille des molécules lors de l'étape de scoring, le logiciel à tendance à surestimer le GoldScore (GS) des molécules à grand poids moléculaire (PM) [434]. Il s'avère que, dans la réalité, ces grandes molécules sont généralement inactives. Dans notre criblage, les 50 premières molécules (*i.e.* ayant les GS les plus grand) ont un PM moyen de 563 $g.mol^{-1}$, et les 100 et 1000 premières molécules ont un PM moyen de 515 $g.mol^{-1}$ et 423 $g.mol^{-1}$ respectivement. Pour contrer ce biais, parmi les 1000 composés avec les meilleurs scores de fit (GS compris entre 99,7 et 66,6), les molécules ayant un poids moléculaire supérieur à 350 $g.mol^{-1}$ ont été écartées des données. Le classement a ensuite été normalisé en divisant chaque valeur de GS par le poids moléculaire de la molécule. Les 50 molécules ayant les plus grands rapports ont été sélectionnées pour être testées *in vitro* (voir Annexe A.1 pour les structures des molécules).

3.2.4.3 Résultats des tests *in vitro*

Tests *in vitro* sur les composés directement issus du criblage

Parmi les cinquante molécules issues du criblage, quatre n'ont pu être testées *in vitro* car les stocks dans la chimiothèque étaient épuisés (SR2110, SR2111, SR2962 et SR7114), et deux molécules (les SR5562 et SR3690) n'ont pas été testées pour des raisons de solubilité. L'activité anticholinestérasique des autres molécules a été évaluée *in vitro* à 10^{-4} M chez l'abeille et chez le varroa en deux pseudo-réplicas.

Les résultats sont résumés sur la Figure 43 et dans l'Annexe A.1.

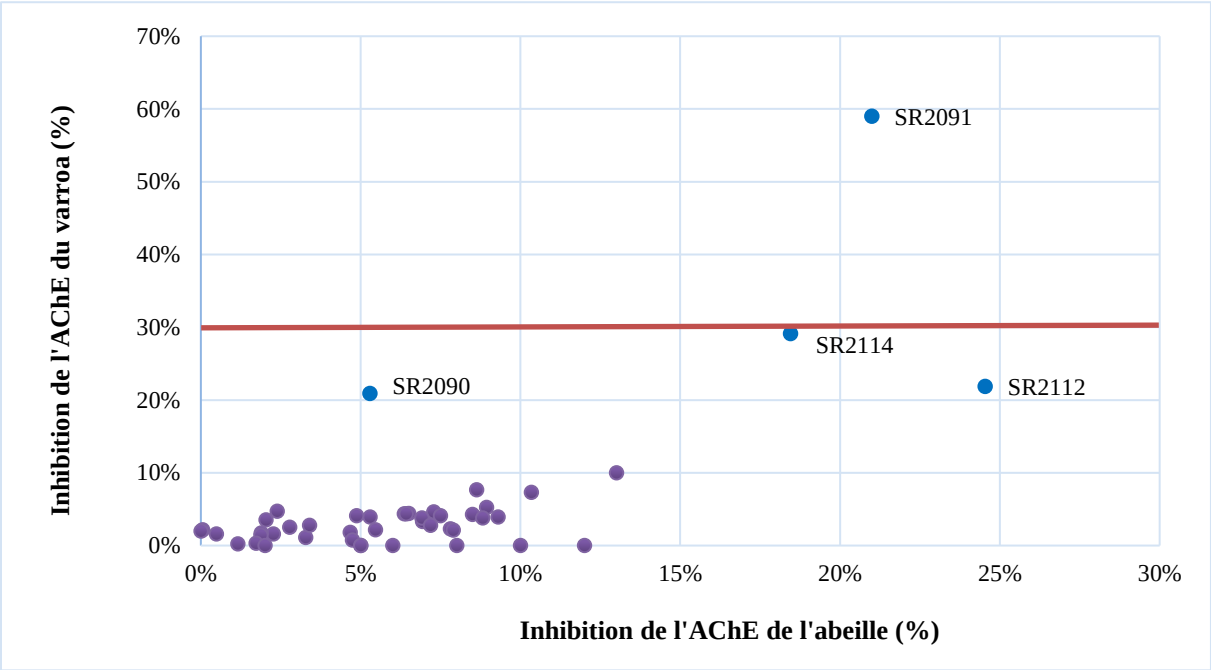


Figure 43. Pourcentages d'inhibition(n=2) in vitro de l'AChE de l'abeille (en abscisse) et de l'AChE de varroa (en ordonnée). Chaque point représente une molécule. La ligne rouge indique le seuil des 30% recherché pour l'inhibition minimum de l'AChE du varroa.

Sur la Figure 43, nous voyons que la majorité des molécules testées présentaient une activité sur les AChEs de l'abeille et du varroa inférieure à 15 %. Trois molécules se rapprochent du seuil recherché des 30 % d'inhibition. Il s'agit des composés SR2090, SR2114 et SR2112. Mais le résultat le plus intéressant concerne le point associé au composé SR2091, inhibant à 59 % l'AChE du varroa à 10^{-4} M, et à 21 % l'AChE de l'abeille. Ce composé (PM : 277,4 $g.mol^{-1}$) est ressorti du criblage initial en 172ième place avec un GS de 73,4. Suite à la normalisation par le PM, le SR2091 était classé en 48ième position.

Tests *in vitro* de l'activité des molécules de la famille du composé SR2091

Étant donné les résultats intéressants apportés par le composé SR2091, l'objectif est ici de voir si d'autres molécules, appartenant à la même famille, possèdent un profil similaire d'inhibition *in vitro* de l'AChE. En partant de la structure du SR2091, 26 molécules ont ainsi été testées. Les résultats sont présents sur la Figure 44, et les structures des molécules sont présentées sur l'Annexe A.2.

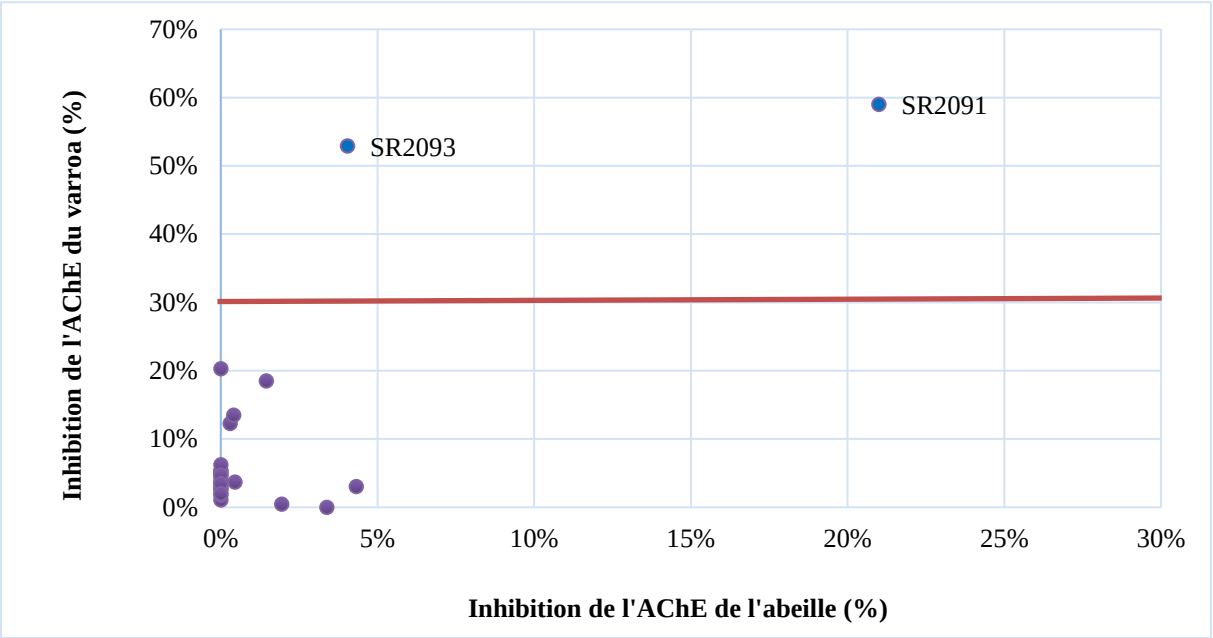
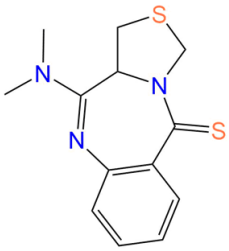
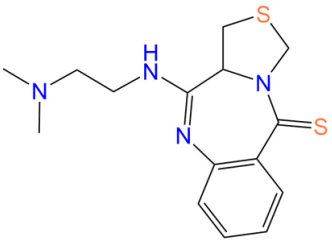


Figure 44. Pourcentages d'inhibition (n=2) in vitro de l'AChE de l'abeille (en abscisse) et de l'AChE de varroa (en ordonnée). Chaque point représente une molécule. La ligne rouge indique le seuil des 30% recherché pour l'inhibition minimum de l'AChE du varroa

Les résultats ont mis en évidence une molécule dont l'activité inhibitrice de l'AChE du varroa atteint 53 % - donc au-dessus du seuil limite – contre 4 % d'inhibition pour l'AChE de l'abeille. Il s'agit du composé SR2093 (PM : 320,5 ; GS : 69,6), classé au rang 534 selon le criblage avant la normalisation des scores.

Les structures du SR2091 et SR2093 sont visibles sur la Figure 45. Ces deux molécules ont en commun un cycle thiazolidine (c'est-à-dire comprenant un groupe thioéther et un groupe amine en position 1 et 3 respectivement). Le logiciel MarvinSketch permet d'estimer la protonation des molécules. À pH physiologique, il est estimé que les molécules SR2091 et SR2093 sont protonés à 33 % et à 52 % respectivement, ce qui pourrait favoriser interactions avec l'AChE.



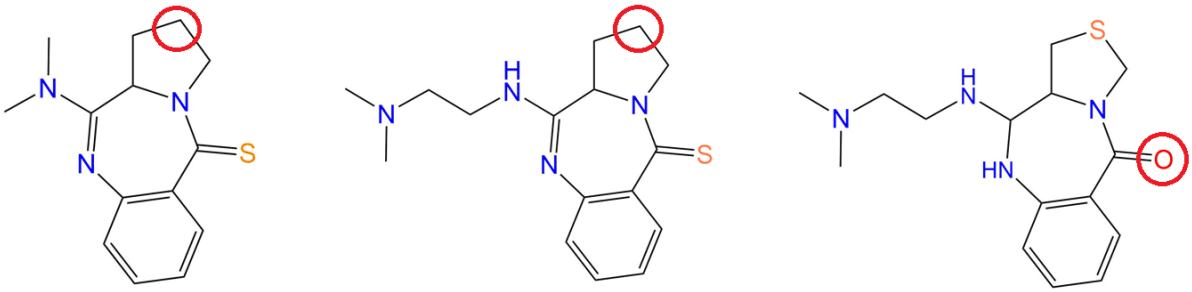


SR2091	
Poids moléculaire	277,4
Protonation	33 %

SR2093	
Poids moléculaire	320,5
Protonation	52 %

Figure 45. Structures, poids moléculaire et pourcentages de protonation estimés à pH= 7,4 par l'application MarvinSketch© (ChemAxon) des composés SR2091 et SR2093

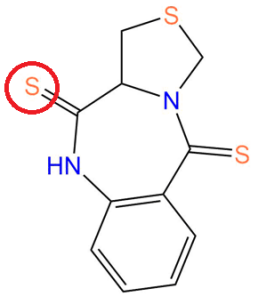
Les deux composés ne diffèrent dans leur structure que par l'addition d'un azote et de deux carbones sur la chaine latérale. Les autres molécules de la même famille n'étant pas actifs *in vitro*, il est possible de déterminer quelques éléments clé de la structure, essentiels à l'inhibition de l'AChE.



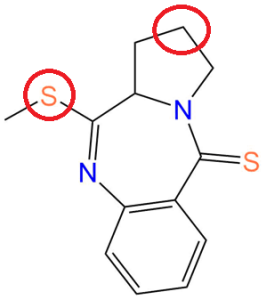
SR2112	
Poids moléculaire	259,4
Protonation	41 %
Inhibition AChE (10^{-4}M)	
Varroa	22 %
Abeille	25 %

SR2109	
Poids moléculaire	302,4
Protonation	49 %
Inhibition AChE (10^{-4}M)	
Varroa	0 %
Abeille	5 %

MR19199	
Poids moléculaire	304,4
Protonation	66 %
Inhibition AChE (10^{-4}M)	
Varroa	5 %
Abeille	0 %



SR2018	
Poids moléculaire	266,4
Protonation	3 %
Inhibition AChE (10^{-4}M)	
Varroa	4 %
Abeille	7 %



SR2739	
Poids moléculaire	262,4
Protonation	0 %
Inhibition AChE (10^{-4}M)	
Varroa	4 %
Abeille	9 %

Figure 46. Structure des composés SR2112, SR2109, MR19199, SR2018 et SR2739 et leurs pourcentages d'inhibition in vitro de l'AChE du varroa et de l'abeille.

La substitution de l'atome de soufre (S) du cycle thiazolidine par un atome de carbone ou de la chaine latérale par un atome d'oxygène (Figure 46) entraîne une perte de l'activité. Plusieurs auteurs ont mesuré une activité inhibitrice d'AChE chez des composés soufrés, le soufre d'un ligand étant susceptible de réagir avec un groupement sulfhydryle (-SH) de la chaine latérale d'un résidu cystéine [435]. Chez l'acarien *Tetranychus cinnabarinus*, trois composés sélectifs - comparés à l'AChE humaine - ont montré une activité d'inhibition *in vitro* et *in vivo* intéressante [436] ; ces trois inhibiteurs ont en commun des groupements indole et thiazolidine, connus pour leur importance dans les interactions avec le récepteur. Ces travaux, ainsi que nos résultats, appuient l'importance du soufre dans les interactions entre le ligand et l'AChE des acariens. En revanche, les résultats pour les composés SR2018 et SR2739 montrent que la

substitution de l'azote de la chaine latérale par un atome de soufre entraîne une perte de l'activité anticholinestérasique.

L'hypothèse d'interaction du ligand avec une cystéine conservée chez de nombreux insectes, présente à l'entrée de la gorge de l'AChE [437,438] ne peut pas être retenue dans le cas de notre étude. En effet, cette cystéine (Cys290 pour la *DmAChE*) se retrouve dans la séquence *AmAChE1* de l'abeille, et non dans celle de l'*AmAChE2* ni dans la séquence du varroa. De plus, le paramétrage du criblage (6 Å autour de la position du pirimicarbe) fait que les ligands sélectionnés se fixent profondément dans la gorge de l'enzyme, et non au voisinage du site périphérique.

Les complexes SR2091-AChE du varroa générés par docking ont été minimisés par dynamique moléculaire. Deux complexes ont été simulés afin d'observer les différences impliquées par la protonation (Figure 47 A et B), ou la déprotonation (Figure 47 C et D), de l'azote N4 du SR2091. Les observations des deux complexes permettent de poser des hypothèses sur les interactions engagées par SR2091.

Concernant les complexes avec le SR2091 protoné nous pouvons observer que :

- une liaison hydrogène se forme entre l'azote NE2 de l'His432 et l'azote N4 du ligand, séparés par une distance 2,5 Å
- la Phe318 est orientée de façon à permettre une interaction de π-stacking avec le cycle aromatique du ligand (Figure 47 A),
- une chaine hydrophobe, constituée des résidus Gly110 à Ile114, réalise des interactions de van der Waals avec le ligand,
- enfin nous pouvons noter que l'azote NE1 du Trp115 se situe à 3,6 Å du soufre du cycle thiazolidine du ligand

Concernant le complexe généré avec le SR2091 dans son état non protoné, la liaison hydrogène avec l'His432 ne pouvant plus se former, la dynamique réoriente le ligand dans la cavité de l'AChE. Ce complexe permet d'observer que :

- le π-stacking avec la Phe310 est perdue, mais le cycle aromatique du ligand se trouve à proximité de la Phe113, dans une position favorable pour une nouvelle interaction de π-stacking (Figure 47 C),
- il existe des interactions électrostatiques entre l'azote N4 non protoné du ligand et la chaîne latérale de la Lys277

- la distance entre le N4 du composé SR2091 et l'azote NE2 de l'His432 est de 3,7 Å dans ce complexe, et l'un des groupement méthyle du ligand est orienté vers cette histidine,
- le ligand établie toujours des interactions hydrophobes avec la chaîne hydrophobe de la protéine,
- - enfin le soufre du cycle thiazolidine du ligand fait face à l'azote NE de l'Arg62, à une distance de 3,4 Å.

Les deux complexes générés par dynamiques montrent que l'état de protonation du SR2091 influence fortement les interactions engagées. Les changements de résidus partenaires des interactions est de plus lié aux changements importants de la conformation de la protéine, qui sont observables au cours des simulations. Cette flexibilité du modèle de l'AChE du varroa, pourrait expliquer la difficulté de notre criblage à trouver de nouveaux *leads*.

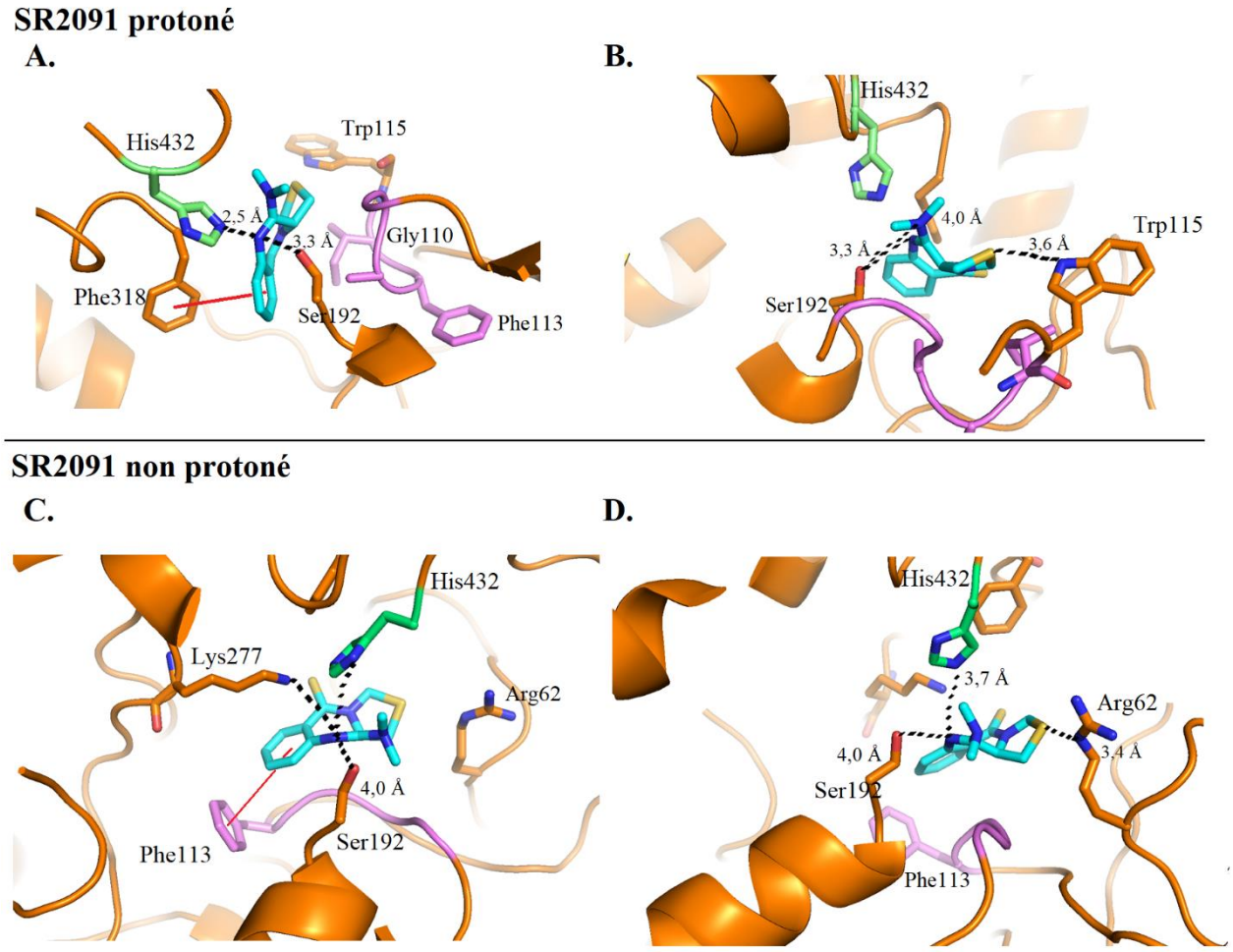


Figure 47. Visualisation des poses après minimisation du complexe SR2091protoné (A et B) et non protoné (C et D) dans le modèle de l'AChE du varroa, après dynamique moléculaires. Le ligand est en bleu. Les trais rouges indiques les interactions de π-stacking.

3.2.4.4 Détermination des IC_{50}

Les composés SR2091 et SR2093 sont les deux candidats issus du criblage de la chimiothèque. Leur IC_{50} respectives ont été déterminées pour mieux définir leur profil d'activité anticholinestérasique.

Tableau 9. Résultats des mesures in vitro des IC_{50} (± écart-type).

		SR2091	SR2093
Abeille	% inhibition (10^{-4} M)	21 % (± 0,06)	15 % (± 0,02)
Varroa	% inhibition (10^{-4} M)	59 % (± 0,07)	63 % (± 0,06)
	IC_{50} (µM)	16 (± 12)	11 (± 6)

Les deux composés ont une faible activité sur l'AChE de l'abeille, donc les IC_{50} ne sont pas calculables. Pour l'AChE du varroa, les IC_{50} du SR2091et SR2093 (16 et 11 µM respectivement) sont du même ordre. Le pirimicarbe, par comparaison, inhibe l'AChE du varroa à 66 % à 10^{-5} M et à un IC_{50} de 7 µM. On peut donc s'attendre à une moindre activité *in vivo* pour les composés SR2091 et SR2093 par rapport à l'efficacité anti-varroa du pirimicarbe.

3.2.4.5 Tests *in vivo*

L'objectif est de vérifier si la piste amenée par les tests *in vitro* permet d'observer des effets sur des varroas phorétiques. L'efficacité de deux composés SR2091 et SR2093 ont été évalués par dépôt thoracique sur abeille (description du test en cagette dans Chapitre 2 le § 2.4.4). Les concentrations ont été testées à 10 µg et 1 µg de molécule active par abeille. Les molécules ont été solubilisées dans de l'acétone additionné d'une mole d'acide chloridrique par mole de substance active.

Tableau 10. Résultats des tests en cagettes après 24 heures d'exposition. Le solvant est de l'acétone additionné d'acide chloridrique 1M.

		Mortalité [a]	
		Abeille	Varroa
SR2091 (n=6)	10 µg	0 %	85 % (± 3,3) *
	1 µg	0 %	7 % (± 1,1)
SR2093 (n=6)	10 µg	0 %	80 % (± 2,1) *
	1 µg	0 %	11 % (± 1,0)
Témoin solvant (n=6)		0 %	0 % (± 0,9)
Témoin positif (n=2)		0 %	100 %

[a] *pourcentage de mortalité après correction d'Abbott (*± écart-type*) * Différence significative, par rapport au témoin solvant, selon test post-hoc de Tukey (p-value < 0,05).*

Les composés SR2091 et SR2093 sont efficaces à 85 et 80 % respectivement lors d'une application de 10 µg par abeille. Il n'y a plus d'efficacité significative lorsque le dépôt est réduit à 1 µg par abeille. Par comparaison, rappelons qu'un dépôt de 0,1 µg par abeille d'amitraze entraîne 100 % de mortalité des varroas à 24 heures, et 87 % des varroas sont tués lors du dépôt de 1µg de pirimicarbe par abeille (voir Chapitre 3 § 3.2.1.3 page 99). Dans les conditions expérimentales réalisées, les deux composés de la chimiothèque sont donc moins efficaces que l'amitraze (d'un facteur 100) ou que le pirimicarbe (d'un facteur 10).

Les molécules de la chimiothèque du CERMN SR2091 et SR2093, issus de programmes de recherches sur des familles de molécules aux propriétés antitumorales [439], sont deux inhibiteurs sélectifs de l'AChE du varroa. L'étude de composés de la même famille a permis de mettre en avant des éléments structuraux nécessaire aux interactions avec la cible. Ces deux molécules peuvent servir de *lead*, et leur optimisation devrait permettre d'améliorer leur efficacité anti-varroa.

3.3 Conclusion sur la cible acétylcholinestérase

L'acétylcholinestérase est apparue, dès le début des travaux du laboratoire sur le varroa, comme une cible d'intérêt majeur.

La réorientation d'acaride de la famille des carbamates anticholinestérasique a permis de révéler le pirimicarbe comme un carbamate au profil acaricide intéressant. Le pirimicarbe est classé comme « modérément toxique pour l'abeille », et l'envisager dans le cadre d'un traitement anti-varroas doit s'accompagner de précautions. Il serait notamment intéressant d'évaluer la toxicité larvaire du pirimicarbe, sa toxicité étant documentée chez des larves de la famille des Syrphidae [440]. Dans l'état actuel de nos connaissances, il semble plus opportun de continuer à utiliser le pirimicarbe comme *lead* pour le développement de nouveaux traitements anti-varroas à visé anticholinestérasique.

L'accessibilité de la séquence de l'AChE du varroa, vérifié par séquençage lors d'une étude antérieure [404], a permis de construire un modèle de la cible par homologie de séquence. L'exploitation de ce modèle a fait ressortir deux molécules au profil intéressant de la chimiothèque du CERMN. Ces deux molécules présentent *in vitro* une activité d'inhibition de l'AChE du varroa du même ordre que le pirimicarbe, avec des IC_{50} de l'ordre de 10 µM. On constate *in vivo* une activité significative à 10 µg par abeille, et l'optimisation de leur structure devrait par la suite permettre d'améliorer ces résultats. Afin de limiter les tests *in vivo*, nous pouvons proposer, pour la poursuite des travaux, de viser des IC_{50} de l'AChE du varroa de l'ordre de 1 µM au maximum.

Si l'acétylcholinestérase est déjà ciblée par les traitements contenant du coumaphos, cette molécule ne dispose d'une AMM que dans un nombre restreint de pays. Le développement de varroacides inhibant sélectivement l'AChE du varroa répondrait donc à la problématique d'une diversification des modes d'actions là où le coumaphos n'est pas autorisé.

Chapitre 4
Les récepteurs à l'octopamine

4.1 Introduction

4.1.1 Rôle biologique de l'octopamine

L'octopamine (OA) [2-amino-1- (4-hydroxyphényl) éthanol] est une amine biogène synthétisée à partir de la tyramine, grâce à l'enzyme tyramine-β-hydroxylase. Cette molécule a été découverte dans les glandes salivaires de la pieuvre *Octopus vulgaris*, sans pour autant que sa présence ne soit fonctionnellement expliquée [441]. Un rôle physiologique de l'OA dans les tissus neuronaux n'a été suggéré que vingt ans plus tard, suite à l'observation d'une élévation de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) lors de l'application d'une faible concentration d'OA sur des préparations tissulaires de ganglions thoraciques chez la blatte *Periplaneta americana* [442]. Depuis, une variété d'implications biologiques majeures comme neurotransmetteur, neuromodulateur et neurohormone sont associées à l'OA chez les invertébrés [443]. Son action est homologue à celle de l'adrénaline et de la noradrénaline chez les vertébrés. Elle est le médiateur d'un grand nombre de comportements complexes et de processus physiologiques essentiels [444]. Plus précisément, l'OA est connue pour moduler l'activité d'organes comme le corps gras, l'activité des muscles liés aux ailes, le métabolisme des lipides, l'ovulation. Son action est également liée aux organes sensoriels via le système nerveux périphérique, à l'apprentissage et la mémoire olfactive via le système nerveux central. Enfin l'OA est essentielle pour la régulation de nombreux comportements : locomotion, nettoyage, rythmicité, alimentation. Chez l'abeille, l'OA est également impliquée dans le comportement de danse, dans la réponse du dard en situation de stress [445] et dans la division du travail [446].

L'octopamine exerce ces fonctions via l'activation de récepteurs spécifiques, appelés les récepteurs à l'octopamine, et qui appartiennent à la famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs).

4.1.2 Caractéristiques structurales des RCPGs

De nombreux systèmes de classification des RCPGs ont été proposés. La classification la plus répandue, encore à l'heure actuelle, est celle établie par Kolakowski en 1994, qui détermine sept classes de A à F, basées sur la recherche de similarité entre RCPGs connus de vertébrés ou d'invertébrés [447]. La classe A « Rhodopsin-like » est la mieux caractérisée, et aussi celle qui comporte le plus grand nombre de récepteurs. La classe A inclut la rhodopsine, les récepteurs β-adrénergiques, les récepteurs sérotoninergiques et les récepteurs à l'octopamine.

Par définition, les RCPGs exercent la plupart de leurs effets cellulaires en stimulant une étape clé du cycle d'activation de GTPases hétérotrimériques (ou protéines G) : l'échange GDP-GTP. Suite à l'association du récepteur avec son agoniste spécifique, un changement de conformation du RCPG lui permet d'activer la protéine G liée au récepteur. Ce sont ensuite les protéines G qui régulent l'activité de nombreuses enzymes, canaux ioniques ou le transport de vésicules diverses [448]. Les RCPGs répondent à une grande diversité de ligands. Ils incluent des agents physiques (photons pour la rhodopsine et les pigments visuels), des amines (noradrénaline, histamine, sérotonine, ...), des peptides, des hormones glycosylées, des dérivés lipidiques (prostaglandines, leucotriènes, ...), des dérivés d'acides aminés (GABA), des nucléosides ou nucléotides (adénosine, ATP, ...), des ions (Ca^{2+}) , une grande variété de substances odorantes (récepteurs olfactifs) ainsi que des composés exogènes (cannabinoïdes, peptides d'amphibiens: ranatensine ou bombésine). La classe A de récepteurs peut notamment avoir pour ligands des hormones, des polypeptides de petites et grandes tailles, des amines biogènes (Figure 48), des photons ou encore des substances apparentées aux lipides.

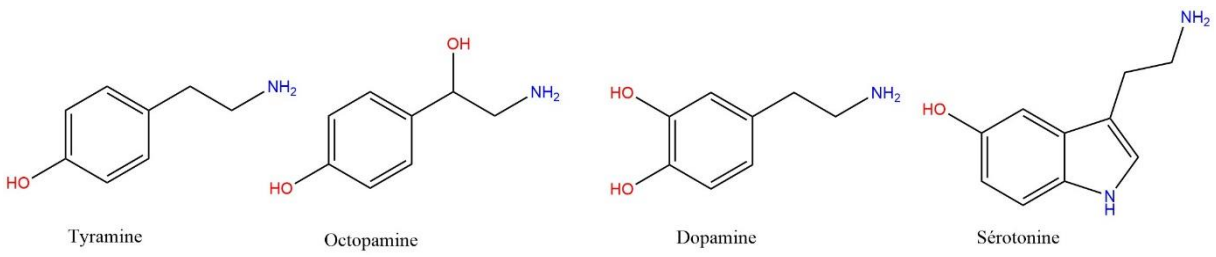


Figure 48. Structures de quatre ligands naturels de récepteurs RCPGs de classe A.

Les RCPGs sont constitués d'une chaîne polypeptidique unique comprenant sept segments hydrophobes qui forment autant d'hélices transmembranaires (Figure 49). Les sept segments transmembranaires (TM1 à 7), qui caractérisent les RCPGs, sont reliés par trois boucles intracellulaires (ICL1 à 3) et trois boucles extracellulaires (ECL1 à 3). L'extrémité N-terminale est située sur la face extracellulaire alors que l'extrémité C-terminale est sur la face intracellulaire.

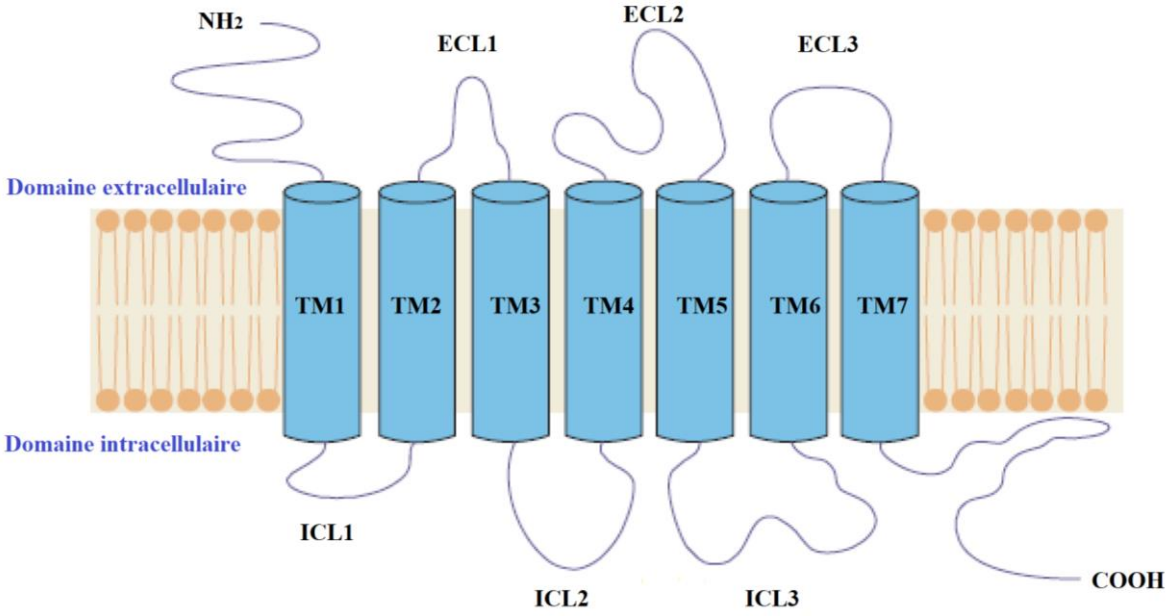


Figure 49. Illustration schématique de l'organisation des RCPGs.

Plusieurs résidus sont hautement conservés parmi les RCPGs de la classe A [449] (en rouge sur la Figure 50 du § 4.2.1 ; numérotation selon le récepteur β2-adrénergique de l'humain pour la suite de ce paragraphe) :

- le motif D(E)RY à l'extrémité intracellulaire de l'hélice transmembranaire TM3,
- le motif FxxCWxP se trouvant dans le milieu de l'hélice transmembranaire TM6,
- le motif NPxxY localisé dans le domaine transmembranaire TM7,
- les deux cystéines Cys106 et Cys191, formant un pont disulfure entre la boucle extracellulaire ECL2 et l'hélice TM3.

La plupart des RCPGs fonctionnent comme des protéines « allostériques monomériques » : les agonistes interagissent, totalement ou en partie, au sein de la partie extracellulaire du domaine des sept hélices pour induire la conformation active du récepteur, c'est-à-dire capable d'activer les protéines G.

Plusieurs résidus des récepteurs de la classe A sont connus pour leur importance dans les interactions avec le ligand. Pour les récepteurs β2-adrénergiques, il a été observé que le groupement protoné du ligand s'oriente de façon à former un pont salin avec l'Asp113 de l'hélice TM3, alors que les groupements hydroxyles peuvent former une liaison hydrogène avec la sérine Ser203 de l'hélice TM5. Il existe également une interaction de type π-stacking avec la Phe289 de l'hélice TM6. De plus, le tryptophane du motif FxxCWxP, ainsi que la Val114 de l'hélice TM3 pourraient engager des interactions hydrophobes avec le ligand. Les récepteurs à l'octopamine et à la tyramine appartiennent aux RCPGs de classe A, et sont similaires - en termes de structure et de pharmacologie - aux récepteurs adrénergiques des vertébrés [450].
La modélisation, par homologie de séquence, du récepteur à l'octopamine de la blatte *Periplaneta americana* (référence Uniprot : Q7YWB7) a montré la conservation de ces trois résidus Asp, Ser et Phe, dans le récepteur, et a appuyé leur implication dans les interactions avec l'OA [451]. Enfin, le résidus Thr110 chez la blatte (respectivement Thr118 chez l'humain) de l'hélice TM3 semble participer à la fixation de l'octopamine par l'intermédiaire d'une liaison hydrogène [451].

4.1.3 Classification des récepteurs à l'octopamine

Plusieurs classifications des récepteurs à l'octopamine ont été proposées selon la pharmacologie ainsi que la voie de signalisation des récepteurs. De nouvelles classifications mettent l'accent sur l'homologie de la séquence avec les sous-types de récepteurs adrénergiques des vertébrés. À l'heure actuelle, nous retiendrons que les récepteurs à l'octopamine peuvent être classés en trois catégories [450] : les récepteurs de type α-adrénergique *like*, de type β-adrénergique *like* et les récepteurs de type octopaminergique/tyraminergique *like*. Ces trois types de récepteurs à l'octopamine sont répertoriés chez l'abeille (Tableau 11).

Tableau 11 – Classification des récepteurs à l'octopamine, d'après Farooqui (2012) [452]

Classe	Réponse associée	Exemple de récepteur [a]	Référence
α-adrénergique *like*	↑ Ca^{2+} ↑ AMPc	AmOctαR1 (anciennement AmOA1) DmOctαR1B	453 454
β-adrénergique *like*	↑ AMPc	AmOctβR1 à 4	455

Tyramine 1	↑ Ca^{2+} ↓AMPc	Amtyr1 DmTA1	[456] [452]
Tyramine 2	↑ Ca^{2+}	BmTAR2	[457]

[a] sigles pour les espèces Am : *Apis mellifera* Dm : *Drosophila melanogaster* Bm : *Bombyx mori.*

Les récepteurs à l'octopamine de type α et β adrénergique *like* ont une meilleure affinité pour l'octopamine que pour la tyramine ; les premiers sont associés à une augmentation intracellulaire du Ca^{2+} et, dans une moindre mesure, de l'AMPc, alors que l'activation des seconds entraîne l'augmentation du Ca^{2+} uniquement [458].

L'interaction des formamides avec les récepteurs à l'octopamine provoque chez les insectes une hyperexcitabilité, une paralysie puis la mort [133], et également un décrochement et la mort chez les acariens parasites [459]. L'activité neurotoxique de certaines huiles essentielles, ou de leurs composants purifiés, semble également pouvoir être imputée à leur liaison aux récepteurs à l'octopamine et à la tyramine [460]. Blenau *et al*., ont souligné en 2012 l'intérêt que pourrait représenter la construction de modèles de récepteurs à l'octopamine et d'études par docking pour le développement de nouveaux varroacides [461].

4.2 Résultats

4.2.1 Construction des modèles par homologie de séquence

De manière générale, les protéines membranaires représentent un défi particulier en terme de structure expérimentale pour plusieurs raisons [462]. D'une part, ces récepteurs sont en général faiblement exprimés, rendant difficile la production et la purification des quantités de protéines recombinantes suffisantes pour l'utilisation des techniques expérimentales telles que la cristallisation. D'autre part, la dénaturation des RCPGs, lorsqu'ils sont sortis de leur environnement lipidique, nécessite de trouver un moyen de les stabiliser. La surface de ces protéines est globalement hydrophobe ; cela rend difficiles les étapes d'expression hétérologue (c'est-à-dire de production de la protéine par un organisme hôte), de solubilisation, de purification et de cristallisation. Ainsi, sur les 134 436 structures expérimentales de protéines référencées dans la PDB, seulement 1 292 structures de protéines membranaires sont répertoriées, avec seulement 721 protéines uniques correspondantes (Source consultée en octobre 2017 : blanco.biomol.uci.edu/mpstruc/, Membrane proteins of known 3D structure database,).

De ce fait, aucune structure expérimentale d'un récepteur à l'octopamine n'est résolue à ce jour. En revanche, les structures d'autres récepteurs de la famille des RCPGs ont pu être résolues expérimentalement, comme la rhodopsine bovine, par Palczewski *et al.* à 2,8 Å (code PDB : 1F88 [463]), ou le récepteur β2-adrénergique humain déterminé à une résolution de 2,4 Å par diffraction aux rayons X (code PBB : 2RH1[464], Figure 50). Pour ce dernier, le cristal a été obtenu en utilisant une protéine de fusion où la troisième boucle intracellulaire a été substituée par le lysozyme T4 (en vert sur la Figure 50), pour rendre la protéine plus soluble et ainsi faciliter la cristallisation.

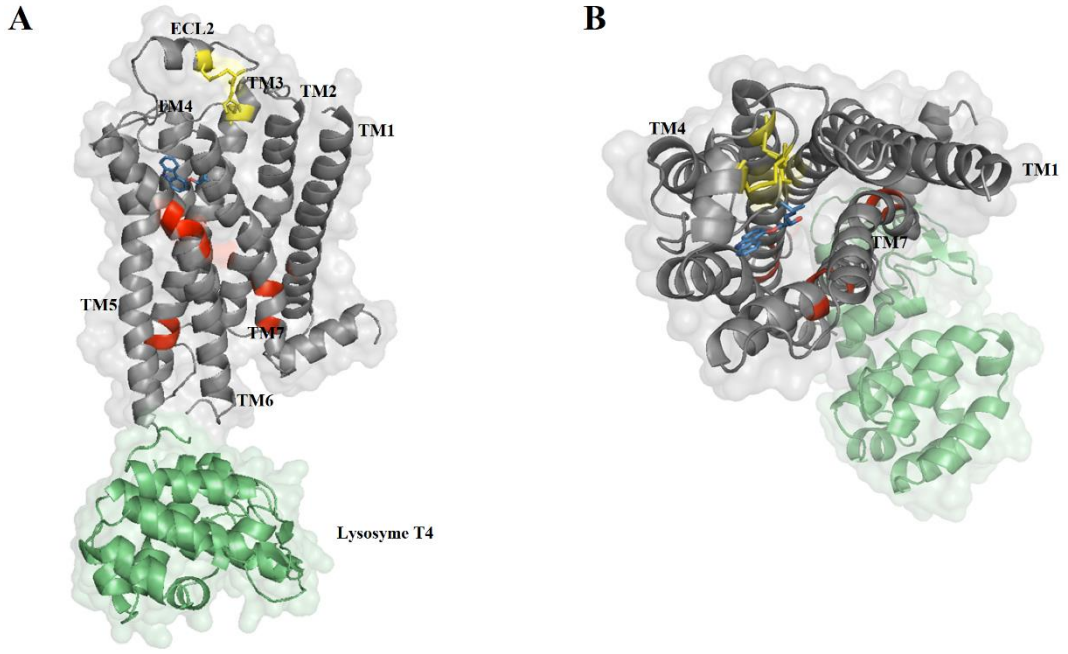


Figure 50. Structure 3D du récepteur β2-adrénergique humain (code PDB : 2RH1 [464]). En vert : lysozyme T4. En rouge les motifs conservés (DRY, FxxCWxP et NPxxY) caractéristiques des RCPGs de la classe A. En jaune les ponts disulfures. TM : hélice transmembranaire. A : vue de profil, B : vue de dessus, du côté extracellulaire. On note que chez le récepteur β2-adrénergique de l'humain les cystéines Cys184 et Cys190 forment un second pont disulfure.

Pour ces raisons, à l'instar de la méthodologie développée avec l'acétylcholinestérase (voir Chapitre 3 § 3.2.3 page 114), une approche par homologie de séquence a été mise en œuvre dans le but de modéliser les récepteurs à l'octopamine de l'abeille et du varroa.

L'interrogation du serveur Uniprot (www.uniprot.org/) [428] pour trouver la séquence du récepteur à l'octopamine de l'abeille *Apis mellifera* propose huit entrées (Tableau 12). Trois de ces séquences (Q869D9, A0A0B5EFI0 et A0A0B5EDW7) ne sont que des fragments.

Tableau 12. Références, dans le serveur Uniprot, associés à la recherche des séquences d'acides aminés de récepteurs à l'octopamine d'Apis mellifera.

Référence	Classe	Nom du gène codant	Nombre de résidus	Annotation
Q70TB0	α-adrénergique like	*Oa1*	587	*
W0U8S1	β-adrénergique like	*Octbeta1*	428	*
W0U9P0	β-adrénergique like	*Octbeta2*	413	*
H9KTV2	β-adrénergique like	*Octbeta3*	413	*
W0U9Q1	β-adrénergique like	*Octbeta4*	401	*
Q869D9	Fragment	*OAR*	139	*
A0A0B5EFI0	Fragment	*Oa2*	40	*
A0A0B5EDW7	Fragment	*Oa1*	28	*

Des études menées sur mammifères [465] et chez l'abeille [466] suggèrent que l'amitraze, molécule active de plusieurs traitements anti-varroas, se fixe aux récepteurs α2-adrenergique des vertébrés et α-adrénergique *like* des invertébrés. C'est donc la séquence Q70TB0, codant pour le récepteur AmOctαR1, qui a été utilisée pour construire le modèle du récepteur à l'octopamine de l'abeille.

La recherche du *template* a été réalisée sur la plateforme en ligne @TOME (@utomatic Threading Optimization Modeling and Evaluation, atome.cbs.cnrs.fr/). La plateforme permet entre autres, de trouver parmi les structures expérimentales de la PDB, les plus homologues à la séquence étudiée. Les méthodes de screening PSIBLAST et HHSARCH ont été utilisées. Parmi les propositions d'@TOME, la structure 2RH1 du récepteur β2-adrénergique humain a été sélectionnée pour servir de *template*. Cette structure a été choisie d'une part pour son homologie avec la séquence Q70TB0 (30 % d'identité selon l'alignement initial sur @TOME) et d'autre part pour le lien phylogénétique entre les récepteurs à l'octopamine et les récepteurs adrénergiques des vertébrés. C'est également, parmi les structures expérimentales proposées, celle avec la meilleure résolution.

L'alignement de la séquence du récepteur à l'octopamine de l'abeille avec celle du *template* (2RH1) a été réalisée avec le module MODELLER sous Discovery Studio 3.5, et modifié manuellement, pour assurer le respect des structures secondaires et des motifs conservés des RGPGs de classe A. L'alignement final est présenté sur la Figure 51.

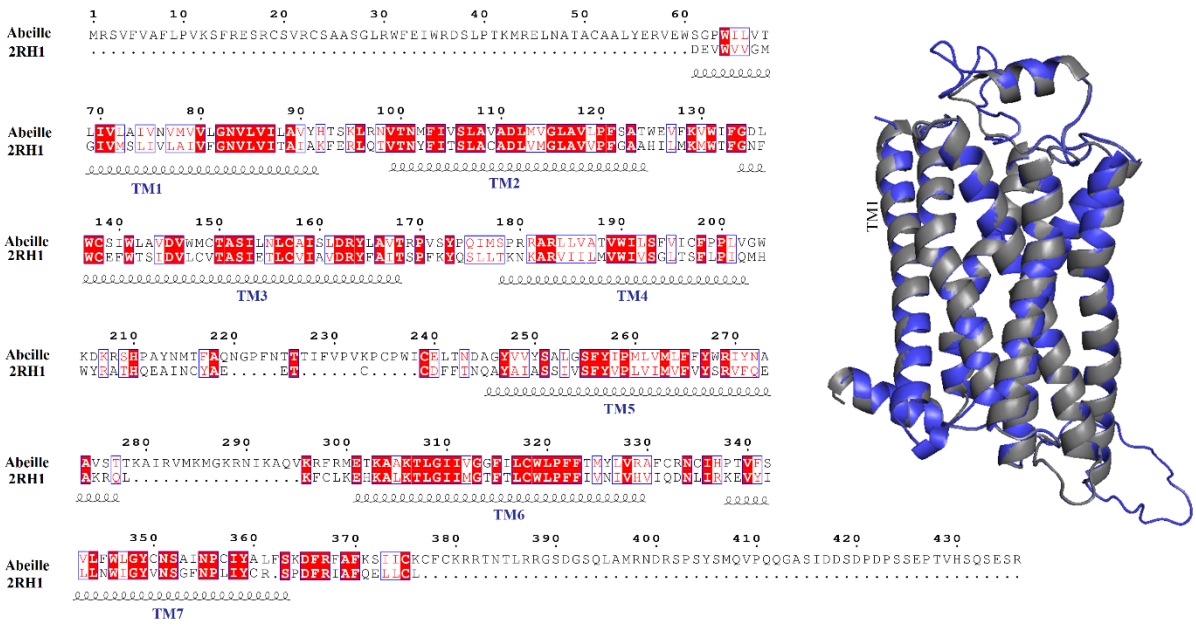


Figure 51. Alignement des séquences Q70TB0 et du template 2RH1 (à gauche). Superposition des structures (à droite) avec en gris la structure 2RH1 et en bleu celle de l'abeille.

L'alignement final ne présente qu'une identité de séquence de 26 %. Cependant, la conservation des sept domaines transmembranaires, et la présence de motifs conservés entre les membres de la famille de RCGP, rendent la construction de modèle de qualité possible même lorsque l'identité avec le *template* atteint une vingtaine de pour cent seulement [467]. Le modèle 3D du récepteur AmOctαR1 a donc été construit avec le module MODELLER sur le logiciel Discovery Studio 3.5 à partir de cet alignement.

Concernant le varroa, le serveur Uniprot contient une référence pour une protéine RCPG du varroa sous l'entrée A0A141CIT9, mais celle-ci n'est pas annotée comme étant un récepteur à l'octopamine. La recherche de séquence s'est donc faite à partir du génome brut, déposé auprès de NCBI Genbank sous le numéro d'accès GCA_000181155.2. Ce travail a été effectué par Céline Gaudin de l'Université de Caen Normandie.

Trois séquences ont été proposées (les alignements de ces séquences avec le *template* sont visibles en annexe A.3) :

1. VDK00069120-1570, assimilée à un récepteur α_{2b} adrénergique pour laquelle ni le motif DRY ni le pont disulfure ne sont conservés.
2. VDK00037324-2391 assimilée à un récepteur à la dopamine, pour laquelle le motif DRY n'est pas conservé.

3. VDK00030699-2652 assimilée à un récepteur à l'octopamine sur laquelle les trois motifs consensus sont retrouvés.

De par son importance pour la conformation [468], le motif D(E)RY est attendu dans les RCPGs de classe A. Seule la séquence VDK00030699-2652 conserve ce motif ; c'est de plus cette séquence qui est assimilée directement à un récepteur à l'octopamine. C'est donc cette séquence qui a été choisie pour modéliser le récepteur à l'octopamine du varroa.

La séquence VDK00030699-2652 a été soumise sur la plateforme @TOME afin de choisir le *template* à utiliser pour la construction du modèle 3D. Là encore, et pour les mêmes raisons invoquées lors de la construction du modèle de l'abeille, la structure 2RH1 a été sélectionnée comme *template*. La séquence VDK00030699-2652 a été alignée avec celle du *template* 2RH1, avec un ajustement manuel tout comme pour l'abeille. L'alignement final est présenté sur la Figure 52.

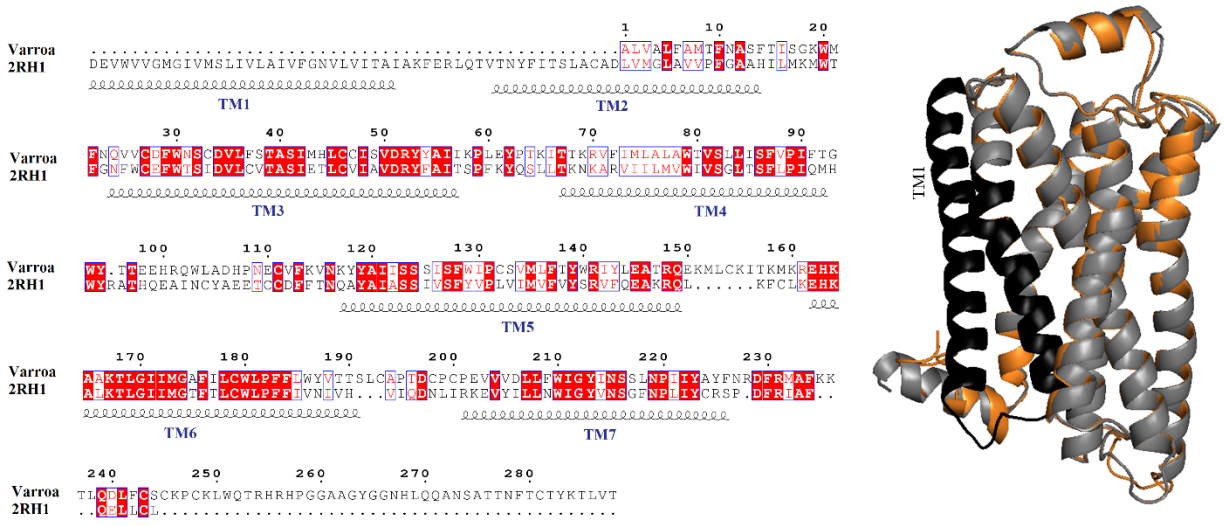


Figure 52. Alignement des séquences (à gauche). Superposition des structures (à droite) avec en gris la structure 2RH1 et en orange celle du varroa. En noir sont les résidus du template sans correspondance avec la séquence du varroa.

Le pourcentage d'identité entre les deux séquences est de 30 %, ce qui serait suffisant pour générer un modèle de qualité. Cependant, la séquence du varroa est incomplète. En effet, les deux premières hélices transmembranaires (TM1 et une partie de la TM2) sont manquantes (Figure 52). Le modèle partiel du récepteur à l'octopamine a tout de même été généré sur le logiciel Discovery Studio 3.5, en utilisant le module MODELLER.

L'alignement des modèles des récepteurs à l'octopamine du varroa et de l'abeille générés avec la structure 3D du *template* permet de voir que les quatre résidus de 2RH1 fixant le ligand carazolol sont conservés chez l'abeille comme chez le varroa (Figure 53 et Tableau 13).

Tableau 13. Résidus impliqués directement dans les interactions avec le ligand et le récepteur β2-adrénergique humain, et les résidus correspondant chez Periplaneta americana (Q7YWB7), Apis mellifera (Q70TB0) et Varroa destructor (VDK00030699-2652).

Humain	Blatte	Abeille	Varroa
Asp113	Asp105	Asp145	Asp34
Val114	Val106	Val146	Val35
Thr118	Thr110	Thr150	Thr39
Ser203	Ser213	Ser251	Ser123
Phe289	Phe260	Phe322	Phe183

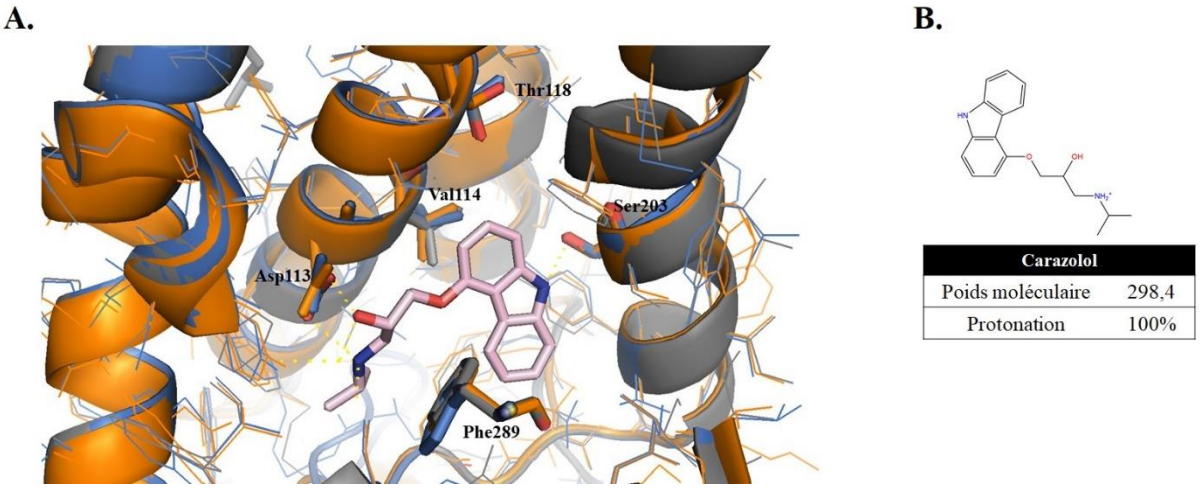


Figure 53. A : structure expérimentale du récepteur β2-adrénergique de l'humain (2RH1, en gris) en complexe avec le carazolol (en rose). En bleu modèle de l'abeille, en orange modèle du varroa. Les trois modèles sont superposés. Les cinq résidus directement impliqués dans l'interaction avec le ligand sont montrés par une représentation en stick (numérotation selon 2RH1). B : structure, poids moléculaire et état de protonation estimé à pH= 7,4 du carazolol.

De manière général, les sites actifs de l'abeille et du varroa sont proches, mais deux résidus diffèrent (Figure 54).

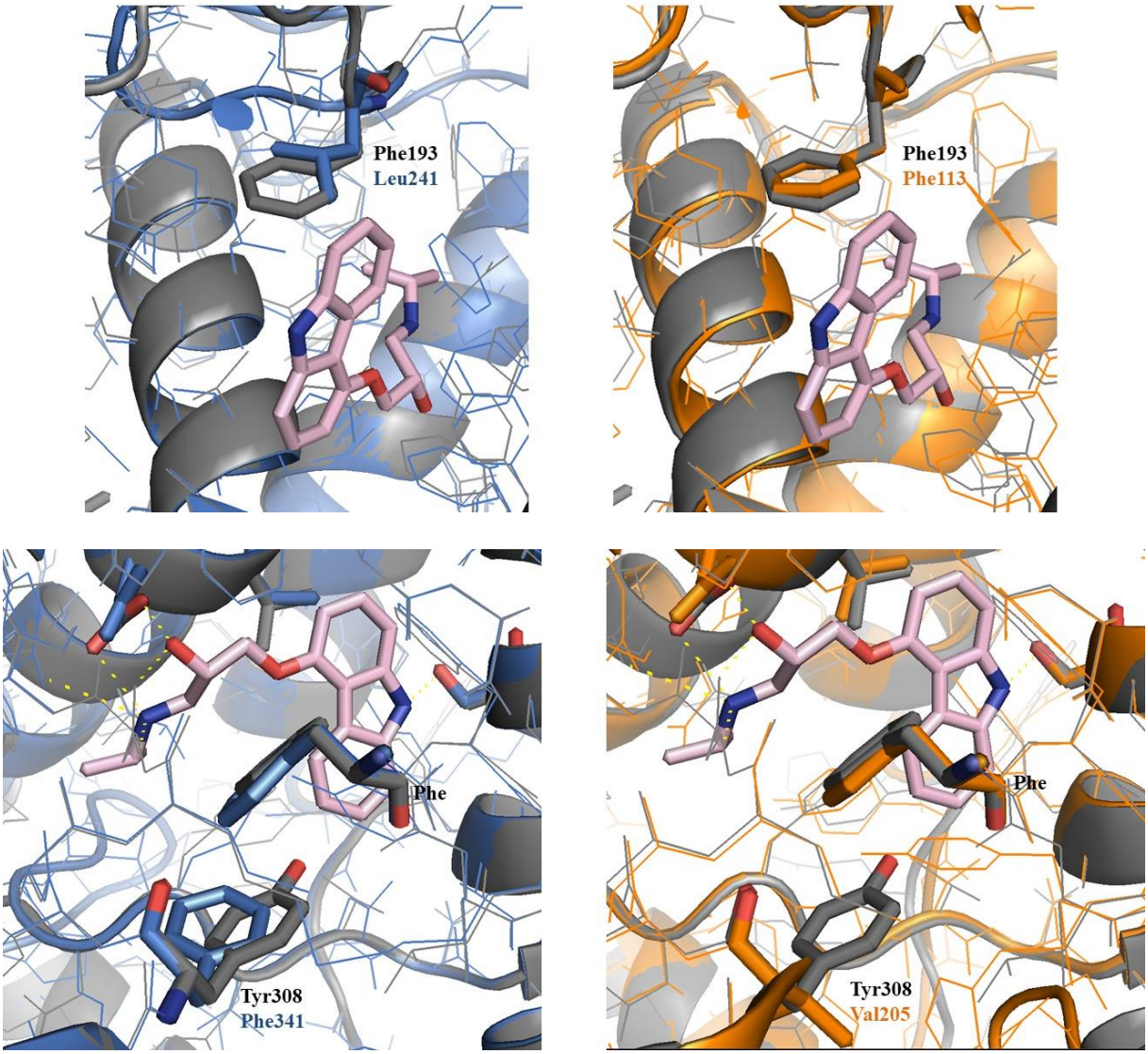


Figure 54. Superposition du récepteur β2-adrénergique de l'humain (2RH1, en gris) - en complexe avec le carazolol (en rose) – avec modèle de l'abeille (en bleu), ou le modèle du varroa (en orange).

La Phe193 du récepteur β2-adrénergique est substituée par une leucine chez l'abeille, alors qu'elle est conservée chez le varroa. La Tyr308 du récepteur β2-adrénergique est substituée par une phénylalanine chez le varroa et une valine chez l'abeille. De ces substitutions peuvent découler des variations dans l'accessibilité de la cavité pour les ligands, et influencer la flexibilité des résidus alentours. La substitution de la phénylalanine notamment, dans le récepteur AmOctαR1, peut empêcher les interactions de type π-stacking avec le ligand. Ce potentiel reste inchangé chez le varroa, ce qui pourrait être exploité dans la conception de nouvelles molécules sélectives.

Bien que le pourcentage d'identité entre le *template* et la séquence sélectionnée pour le récepteur à l'octopamine du varroa soit correct pour la modélisation par homologie de séquence, le manque des deux premières hélices transmembranaires empêche toutes les étapes de minimisation et de dynamique moléculaire avec ce modèle. Un criblage par docking n'a donc pas été employé dans le cadre des travaux sur le récepteur à l'octopamine. Nous avons privilégié un criblage *in silico* par similarité de structure, en se basant sur la structure de l'octopamine et d'un dérivé de l'amitraze. Les tests *in vitro* n'ont pas pu être mis en place au laboratoire, la validation de l'efficacité des molécules a donc été réalisée *in vivo* selon le protocole en cagette décrit dans le Chapitre 2 § 2.4.4.

4.2.2 Résultats des tests *in vivo*

4.2.2.1 Efficacité des dérivés de l'amitraze

Nous avons vu que l'amitraze est une molécule particulièrement efficace dans le traitement anti-varroa. La collaboration avec Vétopharma a apporté l'occasion de tester *in vivo* les quatre dérivés de l'amitraze (Figure 55).

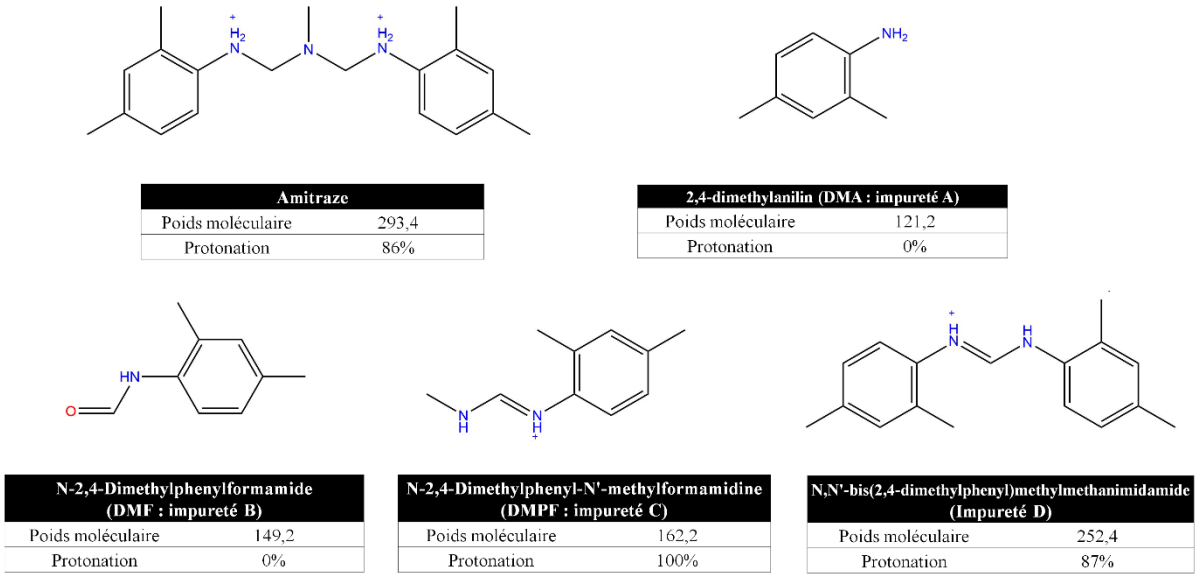


Figure 55. Structures et poids moléculaires (g.mol^{-1}) de l'amitraze et de ses quatre impuretés. Sont également mentionnés les pourcentages de formes protonées présentes à pH= 7,4 estimés par l'application MarvinSketch© (ChemAxon).

Un premier test à la concentration unique de 0,1 µg par abeille a été effectué. Le choix d'une concentration unique a été fait afin d'économiser le matériel biologique, et la concentration a été choisie en fonction de la dose efficace de l'amitraze. Ce premier test (Figure 56 A) a permis de montrer une efficacité significative du DMPF équivalente à celle de l'amitraze. En revanche,

les trois autres impuretés n'ont pas montré d'effet sur le varroa. Aucune mortalité des abeilles n'a été observé à 24 heures lors de ces tests.

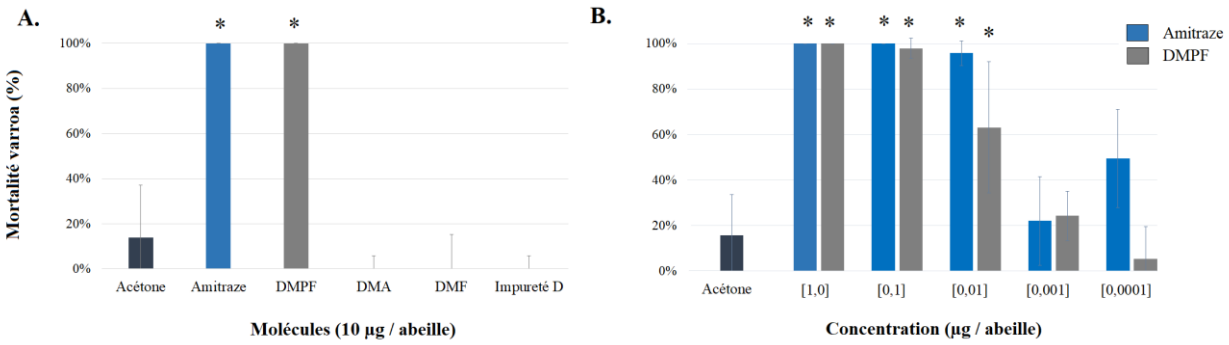


*Figure 56. Mortalité des varroas à 24 heures (± écart-type) A : test à dose unique (n=3) B : test de l'amitraze et du DMPF en gamme de concentrations (n=5). * Différence significative selon test post-hoc de Tukey (p-value < 0,01).*

Suite aux résultats du premier test, le DMPF, ainsi que l'amitraze pour servir de point de comparaison, ont été testé *in vivo* suivant une gamme allant de 1 à 0,0001 µg par abeille (Figure 56 B). L'analyse statistique montre une efficacité anti-varroa comparable entre l'amitraze et le DMPF. Les deux molécules sont efficaces jusqu'à 0,01 µg par abeille, et n'ont plus d'effet sur la survie des varroas à partir de 0,001 µg par abeille.

Dans le cadre de notre étude, nous nous sommes focalisés sur le DMPF, et non sur l'amitraze, car son poids moléculaire est plus faible, et nous avons déjà mentionné dans le Chapitre 3 le biais dans l'estimation des interactions des molécules de grand poids moléculaire par le logiciel GOLD. De plus, l'activité du DMPF est équivalente à celle de l'amitraze, et le DPMF correspond donc au fragment portant les caractéristiques nécessaires pour l'interaction avec le récepteur à l'octopamine du varroa, et la structure du DMPF est proche de celle de l'octopamine.

Une étude par docking a été réalisée afin de poser des hypothèses sur l'origine de la sélectivité du DMPF envers le varroa.

Les prédictions de positions du DMPF dans le modèle du varroa ont été faites avec le logiciel GOLD, avec deux contraintes de distances définies : entre l'azote N9 du ligand et l'oxygène OD1 de Asp34 ; 3,5 Å entre l'azote N11 du ligand et l'azote ND2 de l'Asn11. Ces contraintes ont été imposées dans le but de favoriser la formation de la liaison hydrogène entre le ligand et l'acide aspartique. Les résidus Asn11 et Asp34 ont été définis comme flexibles, en activant la librairie de rotamères proposée par le logiciel. Les résultats du docking ont été visualisés dans le logiciel PyMOL, qui permet de calculer les distance inter-atomiques.

Les deux poses représentatives de notre étude de docking sont visibles sur la Figure 57 et la Figure 58.

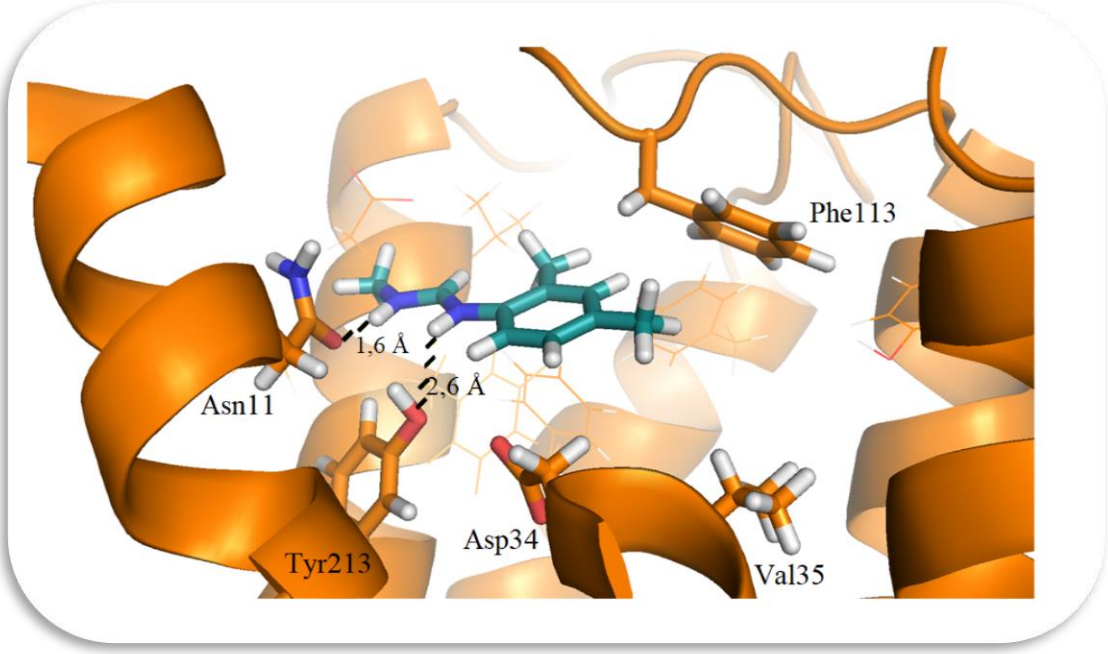


Figure 57. Solution 1 du docking du DMPF (en vert) dans le modèle du récepteur à l'octopamine du varroa. Les pointillés noirs indiquent les liaisons hydrogènes potentielles.

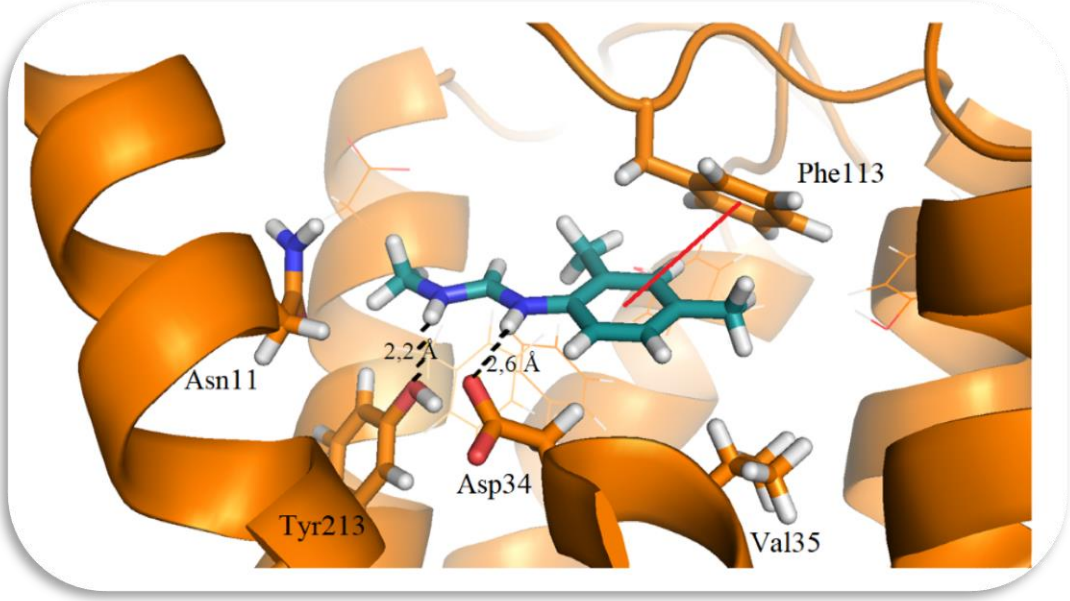


Figure 58. Solution 2 du docking du DMPF (en vert) dans le modèle du récepteur à l'octopamine du varroa. Les pointillés noirs indiquent les liaisons hydrogènes potentielles.

Dans la première solution de docking (Figure 57), nous avons pu observer deux liaisons hydrogènes potentielles, la première entre l'azote N11 du ligand l'Asn11, une deuxième avec l'azote N9 du ligand et la Tyr213.

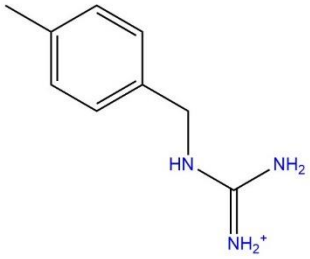
Dans la deuxième solution de docking (Figure 58), deux liaisons hydrogènes se forment également, mais cette fois en impliquant les résidus Asn11 et Asp34. Le DMPF est décalé d'environ 2 Å par rapport à la première solution. Dans cette deuxième solution, le décalage empêche la formation de la liaison hydrogène avec la Tyr213, mais favorise une interaction de π-stacking avec la Phe113.

Il est intéressant de constater que dans la première solution, le DMPF interagit avec le résidu Asn11 du récepteur du varroa, alors que ce résidu est substitué par une sérine chez l'abeille (Ser122). Dans la deuxième solution, la Phe113 du varroa est substitué chez l'abeille par une leucine (Leu241), qui ne peut pas participer dans des interactions de π-stacking. Les deux solutions de docking sélectionnées permettent donc de proposer des hypothèses sur la sélectivité du DMPF vis-à-vis du récepteur à l'octopamine du varroa par rapport à celui de l'abeille.

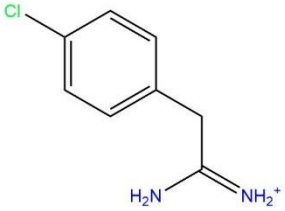
La modélisation par homologie de séquences du récepteur à l'octopamine du varroa et de l'abeille nous a permis d'avancer deux hypothèses pour expliquer la sélectivité du DMPF. Dans l'état actuel des connaissances sur de ces deux récepteurs, il n'est pas possible de choisir parmi ces deux hypothèses. Les différences observées sont cependant prometteuses pour le développement de nouvelles molécules sélectives du récepteur du varroa.

4.2.2.2 Similarité de structure

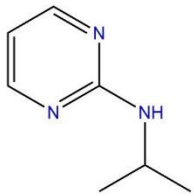
Pour les raisons mentionnées auparavant, le criblage de la chimiothèque du CERMN, par similarité de structure, s'est fondé sur les structures du DMPF et de l'octopamine. Le logiciel Pipeline Pilot 9.5 a été utilisé pour ce criblage, avec le coefficient de Jaccard/Tanimoto pour évaluer la similarité. Trois *fingerprints* ont été utilisés : ECFP4, FCFP4 et MDLKey. Parmi les molécules ressorties de ces criblages, celles ayant au minimum un cycle aromatique et un centre basique ont été sélectionnées, afin de se rapprocher des groupements présents dans nos deux composés de référence, *i.e.* l'octopamine et le DMPF. Treize molécules ont ainsi été testées *in vivo* en criblage, c'est-à-dire avec une seule concentration et une cagette par molécule (voir Annexe A.4 pour les structures et les résultats).



SR5870	
Poids moléculaire	176,3
Protonation	100%



SR5874	
Poids moléculaire	168,6
Protonation	100%



SR3190	
Poids moléculaire	137,1
Protonation	0%

Figure 59. Structure de trois des molécules sélectionnées lors du criblage par similarité de structure. Sont mentionnés les poids moléculaires et les pourcentages de formes protonées présentes à pH= 7,4 estimés par l'application MarvinSketch© (ChemAxon).

Parmi les treize molécules, les trois présentées sur la Figure 59 ont montré un effet sur le varroa. L'efficacité anti-varroa de ces trois molécules a été testée, cette fois en cinq réplicats à deux concentrations. Les résultats sont présentés dans le Tableau 14.

Tableau 14. Résultats des tests in vivo après correction de Abbott. Mortalité moyenne (±écart-type) à 24 heures. Solvant : DMSO 30%.

		Mortalité [a]	
		Abeille	Varroa
SR5870 (n=5)	10 µg	0 %	15 % (± 0,86)
	1 µg	0 %	15 % (± 1,17)
SR5874 (n=5)	10 µg	0 %	0 % (± 1,30)
	1 µg	0 %	0 % (± 0,70)
SR3190 (n=5)	10 µg	0 %	94 % (± 0,77) *
	1 µg	0 %	26 % (± 3,91)
Témoin solvant (n=5)		0 %	0 % (± 0,84)
Témoin positif (n=2)		0 %	100 %

[a] pourcentage de mortalité après correction d'Abbott (± *écart-type*)
* différence significative par rapport au témoin solvant (test post-hoc de Tukey, p-value < 0,01)

Les trois molécules n'entraînent pas de mortalité chez l'abeille. Le composé SR5874 ne montre finalement aucune efficacité, et le composé SR5870 présente une faible efficacité, qui n'est pas statistiquement significative. Le SR3190 entraîne 94 % de mortalité des varroas suite au dépôt de 10 µg par abeille, mais n'est plus efficace à 1 µg par abeille.

4.3 Conclusion sur les récepteurs à l'octopamine

Le récepteur à l'octopamine est déjà la cible des médicaments vétérinaires formulés avec de l'amitraze. Cette molécule est massivement utilisée depuis plus de dix ans et le risque d'apparition de résistance augmente avec le temps. Augmenter l'offre de molécules ciblant le récepteur à l'octopamine du varroa permettrait de réduire les phénomènes de perte de sensibilité.

L'absence d'une séquence complète pour le récepteur à l'OA du varroa est un verrou majeur et a empêché l'approche de criblage par docking. De plus, l'absence d'un test *in vitro* utilisable pour le récepteur à l'octopamine a fortement limité le nombre de molécules que nous avons pu tester.

Néanmoins, en s'appuyant sur l'amitraze, l'approche par similarité de structure a pu être appliquée. Parmi les treize molécules testées à partir de ce criblage par similarité, l'une entraîne 15 % de mortalité des varroas, et l'autre 94 % de mortalité des varroas lors d'un dépôt thoracique de 10 µg par abeille. Obtenir deux molécules avec une activité mesurable en testant si peu de molécules est encourageant. Des recherches complémentaires parmi les molécules appartenant aux familles des composés SR5870 et SR3190 pourrait permettre de découvrir des substances actives à de plus faibles concentrations, mais aussi d'établir une relation structure-activité pour ce *lead* afin de l'optimiser. Cela pourrait permettre à terme de trouver des traitements alternatifs aux médicaments contenant de l'amitraze, dans le but de limiter le développement de résistance.

Chapitre 5
Conclusion générale et perspectives

L'acarien *Varroa destructor* est impliqué dans le phénomène de mortalité des abeilles domestiques *Apis mellifera* à travers le monde. De nombreuses pistes sont explorées afin de lutter contre ce parasite, mais l'emploi d'acaricides reste encore à l'heure actuelle la réponse la plus efficace et la plus accessible proposée aux apiculteurs.

Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont eu pour objectif la recherche de nouvelles molécules anti-varroas. Nos travaux se sont concentrés sur la recherche d'inhibiteurs de l'acétylcholinestérase, et de ligands du récepteur à l'octopamine du varroa. Le choix de ces cibles nous a permis d'une part d'exploiter les précédents travaux réalisés par l'équipe et, d'autre part, d'explorer la chimiothèque disponible au CERMN.

Concernant l'acétylcholinestérase, enzyme essentielle au bon fonctionnement du système nerveux, nos travaux s'inscrivent dans la continuité des recherches précédemment menées par l'équipe. Aucun traitement dirigé sur cette cible ne dispose d'une AMM en France. Trouver une molécule sélective de l'AChE du varroa répondrait donc à la nécessité de diversifier les modes d'actions des médicaments varroacides. Notre démarche s'est articulée autour de deux approches principales : la réorientation d'acaricides connus, et un criblage de la chimiothèque basé sur la structure 3D de la cible.

Les résultats sur la réorientation de carbamates continuent de mettre en avant les propriétés intéressantes du pirimicarbe. La construction du modèle de l'AChE du varroa a permis de réaliser un criblage de la chimiothèque du CERMN. Grâce à la maitrise du protocole de test *in vitro* d'inhibition de l'AChE sur l'abeille et sur le varroa, un grand nombre de molécules ont pu être évaluées pour leur activité sur la cible. Le protocole en cagette développé au cours de la thèse grâce à la collaboration avec Vétopharma, a ensuite permis de vérifier simultanément l'efficacité varroacide des molécules candidates et leur innocuité à court terme chez l'ouvrière. Du criblage de la chimiothèque dans le modèle de l'AChE du varroa sont ressortis les composés SR2091 et SR2093. Ces deux molécules sont efficaces *in vivo* sur le varroa, lors d'un dépôt

thoracique d'une dose de 10 µg par abeille, sans qu'aucune mortalité chez l'abeille n'ai été observée.
L'étude sur le pirimicarbe a également été l'occasion de mettre en œuvre une expérimentation avec un dispositif innovant, développé par Michel Sokolowski, permettant un suivi précis au cours du temps des conséquences de l'exposition par voie orale.

Concernant les récepteurs à l'octopamine, appartenant à la famille des RCPGs, l'amitraze est déjà connue comme ayant un mode d'action probable lié à l'activation de ces récepteurs. L'intérêt est donc soit de diversifier l'offre, dans les pays où des traitements à base d'amitraze sont autorisés ; soit de proposer un premier traitement ciblant les récepteurs à l'octopamine pour les pays où aucun médicament contenant de l'amitraze n'a d'AMM. La diversification des molécules, même si leur mode d'action est identique, peut être un facteur primordial dans le retard de l'apparition des résistances.
Les informations disponibles sur les récepteurs à l'octopamine du varroa n'ont pas été suffisantes pour construire un modèle 3D de sa structure exploitable par criblage. La démarche s'est donc principalement articulée sur une approche de similarité de structure avec des ligands connus. L'absence d'un test *in vitro* a été une contrainte supplémentaire, et notamment un facteur limitant le nombre de composés évalués. Les tests *in vivo* ont cependant fait ressortir le DMPF, un produit de dégradation de l'amitraze, et le composé SR3190 de la chimiothèque du CERMN, issus de la recherche par similarité de structure avec le DMPF. La molécule est efficace *in vivo* sur le varroa, lors d'un dépôt thoracique d'une dose de 10 µg par abeille, sans aucune mortalité chez l'abeille.
L'étude du modèle du varroa a révélé deux différences majeures avec le récepteur à l'octopamine de l'abeille, permettant de poser les hypothèses sur la sélectivité des molécules.

L'ensemble de nos résultats font donc ressortir le carbamate pirimicarbe, le dérivé DMPF ainsi que des molécules entièrement nouvelles : SR2091, SR2093, SR3190, toutes trois issues de la chimiothèque du CERMN. Le DMPF montre une efficacité équivalente à l'amitraze, et l'évaluation de ses effets sur l'abeille seraient particulièrement intéressante. Le pirimicarbe présente également une bonne efficacité, et sa structure peut servir de point de départ pour le développement d'un nouveau médicament. Les trois molécules de la chimiothèque sont prometteuses, et leurs structures doivent servir de point de départ, ou *lead*, afin de viser une diversification des médicaments anti-varroas.

Utilisation de la démarche de *drug-design* dans le contexte d'un médicament anti-varroa

L'ancrage dans un laboratoire de chimie-thérapeutique a été l'occasion d'aborder la problématique selon une démarche de *drug-design*, habituellement suivie en santé humaine.

Les méthodologies *in silico* sont un outil prometteur pour la conception de nouveaux traitements anti-varroas, mais également être généralisée aux études sur les produits phytosanitaires. La démarche a par exemple été amorcée par une collaboration impliquant entre autre l'équipe de l'INRA d'Avignon pour l'étude des canaux sodiums $AmNa_v1$ [339].

Dans la démarche de conception et le développement d'un médicament, les méthodes de criblage virtuel sont communément utilisées pour faciliter la découverte de nouvelles molécules à visée thérapeutique.

La modélisation par homologie de séquence fournit un outil alternatif aux méthodes coûteuses de détermination expérimentale des structures 3D des cibles. Cavasotto et Phatak rappellent cependant que le succès de la démarche dépend du choix du *template* et de la précision de l'alignements des séquences [469]. Dans le cas du varroa, nous avons été confrontés à un manque de similarité entre le *template* et l'AChE du parasite, et, concernant le récepteur à l'OA, au manque d'une séquence complète et fiable de la cible.

Concernant l'acétylcholinestérase, déterminer la structure expérimentale par cristallographie serait idéale pour effectuer un criblage plus correct de la chimiothèque du laboratoire. L'identité de séquences de seulement 21 % entre la séquence du varroa et celle de la drosophile, utilisée comme *template*, s'accompagne d'imprécisions lors de la construction du modèle de l'AChE du varroa. Un approfondissement des connaissances sur le parasite pourrait permettre d'utiliser les approches de modélisation de façon plus optimale.

Concernant les récepteurs à l'octopamine, compléter la séquence du récepteur du varroa est une priorité. Nos travaux ont en effet été limités par l'absence de séquence publiée pour le varroa de ce récepteur. En partant du génome brut du varroa, il a été possible de générer un modèle 3D partiel du récepteur, dont la construction a fourni des hypothèses sur les interactions avec le DMPF. Cependant, la séquence complète permettrait de construire un modèle 3D du récepteur de meilleure qualité, utilisable pour des étapes de docking.

La connaissance des structures 3D des récepteurs du varroa et de l'abeille permettrait de valider les hypothèses de différence entre les sites actifs de récepteurs entre les deux espèces. Cela permettrait également la mise en œuvre d'une démarche de conception *de novo* de ligands, construits dans le but d'optimiser les interactions avec les cibles du varroa, tout en les minimisant chez l'abeille.

Si les approches numériques permettent une présélection, seuls les tests d'activité *in vitro* et d'efficacité *in vivo* peuvent confirmer l'intérêts des molécules candidates.

Dans le cadre de la recherche sur le varroa, il apparait essentiel d'avoir en place des protocoles de tests *in vitro*. La disponibilité en varroas est limitée à une période restreinte de l'année, allant globalement d'avril à octobre, et est soumise aux aléas climatiques. Les tests *in vitro* sont réalisés avec du matériel biologique congelé, et s'affranchissent donc de la contrainte saisonnière. Ainsi, l'absence d'un protocole de test *in vitro* a été une limite importante à nos travaux les RCPGs, et sa mise au point sera une étape essentielle pour optimiser les études sur ces récepteurs.

Les tests *in vivo* restent l'étape finale de validation. Les tests en cagettes sont apparus au cours de nos travaux particulièrement intéressant pour évaluer simultanément l'efficacité contre le varroa et l'innocuité sur l'abeille des molécules. Sans que les raisons n'aient été décelées, le protocole montre un taux d'échec (mortalité à 24 heures dans les témoins supérieure à 30 %) supérieur à 50 %. Plusieurs hypothèses ont été discutées, telles que le climat lors de la récolte des varroas au rucher, le délai d'extraction des parasites du sucre glace, le matériau utilisé pour les cagettes et la température d'incubation des expériences. Aucune de ces hypothèses n'a pu expliquer les variations de survie des varroas témoins observées d'un jour à l'autre. Nous avons finalement lié les mortalités des témoins au phénomène de chute naturelle des varroas dans une colonie, et seule la répétition des expériences nous a permis de répondre à la problématique. Les travaux engagés dans la mise au point d'un élevage de varroas permettraient une meilleure standardisation du protocole, mais certains verrous scientifiques (contrôle de la reproduction notamment) bloquent cette possibilité. La mise au point d'un test par dépôt direct sur le varroa a été envisagé mais n'a pas abouti. La piste serait cependant intéressante dans le but de tester l'efficacité d'une molécule sur un laps de temps très court (quelques minutes après le dépôt par exemple). Enfin l'utilisation de tests permettant de mesurer les effets sublétaux sur les abeilles devrait être pris en compte dans le cadre de développement de molécules. Dans ce cadre, l'utilisation des boîtes expérimentales, développées par Michel Sokolowski, permettant un

suivit précis au cours du temps des conséquences de l'exposition par voie orale, est une approche innovante.

Intégration de la recherche de nouveaux varroacides dans les perspectives de luttes sur le long terme.

La nécessité des traitements anti-varroas semble à l'heure actuelle maintenue par l'absence d'abeilles supportant le parasite, ainsi que par les contraintes de productions du secteur apicole. Dans ce contexte, la diversité des molécules disponibles contre le varroa est également un facteur de réussite de la lutte. Que ce soit par la diversité des cibles biologiques, et la diversité des molécules pour une même cible, nos travaux se sont inscrits dans une lutte pro-active contre ce parasite. Continuer à exploiter la chimiothèque du CERMN, dont le contenu augmente d'années en années, est une réelle opportunité de découvrir par sérendipité de nouvelles molécules efficaces. La démarche devrait ensuite être étendue à d'autres cibles.

Si trouver une molécule active est le premier point de la recherche contre le varroa, plusieurs éléments sont à prendre en compte avant de proposer une molécule candidate comme substance active d'un nouveau médicament. L'innocuité pour les trois castes des abeilles, quelques soit leurs stades de développement, n'est atteinte pour aucun traitement actuellement utilisé. Toutes les substances actives présentent divers effets nocifs sur la santé des individus peuplant la colonie. Nous retrouvons la notion de balance entre le bénéfice et le risque associée à tout traitements. Il est nécessaire de limiter le risque pour l'abeille, déjà affaiblie par l'exposition continue à une multitude de xénobiotiques et d'agents pathogènes.
L'accumulation de molécules acaricides dans les cires n'est pas à exclure, et peut nuire non seulement à la qualité sanitaire des produits mais aussi indirectement à l'image que l'on se fait de ces médicaments. La proposition de nouvelles molécules acaricides ne peut se faire que dans une optique compatible avec la sécurité alimentaire des produits de la ruche. L'exposition chronique des consommateurs aux résidus de certains produits phytopharmaceutiques et médicaments vétérinaires, via la consommation de miel, et l'exposition aux cires contaminées est en un facteur de risque à prendre en compte. Les caractéristiques de lipophilie, de solubilité et de rémanence dans les matrices de la ruche sont alors des paramètres à considérer lors de la conception d'un nouveau médicament à usage apicole. La recherche doit également s'assurer de la maîtrise du risque pour l'apiculteur, en prioritisant la sélectivité des molécules, et en

favorisant le développement de forme galénique pour limiter l'exposition lors des manipulations au rucher.

Enfin, la découverte de nouveaux traitements varroacides doit s'insérer dans une démarche globale de lutte contre ce parasite. Une gestion organisée des pratiques de traitements apparaît en effet essentielle, d'une part pour limiter la ré-infestation des colonies traitées, et d'autre part, pour prévenir au mieux l'apparition et la propagation des résistances. La décision d'utiliser des acaricides devrait de plus dépendre du taux d'infestation de la colonie, avec la prise en compte de la balance entre le coût et le bénéfice liée à l'usage de médicaments. Le suivi des taux d'infestations relevés pourrait également permettre d'extraire, selon les régions, la pression en varroas tolérée par les colonies. Cette information assurerait un traitement plus raisonné des colonies, à l'inverse des traitements systématiques, annuels ou pluriannuels, sans prise en compte de l'état sanitaire réel des colonies. La définition des seuils d'interventions, adaptés à la saison et aux zones géographique, reste également à améliorer.

La review de Plettner *et al.*, rappelle que le développement des résistances aux acaricides semble inévitable, qu'ils soient de synthèse, d'origine naturelle ou qu'il s'agisse d'acides organiques. La conception de nouveaux varroacides doit donc se faire en parallèle de la recherche de méthodes alternatives. Deux pistes sont particulièrement mises en avant par les auteurs : les programmes de sélection des abeilles résistantes, et les recherches portant sur les sémiochimiques (substances phéromonales et les substances allélochimiques) dans le but d'interférer dans les interactions chimiques entre le varroa et l'abeille.

A. ANNEXES

Sommaire

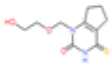
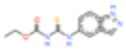
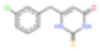
A.1	**Structures des molécules issues du criblage de la chimiothèque du CERMN**	**p.154**
A.2	**Structures des molécules de la famille du composé SR2091**	**p.158**
A.3	**Alignements des trois séquences issues du génome brut du varroa – pour la recherche de récepteurs à l'octopamine – avec la séquence du récepteur β2-adrénergique de l'humain**	**p.159**
A.4	**Structures des molécules testées *in vivo* pour leur similarité de structures avec le DMPF et l'octopamine**	**p.161**
A.5	**Questionnaire de l'enquête sur les pratiques de traitements anti-varroa dans le Calvados**	**p.162**

A.1 Structures des molécules issues du criblage de la chimiothèque du CERMN

Sont indiqués les pourcentages d'inhibition de l'AChE du varroa et de l'abeille (à 10^{-4} M) ainsi les valeurs de GoldScores et le rapport entre le GoldScore et le poids moléculaire de chaque molécule

Référence	Structure	Goldscore	GS/MW	Varroa	Abeille
MR15541		68,29	0,306	5%	9%
SR1285		67,76	0,271	2%	2%
SR1914		66,77	0,278	2%	0%
SR1995		76,94	0,274	4%	2%
SR2018		76,80	0,288	4%	7%
SR2075		73,37	0,268	4%	6%
SR2080		72,93	0,278	3%	7%
SR2082		79,24	0,291	4%	6%
SR2084		76,23	0,273	5%	2%
SR2090		73,37	0,277	21%	5%
SR2106		77,06	0,279	8%	9%
SR2112		71,92	0,276	22%	25%
SR2114		71,67	0,279	29%	18%
SR2199		71,79	0,309	5%	7%

Référence	Structure	Goldscore	GS/MW	Varroa	Abeille
SR2602		71,06	0,309	4%	5%
SR2655		71,16	0,304	3%	3%
SR2658		77,38	0,278	4%	8%
SR2739		70,72	0,269	4%	9%
SR2841		68,85	0,282	4%	9%
SR2908		68,30	0,267	2%	2%
SR2948		69,82	0,301	4%	5%
SR3026		67,47	0,263	2%	8%
SR3363		75,14	0,303	4%	7%
SR5608		70,97	0,278	2%	5%
MR25869		68,29	0,274	2%	0%
MR16242		72,82	0,284	1%	2%
SR3690		69,28	0,264	-	-
SR5562		66,76	0,262	-	-

Référence	Structure	Goldscore	GS/MW	Varroa	Abeille
MR16243		68,93	0,285	2%	5%
SR6446		75,73	0,287	0%	1%
SR6622		68,20	0,268	0%	2%
SR7016		68,07	0,269	3%	3%
SR7257		68,93	0,326	0%	0%
MR29897		72,22	0,279	1%	5%
SR2083		73,11	0,263	4%	7%
SR2089		77,65	0,259	2%	8%
SR2738		75,62	0,261	7%	10%
SR4760		67,22	0,261	3%	7%
SR5562		66,76	0,262	-	-
MR15543		68,87	0,311	0%	2%
SR6049		74,01	0,298	0%	1%
SR2653		78,53	0,297	5%	0%

Référence	Structure	Goldscore	GS/MW	Varroa	Abeille
SR2022		81,02	0,289	0%	8%
SR2078		72,62	0,282	0%	2%
SR2113		74,42	0,270	10%	13%
SR1976		67,00	0,270	0%	6%
SR2019		80,00	0,266	0%	5%
SR2091		73,44	0,265	59%	21%
MR6648		76,65	0,285	2%	0%
SR2110		73,32	0,286	-	-
SR2111		74,26	0,301	-	-
SR2962		68,9	0,393	-	-
SR7114		80,89	0,304	-	-

A.2 Structures des molécules de la famille du composé SR2091

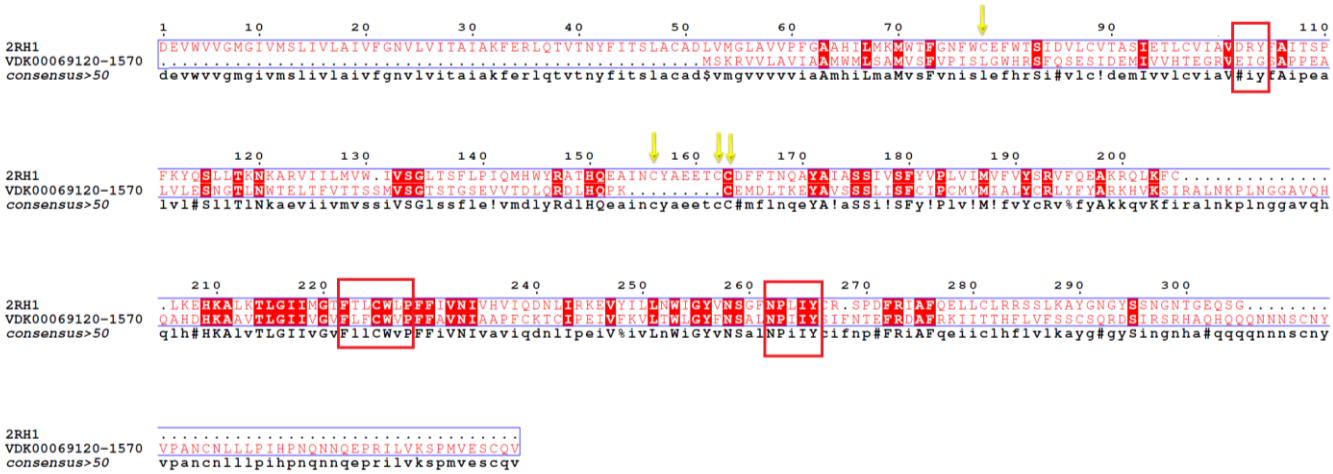
Référence	Structure	Varroa	Abeille
MR19199		5%	0%
SR1975		5%	0%
SR1982		4%	0%
SR1984		3%	0%
SR1986		4%	0%
SR1989		1%	0%
SR1990		3%	4%
SR1993		12%	0%
SR2020		20%	0%
SR2021		5%	0%
SR2083		3%	0%
SR2085		13%	0%
SR2086		19%	1%
SR2088		5%	0%

Référence	Structure	Varroa	Abeille
SR2089		4%	0%
SR2092		3%	0%
SR2093		53%	4%
SR2097		5%	0%
SR2099		6%	0%
SR2100		4%	0%
SR2102		5%	0%
SR2109		0%	5%
MR17862		2%	0%
MR17861		3%	0%
MR19924		2%	0%

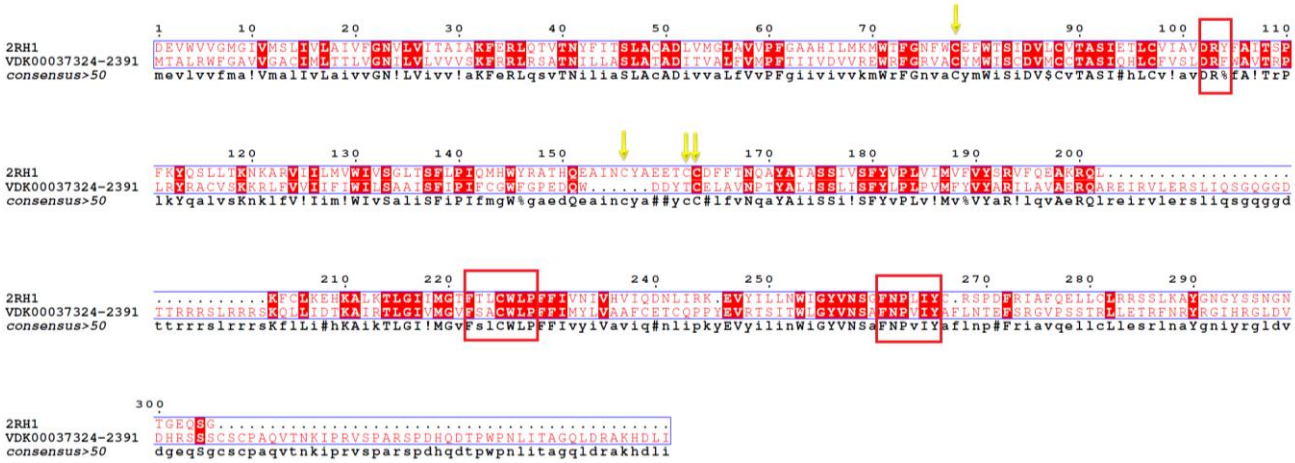
A.3 Alignements des trois séquences issues du génome brut du varroa – pour la recherche de récepteurs à l'octopamine – avec la séquence du récepteur β2-adrénergique de l'humain

Les flèches jaunes indiquent les ponts disulfures entre les cystéines dans la structures du 2RH1
Les encadrés rouges indiquent la position des trois motifs conservés (D(E)RY, FxxCWxP et NPxxY

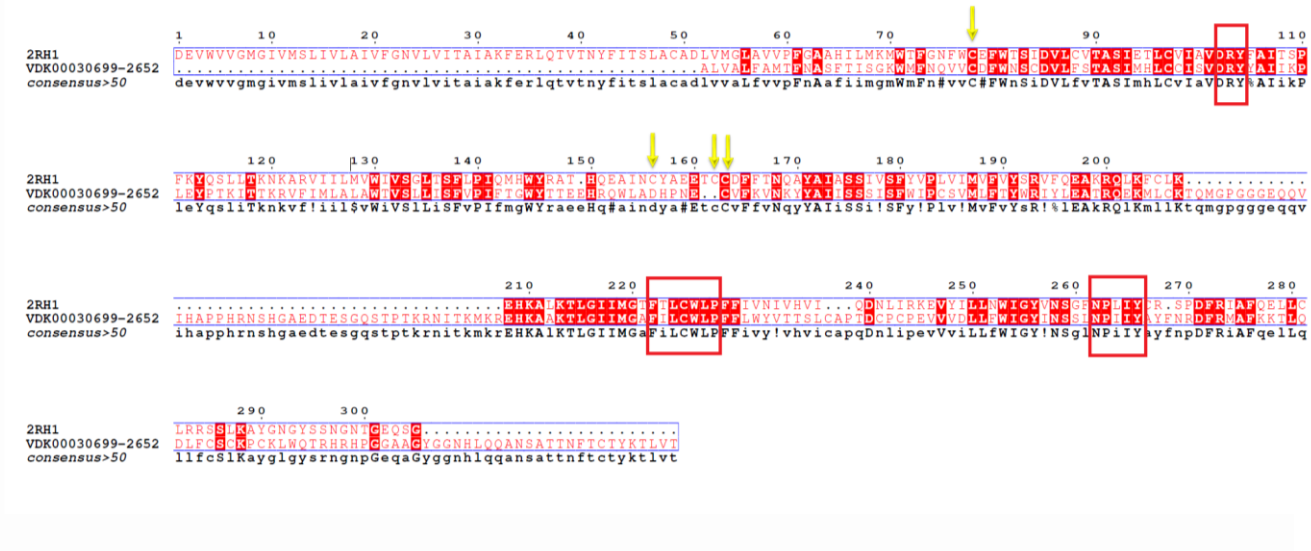
gi|283696208|gb|ADDG01068650.1| Varroa destructor strain Korean VDK00069120-1570



gi|283727714|gb|ADDG01037145.1| Varroa destructor strain Korean VDK00037324-2391



gi|283734305|gb|ADDG01030554.1| Varroa destructor strain Korean VDK00030699-2652



A.4 Structures des molécules testées *in vivo* pour leur similarité de structures avec le DMPF et l'octopamine

DMPF			
Référence	Structure	Varroa	Abeille
MR25064		7	0
MR22330		4	0
MR20256		5	0
MR20222		2	0
SR6577		5	0
SR5870		0	0
SR5874		10	0
SR1792		5	0
SR3190		10	0
MR25006		5	0
SR7392		6	0

Octopamine			
Référence	Structure	Varroa	Abeille
HM706		3	0
SR1781		6	0

A.5 Questionnaire de l'enquête sur les pratiques de traitements anti-varroas dans le Calvados

Enquête sur les pratiques de traitements

anti-varroas dans le Calvados

Chère apicultrice, Cher apiculteur,

Nous avons le plaisir de vous faire parvenir cette enquête sur les pratiques de dépistage et de lutte contre le parasite *Varroa destructor*.

L'enquête est mise en place grâce au réseau d'apiculteurs de l'Abeille Normande du Calvados. Elle est menée par l'équipe de laboratoire de recherche du CERMN (Université de Caen), dans le cadre de travaux sur de nouveaux traitements anti-varroas.

Cette enquête donnera lieu à un compte rendu qui sera mis à disposition des apiculteurs.

CALENDRIER DE L'ENQUETE : le questionnaire est à remplir et à nous retourner avant le 20 janvier 2017 à l'adresse suivante :

Clémence Riva
Centre d'Etudes et de Recherche sur le Médicament de Normandie • CERMN
Boulevard Becquerel
14032 Caen Cedex, France

Toutes les informations personnelles reçues dans cette enquête resteront confidentielles.

Prénom _____

Nom _____

Adresse _____

Ville _____

Code postal _____

Téléphone _____

Courriel _____

NB : Si vous souhaitez rester anonyme, vous avez la possibilité de renvoyer le questionnaire sans remplir l'encart ci dessus.

1

1ère partie – Vos pratiques de dépistage

1. Quel(s) est le code postal de votre rucher :

- O Rucher 1 : _____
- O Rucher 2 : _____
- O Rucher 3 : _____
- O Rucher 4 : _____

2. Combien de colonies possédez-vous en hivernage (hiver 2016) :

- O Moins de 5
- O De 5 à 10 ruches
- O Plus de 120 ruches
- O De 11 à 50 ruches
- O De 50 ruches à 120 ruches

3. Avez-vous évalué l'infestation de vos colonies entre janvier et décembre 2016 :

O Oui O Non

Si oui, pouvez-vous nous préciser par quelle méthode ?

O Comptage des varroas sur plateau	O Désoperculation de couvain mâle
O Désoperculation de couvain d'ouvrières	O Roulement ou lavage d'abeilles au sucre glace
O Lavage d'abeilles à l'alcool	O Lavage d'abeilles au détergent
O Varroa EasyCheck ®	O Autres (précisez) :

Quels sont les seuils d'alerte à partir desquels vous estimez vos colonies en sur-infestation et en danger ?

_____

_____

4. Avez-vous observé des abeilles aux ailes déformées :

- O Je ne sais pas
- O En faible quantité
- O Pas du tout
- O En grande quantité

Si oui, pouvez-vous nous préciser à quelle période l'observation a été faite :

_____

_____

2ème partie – Vos pratiques de lutte

5. Avez-vous mis en œuvre un moyen de lutte contre varroa entre avril 2015 et avril 2016 ?

O Oui O Non
(vous pouvez dans ce cas passer directement à la question 8)

6. Si vous avez répondu "oui" à la question 3 et/ou 5, merci de compléter le plus précisément possible le tableau page suivante.

Pour cela cocher les cases correspondant à la quinzaine du mois à laquelle vous avez évalué l'infestation et/ou réalisé un traitement contre varroa sur vos colonies de production pendant la période d'août 2015 à décembre 2016

Le cas échéant merci de préciser les "autres traitements" utilisés :

Autre méthode (1) : _____

_____

Autre méthode (2) : _____

_____

Dans le cas le l'utilisation, *hors traitement disposant d'une Autorisation de mise sur le marché (AMM)*, des molécules suivantes :

- Thymol
- Amitraze
- Tau-fluvalinate
- Acide formique
- Acide oxalique

merci de décrire si possible les méthodes employées (concentration en substance, mode de diffusion dans la ruche, etc.) :

_____

_____

_____

_____

_____

_____

Méthode / Traitement(s) :		Mettre une croix dans la case correspondant à la quinzaine du mois lors de la pose du traitement. Puis une croix pour son retrait. Mettre simplement une croix pour signaler les testes d'évaluations																													
		2015												2016																	
		Juillet		Août		Septembre		Octobre		Novembre		Décembre		Janvier		Février		Mars		Avril		Mai		Juin		Juillet		Août		Septembre		Octobre		Novembre		Décembre	
Évaluation du niveau d'infestation en varroas																																					
Retrait de couvain de mâles																																					
Hyperthermie (traitement du couvain par la chaleur)																																					
Retrait total de couvain																																					
Encagement de reine																																					
Acide formique	MAQS®																																				
	Longue durée																																				
	« Flash »																																				
Acide lactique																																					
Api-bioxal®	Par instillation (« dégouttement »)																																				
	Par sublimation (évaporation)																																				
Acide oxalique	Par instillation (« dégouttement »)																																				
	Par sublimation (évaporation)																																				
Beevital Hiveclean®																																					
Thymol	Apiguard®, ApilifeVar® ou Thymovar®																																				
	Thymol																																				
Apistan® (Tau-fluvalinate)																																					
Tau-fluvalinate (préparation extemporanée)																																					
Amitraze	Apivar®																																				
	Apitraz®																																				
	Préparation extemporanée)																																				
	Fumigation/aerosol																																				
Autre méthode (1)																																					
Autre méthode (2)																																					

7. Dans le cas de l'utilisation du traitement par lanières Apivar® merci d'apporter les précisions suivantes :

7.1. Combien de semaines avez-vous laissé les lanières dans vos colonies ?

_____ semaines

Si vous les connaissez, vous pouvez également indiquer les dates précises de mise en place et de retrait des lanières :

Mise en place le : _____
Retrait le : _____

7.2 Comment évalueriez-vous l'efficacité du traitement ?

- O Je ne sais pas
- O Pas du tout efficace
- O Moyennement efficace
- O Efficace
- O Très efficace

7.3 Questions complémentaires

Connaissez-vous la position des lanières par rapport à la grappe d'abeilles lors de leur mise en place ?

- O Au centre du couvain
- O En bordure de couvain
- O Autre (précisez) :
- O Je ne sais pas

Utilisez-vous un dispositif pour descendre les lanières au plus prés du flux d'abeilles (crochet d'ardoise, anneaux de fil inox etc) ?

- O Crochet d'ardoise
- O Anneaux de fil inox
- O Autre (précisez) :
- O Non

Pratiquez-vous un déplacement des lanières au plus près de la grappe après leur mise en place ?

- O Oui
  Indiquez la date :
- O Non

Pratiquez-vous un grattage des lanières (avec le lève cadre par exemple) ?

- O Oui
- O Non

Pouvez-vous nous préciser ce que deviennent vos lanières usagées ?

- O Jetées dans la poubelle
- O Retour au local de l'ANC
- O Autre (précisez) :

8. Si vous avez des remarques, n'hésitez pas à nous en faire part

Contact : Clémence Riva

Centre d'Etudes et de Recherche sur le Médicament de Normandie · CERMN
Boulevard Becquerel
14032 Caen Cedex, France

clemence.riva@unicaen.fr

+33 (0)2 31 56 68 24

Bibliographie

1. Gallai, N., Salles, J.-M., Settele, J. & Vaissière, B. E. Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecol. Econ.* **68,** 810–821 (2009).
2. Williams, I. H. Aspects of bee diversity and crop pollination in the European Union. (1996).
3. Bohn, G. W. & Davis, G. N. Insect pollination is necessary for the production of muskmelons (Cucumis melo v. reticulatus). *J. Apic. Res.* **3,** 61–63 (1964).
4. Albregts, E. E. & Howard, C. M. Effect of fertilizer rate on number of malformed strawberry fruit. in *Proc Fla State Hort Soc* **95,** 323–324 (1982).
5. FranceAgriMer. *Audit économique de la fi lière apicole française*. (FranceAgriMer).
6. Gerster, F. *Plan de développement durable de l'apiculture*. (2013).
7. *ANSES: Mortalités, Effondrements et Affaiblissements Des Colonies D'abeilles. 2008*.
8. Cane, J. H. in *Encycl. Entomol.* (ed. Capinera, J. L.) 419–434 (Springer Netherlands, 2008).
9. Michener, C. D. *Comparative external morphology, phylogeny, and a classification of the bees (Hymenoptera).* **v. 82, article 6,** (Bulletin of the American Museum of Natural History, 1944).
10. Brady, S. G., Litman, J. R. & Danforth, B. N. Rooting phylogenies using gene duplications: an empirical example from the bees (Apoidea). *Mol. Phylogenet. Evol.* **60,** 295–304 (2011).
11. Danforth, B. N., Sipes, S., Fang, J. & Brady, S. G. The history of early bee diversification based on five genes plus morphology. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103,** 15118–15123 (2006).
12. Cameron, S. A. Multiple origins of advanced eusociality in bees inferred from mitochondrial DNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90,** 8687–8691 (1993).
13. Han, F., Wallberg, A. & Webster, M. T. From where did the Western honeybee (Apis mellifera) originate? *Ecol. Evol.* **2,** 1949–1957 (2012).
14. Meixner, M. D., Pinto, M. A., Bouga, M., Kryger, P., Ivanova, E. & Fuchs, S. Standard methods for characterising subspecies and ecotypes of Apis mellifera. *J. Apic. Res.* **52,** 1–28 (2013).
15. Rùa, D. la, Galian, J., Serrano, J. & F.A. Moritz, R. Genetic structure of Balearic honeybee populations based on microsatellite polymorphism. *Genet Sel Evol* **35,** 339–350 (2003).
16. Strange, J. P., Garnery, L. & Sheppard, W. S. Morphological and molecular characterization of the Landes honey bee (Apis mellifera L.) ecotype for genetic conservation. *J. Insect Conserv.* **12,** 527–537 (2008).
17. Norton, R. A., Bonamo, P. M., Grierson, J. D. & Shear, W. A. Oribatid mite fossils from a terrestrial Devonian deposit near Gilboa, New York. *J. Paleontol.* **62,** 259–269 (1988).
18. Farish, D. J. & Axtell, R. C. Phoresy redefined and examined in Macrocheles muscaedomesticae (Acarina: Macrochelidae). *Acarologia* (1971).

19. Robin, N., Béthoux, O., Sidorchuk, E., Cui, Y., Li, Y., Germain, D., King, A., Berenguer, F. & Ren, D. A Carboniferous mite on an insect reveals the antiquity of an inconspicuous interaction. *Curr. Biol.* **26,** 1376–1382 (2016).
20. Beaulieu, F. in *Anim. Biodivers. Outl. High.-Level Classif. Surv. Taxon. Richness* 123–128 (Zhang Z. -Q, 2011).
21. De Guzman, L. I. & Rinderer, T. E. Identification and comparison of Varroa species infesting honey bees. *Apidologie* **30,** 85–96 (1999).
22. Anderson, D. L. & Trueman, J. W. H. Varroa jacobsoni (Acari: Varroidae) is more than one species. *Exp. Appl. Acarol.* **24,** 165–189 (2000).
23. Solignac, M., Cornuet, J.-M., Vautrin, D., Le Conte, Y., Anderson, D., Evans, J., Cros-Arteil, S. & Navajas, M. The invasive Korea and Japan types of Varroa destructor, ectoparasitic mites of the Western honeybee (Apis mellifera), are two partly isolated clones. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **272,** 411–419 (2005).
24. Maurizio, A. & Hodges, F. E. D. The influence of pollen feeding and brood rearing on the length of life and physiological condition of the honeybee preliminary report. *Bee World* **31,** 9–12 (1950).
25. Guerriat, H. *Être Performant en Apiculture*. (Rucher du tilleul Editions, 1996).
26. Louveaux, J., Albisetti, M., Delangue, M. & Theurkauff, M. Les modalités de l'adaptation des abeilles (Apis mellifica L.) au milieu naturel. *Ann Abeille* **9,** 323–350 (1966).
27. Fries, I., Aarhus, A., Hansen, H. & Korpela, S. Development of early infestations by the miteVarroa jacobsoni in honey-bee (Apis mellifera) colonies in cold climates. *Exp. Appl. Acarol.* **11,** 205–214 (1991).
28. Lea, W. Managing Varroa. (2015).
29. Martin, S. J. Varroa destructor reproduction during the winter in Apis mellifera colonies in UK. *Exp. Appl. Acarol.* **25,** 321–325 (2001).
30. Martin, S. J. Ontogenesis of the mite Varroa jacobsoni Oud. in worker brood of the honeybee Apis mellifera L. under natural conditions. *Exp. Appl. Acarol.* **18,** 87–100 (1994).
31. Fries, I., Camazine, S. & Sneyd, J. Population dynamics of Varroa jacobsoni: a model and a review. *Bee World* **75,** 5–28 (1994).
32. Wilkinson, D. & Smith, G. C. A model of the mite parasite, Varroa destructor, on honeybees (Apis mellifera) to investigate parameters important to mite population growth. *Ecol. Model.* **148,** 263–275 (2002).
33. Calis, J. N. M., Fries, I. & Ryrie, S. C. Population modelling of Varroa jacobsoni Oud. *Apidologie* 111–124 (1999).
34. Woyke, J. Multiple mating of the honeybee queen (Apis mellifica L.) in one nuptial flight. *Bull Acad Pol. Sci Cl* **3,** 175–180 (1955).
35. Zmarlicki, C. & Morse, R. A. Drone congregation areas. *J. Apic. Res.* **2,** 64–66 (1963).
36. Brockmann, A., Dietz, D., Spaethe, J. & Tautz, J. Beyond 9-ODA: sex pheromone communication in the European honey bee Apis mellifera L. *J. Chem. Ecol.* **32,** 657–667 (2006).
37. Gary, N. E. Chemical mating attractants in the queen honey bee. *Science* **136,** 773–774 (1962).
38. Tarpy, D. R. Genetic diversity within honeybee colonies prevents severe infections and promotes colony growth. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **270,** 99–103 (2003).
39. Heidinger, I. M. M., Meixner, M. D., Berg, S. & Büchler, R. Observation of the mating behavior of honey bee (Apis mellifera L.) queens using radio-frequency identification (RFID): factors influencing the duration and frequency of nuptial flights. *Insects* **5,** 513–527 (2014).

40. Rembold, H., Kremer, J.-P., Ulrich, G. M. & others. Characterization of postembryonic developmental stages of the female castes of the honey bee, Apis mellifera L. *Apidologie* **11,** 29–38 (1980).
41. Moritz, R. F. A. & Jordan, M. Selection of resistance againstVarroa jacobsoni across caste and sex in the honeybee (Apis mellifera L., Hymenoptera: Apidae). *Exp. Appl. Acarol.* **16,** 345–353 (1992).
42. De Ruijter, A. Reproduction of Varroa jacobsoni during successive brood cycles of the honeybee. *Apidologie* **18,** 321–326 (1987).
43. Nazzi, F. & Le Conte, Y. Ecology of Varroa destructor, the major ectoparasite of the western honey bee, Apis mellifera. *Annu. Rev. Entomol.* **61,** 417–432 (2016).
44. Erban, T., Harant, K., Hubalek, M., Vitamvas, P., Kamler, M., Poltronieri, P., Tyl, J., Markovic, M. & Titera, D. In-depth proteomic analysis of Varroa destructor: detection of DWV-complex, ABPV, VdMLV and honeybee proteins in the mite. *Sci. Rep.* **5,** 13907 (2015).
45. Piou, V., Tabart, J., Urrutia, V., Hemptinne, J.-L. & Vétillard, A. Impact of the Phoretic Phase on Reproduction and Damage Caused by Varroa destructor (Anderson and Trueman) to Its Host, the European Honey Bee (Apis mellifera L.). *PloS One* **11,** e0153482 (2016).
46. Boot, W. J., Calis, J. N. M. & Beetsma, J. Differential periods ofVarroa mite invasion into worker and drone cells of honey bees. *Exp. Appl. Acarol.* **16,** 295–301 (1992).
47. Ifantidis, M. D. Some aspects of the process of Varroa jacobsoni mite entrance into honey bee (Apis mellifera) brood cells. *Apidologie* **19,** 387–396 (1988).
48. Fries, I. & Rosenkranz, P. Number of reproductive cycles of Varroa jacobsoni in honey-bee (Apis mellifera) colonies. *Exp. Appl. Acarol.* **20,** 103–112 (1996).
49. Martin, S. J. & Kemp, D. Average number of reproductive cycles performed by Varroa jacobsoni in honey bee (Apis mellifera) colonies. *J. Apic. Res.* **36,** 113–123 (1997).
50. Fuchs, S. Preference for drone brood cells by Varroa jacobsoni Oud. in colonies of Apis mellifera carnica. *Apidologie* **21,** 193–199 (1990).
51. Schulz, A. *Reproduktion und Populationsentwicklung der parasitischen Milbe Varroa jacobsoni Oud. in Abhängigkeit vom Brutzyklus ihres Wirtes Apis mellifera L*. (na, 1984).
52. Le Conte, Y., Arnold, G., Trouiller, J., Masson, C., Chappe, B. & Ourisson, G. Attraction of the parasitic mite Varroa to the drone larvae of honey bees by simple aliphatic esters. *Science* **245,** 638–639 (1989).
53. Rickli, M., Guerin, P. M. & Diehl, P. A. Palmitic acid released from honeybee worker larvae attracts the parasitic miteVarroa jacobsoni on a servosphere. *Naturwissenschaften* **79,** 320–322 (1992).
54. Calderone, N. W. & Lin, S. Behavioural responses of Varroa destructor (Acari: Varroidae) to extracts of larvae, cocoons and brood food of worker and drone honey bees, Apis mellifera (Hymenoptera: Apidae). *Physiol. Entomol.* **26,** 341–350 (2001).
55. Donzé, G. & Guerin, P. M. Behavioral attributes and parental care of Varroa mites parasitizing honeybee brood. *Behav. Ecol. Sociobiol.* **34,** 305–319 (1994).
56. Martin, S. J. Ontogenesis of the mite Varroa jacobsoni Oud. in drone brood of the honeybee Apis mellifera L. under natural conditions. *Exp. Appl. Acarol.* **19,** 199–210 (1995).
57. Kanbar, G. & Engels, W. Ultrastructure and bacterial infection of wounds in honey bee (Apis mellifera) pupae punctured by Varroa mites. *Parasitol. Res.* **90,** 349–354 (2003).
58. Rosenkranz, P., Aumeier, P. & Ziegelmann, B. Biology and control of Varroa destructor. *J. Invertebr. Pathol.* **103,** S96–S119 (2010).

59. Donze, G., Herrmann, M., Bachofen, B. & Guerin, P. Effect of mating frequency and brood cell infestation rate on the reproductive success of the honeybee parasite Varroa jacobsoni. *Ecol. Entomol.* **21,** 17–26 (1996).
60. Beaurepaire, A. L., Krieger, K. J. & Moritz, R. F. A. Seasonal cycle of inbreeding and recombination of the parasitic mite Varroa destructor in honeybee colonies and its implications for the selection of acaricide resistance. *Infect. Genet. Evol.* **50,** 49–54 (2017).
61. Donzé, G. Adaptations comportementales de l'acarien ectoparasite Varroa jacobsoni durant sa phase de reproduction dans les alveoles operculées de l'abeille mellifère Apis mellifera=. (1995).
62. Martin, S. A population model for the ectoparasitic mite Varroa jacobsoni in honey bee (Apis mellifera) colonies. *Ecol. Model.* **109,** 267–281 (1998).
63. Boecking, O. & Genersch, E. Varroosis–the ongoing crisis in bee keeping. *J. Für Verbraucherschutz Leb.* **3,** 221–228 (2008).
64. Ritter, W., Leclercq, E. & Koch, W. Observation des populations d'abeilles et de Varroa dans les colonies à différents niveaux d'infestation. *Apidologie* **15,** 389–400 (1984).
65. Faucon, J.-P. & Chauzat, M.-P. Varroase et autres maladies des abeilles: Causes majeures de mortalité des colonies en France. *Bull. Acad. Vét. France* **161–N°3,** (2008).
66. van Dooremalen, C., Gerritsen, L., Cornelissen, B., van der Steen, J. M., van Langevelde, F. & Blacquière, T. Winter survival of individual honey bees and honey bee colonies depends on level of Varroa destructor infestation. *PloS One* **7,** e36285 (2012).
67. Nelson, C. M., Ihle, K. E., Fondrk, M. K., Page Jr, R. E. & Amdam, G. V. The gene vitellogenin has multiple coordinating effects on social organization. *PLoS Biol* **5,** e62 (2007).
68. Lehman, H. K., Schulz, D. J., Barron, A. B., Wraight, L., Hardison, C., Whitney, S., Takeuchi, H., Paul, R. K. & Robinson, G. E. Division of labor in the honey bee (Apis mellifera): the role of tyramine β-hydroxylase. *J. Exp. Biol.* **209,** 2774–2784 (2006).
69. Schulz, D. J., Sullivan, J. P. & Robinson, G. E. Juvenile hormone and octopamine in the regulation of division of labor in honey bee colonies. *Horm. Behav.* **42,** 222–231 (2002).
70. Amdam, G. V., Hartfelder, K., Norberg, K., Hagen, A. & Omholt, S. W. Altered physiology in worker honey bees (Hymenoptera: Apidae) infested with the mite Varroa destructor (Acari: Varroidae): a factor in colony loss during overwintering? *J. Econ. Entomol.* **97,** 741–747 (2004).
71. Corona, M., Velarde, R. A., Remolina, S., Moran-Lauter, A., Wang, Y., Hughes, K. A. & Robinson, G. E. Vitellogenin, juvenile hormone, insulin signaling, and queen honey bee longevity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104,** 7128–7133 (2007).
72. Trenczek, T., Zillikens, A. & Engels, W. Developmental patterns of vitellogenin haemolymph titre and rate of synthesis in adult drone honey bees (Apis mellifera). *J. Insect Physiol.* **35,** 475–481 (1989).
73. Amdam, G. V., Norberg, K., Hagen, A. & Omholt, S. W. Social exploitation of vitellogenin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100,** 1799–1802 (2003).
74. Havukainen, H., Münch, D., Baumann, A., Zhong, S., Halskau, O., Krogsgaard, M. & Amdam, G. V. Vitellogenin recognizes cell damage through membrane binding and shields living cells from reactive oxygen species. *J. Biol. Chem.* **288,** 28369–28381 (2013).
75. Seehuus, S.-C., Norberg, K., Gimsa, U., Krekling, T. & Amdam, G. V. Reproductive protein protects functionally sterile honey bee workers from oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103,** 962–967 (2006).
76. Dainat, B., Evans, J. D., Chen, Y. P., Gauthier, L. & Neumann, P. Dead or alive: deformed wing virus and Varroa destructor reduce the life span of winter honeybees. *Appl. Environ. Microbiol.* **78,** 981–987 (2012).

77. Droz, B., Dietemann, V., Gauthier, L. & Charrière, J.-D. L'encagement des reines: une méthode pour traiter contre varroa en été? *Revue Suisse d'Apiculture* 20–28 (2015).
78. Kralj, J., Brockmann, A., Fuchs, S. & Tautz, J. The parasitic mite Varroa destructor affects non-associative learning in honey bee foragers, Apis mellifera L. *J. Comp. Physiol. A* **193,** 363–370 (2007).
79. Bovet, D. Comportement animal,- Développement du comportement. *Encycl. Universalis En Ligne*
80. Marshall, J. On the Sensitivity of the Chemoreceptors on the Antenna and Fore-tarsus of the Honey-Bee, Apis mellifica L. *J. Exp. Biol.* **12,** 17–26 (1935).
81. Kralj, J. & Fuchs, S. Parasitic Varroa destructor mites influence flight duration and homing ability of infested Apis mellifera foragers. *Apidologie* **37,** 577 (2006).
82. Hoffmann, J. A., Reichhart, J.-M. & Hetru, C. Innate immunity in higher insects. *Curr. Opin. Immunol.* **8,** 8–13 (1996).
83. Imler, J. & Bulet, P. in *Mech. Epithel. Def.* **86,** 1–21 (Karger Publishers, 2005).
84. Muta, T. & Iwanaga, S. The role of hemolymph coagulation in innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* **8,** 41–47 (1996).
85. Lackie, A. M. Immune mechanisms in insects. *Parasitol. Today* **4,** 98–105 (1988).
86. Strand, M. R. The insect cellular immune response. *Insect Sci.* **15,** 1–14 (2008).
87. Wilson-Rich, N., Dres, S. T. & Starks, P. T. The ontogeny of immunity: development of innate immune strength in the honey bee (Apis mellifera). *J. Insect Physiol.* **54,** 1392–1399 (2008).
88. Belaid, M. & Doumandji, S. Effet du Varroa destructor sur la morphométrie alaire et sur les composants du système immunitaire de l'abeille ouvrière. *Apis Mellifera Intermissa Leban. Sci. J.* **11,** 84–90 (2010).
89. Salem, M. H., Abir, A. G. & Ramadan, H. Effect of Varroa destructor on different haemocyte Count, total haemolymph protein on larvae, pupae and adults of Apis mellifera drones. *J. Egypt. Soc. Toxicol.* **Vol. 35,** 93–96 (2006).
90. Yang, X. & Cox-Foster, D. L. Impact of an ectoparasite on the immunity and pathology of an invertebrate: evidence for host immunosuppression and viral amplification. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102,** 7470–7475 (2005).
91. Drescher, W. & Schneider, P. Effect of the Varroa mite upon the fat body of worker bees and their tolerance of pesticides. *Afr. Honey Bees Bee Miteseditors Glen R Needham Al* 452–456 (1987).
92. Benoit, J. B., Yoder, J. A., Sammataro, D. & Zettler, L. W. Mycoflora and fungal vector capacity of the parasitic mite Varroa destructor (Mesostigmata: Varroidae) in honey bee (Hymenoptera: Apidae) colonies. *Int. J. Acarol.* **30,** 103–106 (2004).
93. Hubert, J., Erban, T., Kamler, M., Kopecky, J., Nesvorna, M., Hejdankova, S., Titera, D., Tyl, J. & Zurek, L. Bacteria detected in the honeybee parasitic mite Varroa destructor collected from beehive winter debris. *J. Appl. Microbiol.* **119,** 640–654 (2015).
94. Shen, M., Cui, L., Ostiguy, N. & Cox-Foster, D. Intricate transmission routes and interactions between picorna-like viruses (Kashmir bee virus and sacbrood virus) with the honeybee host and the parasitic varroa mite. *J. Gen. Virol.* **86,** 2281–2289 (2005).
95. Hung, A. C. F. PCR detection of Kashmir bee virus in honey bee excreta. *J. Apic. Res.* **39,** 103–106 (2000).
96. Chen, Y., Evans, J. & Feldlaufer, M. Horizontal and vertical transmission of viruses in the honey bee, Apis mellifera. *J. Invertebr. Pathol.* **92,** 152–159 (2006).
97. Shen, M., Yang, X., Cox-Foster, D. & Cui, L. The role of varroa mites in infections of Kashmir bee virus (KBV) and deformed wing virus (DWV) in honey bees. *Virology* **342,** 141–149 (2005).

98. Kevan, P. G., Hannan, M. A., Ostiguy, N. & Guzman-Novoa, E. A summary of the Varroa-virus disease complex in honey bees. (2006).
99. Olivier, V. & Ribière, M. Les virus infectant l'abeille Apis mellifera: le point sur leur classification. *Virologie* **10,** 267–278 (2006).
100. Domingo, E. J. . & Holland, J. J. RNA virus mutations and fitness for survival. *Annu. Rev. Microbiol.* **51,** 151–178 (1997).
101. Eigen, M. Selforganization of matter and the evolution of biological macromolecules. *Naturwissenschaften* **58,** 465–523 (1971).
102. Lhomme, S. Pathogénèse et adaptation du virus de l'hépatite E chez l'immunodéprimé. (2013).
103. Lanzi, G., de Miranda, J. R., Boniotti, M. B., Cameron, C. E., Lavazza, A., Capucci, L., Camazine, S. M. & Rossi, C. Molecular and biological characterization of deformed wing virus of honeybees (Apis mellifera L.). *J. Virol.* **80,** 4998–5009 (2006).
104. Moore, J., Jironkin, A., Chandler, D., Burroughs, N., Evans, D. J. & Ryabov, E. V. Recombinants between Deformed wing virus and Varroa destructor virus-1 may prevail in Varroa destructor-infested honeybee colonies. *J. Gen. Virol.* **92,** 156–161 (2011).
105. Zioni, N., Soroker, V. & Chejanovsky, N. Replication of Varroa destructor virus 1 (VDV-1) and a Varroa destructor virus 1–deformed wing virus recombinant (VDV-1–DWV) in the head of the honey bee. *Virology* **417,** 106–112 (2011).
106. Mordecai, G. J., Wilfert, L., Martin, S. J., Jones, I. M. & Schroeder, D. C. Diversity in a honey bee pathogen: first report of a third master variant of the Deformed Wing Virus quasispecies. *ISME J.* **10,** 1264–1273 (2016).
107. Martin, S. J., Highfield, A. C., Brettell, L., Villalobos, E. M., Budge, G. E., Powell, M., Nikaido, S. & Schroeder, D. C. Global honey bee viral landscape altered by a parasitic mite. *Science* **336,** 1304–1306 (2012).
108. McMahon, D. P., Natsopoulou, M. E., Doublet, V., Fürst, M., Weging, S., Brown, M. F., Gogol-Döring, A. & Paxton, R. J. Elevated virulence of an emerging viral genotype as a driver of honeybee loss. in *Proc R Soc B* **283,** 20160811 (The Royal Society, 2016).
109. Di Prisco, G., Annoscia, D., Margiotta, M., Ferrara, R., Varricchio, P., Zanni, V., Caprio, E., Nazzi, F. & Pennacchio, F. A mutualistic symbiosis between a parasitic mite and a pathogenic virus undermines honey bee immunity and health. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 201523515 (2016).
110. Ribière, M., Ball, B. & Aubert, M. Natural history and geographical distribution of honey bee viruses. *Virol. Honey Bee* 15–84 (2008).
111. Celle, O., Blanchard, P., Olivier, V., Schurr, F., Cougoule, N., Faucon, J.-P. & Ribière, M. Detection of Chronic bee paralysis virus (CBPV) genome and its replicative RNA form in various hosts and possible ways of spread. *Virus Res.* **133,** 280–284 (2008).
112. de Miranda, J. R., Cordoni, G. & Budge, G. The acute bee paralysis virus–Kashmir bee virus–Israeli acute paralysis virus complex. *J. Invertebr. Pathol.* **103,** S30–S47 (2010).
113. Bailey, L., Gibbs, A. J. & Woods, R. D. Two viruses from adult honey bees (Apis mellifera Linnaeus). *Virology* **21,** 390–395 (1963).
114. Ball, B. V. & Allen, M. F. The prevalence of pathogens in honey bee (Apis mellifera) colonies infested with the parasitic mite Varroa jacobsoni. *Ann. Appl. Biol.* **113,** 237–244 (1988).
115. Ball, B. V. Varroa jacobsoni as a virus vector. in *Present Status Varroatosis Eur. Prog. Varroa Mite Control Off. Off. Publ. Eur. Communities Luxemb.* 241–244 (1989).
116. Bailey, L., Carpenter, J. M. & Woods, R. D. Egypt bee virus and Australian isolates of Kashmir bee virus. *J. Gen. Virol.* **43,** 641–647 (1979).
117. Kogan, M. Integrated pest management: historical perspectives and contemporary developments. *Annu. Rev. Entomol.* **43,** 243–270 (1998).

118. Eguaras, M. J. & Ruffinengo, S. R. *Estrategias para el control de varroa*. (2007).
119. Maggi, M., Ruffinengo, S., Negri, P., Brasesco, C., Medici, S., Quintana, S., Szawarski, N., Gimenez, P., Mitton, G. & Eguaras, M. J. The status of bee health and colony losses in Argentina. *Honeybees Foraging Behav. Reprod. Biol. Dis. Ed Cameron Molley Nova Publ. Group ISBN* 978–1 (2013).
120. Currie, R. W. & Gatien, P. Timing acaricide treatments to prevent Varroa destructor (Acari: Varroidae) from causing economic damage to honey bee colonies. *Can. Entomol.* **138,** 238–252 (2006).
121. Dainat, B., Kuhn, R., Cherix, D. & Neumann, P. A scientific note on the ant pitfall for quantitative diagnosis of Varroa destructor. *Apidologie* **42,** 740–742 (2011).
122. Kretzschmar, A., Durand, E., Maisonnasse, A., Vallon, J. & Conte, Y. L. A New Stratified Sampling Procedure which Decreases Error Estimation of Varroa Mite Number on Sticky Boards. *J. Econ. Entomol.* **108,** 1435–1443 (2015).
123. Cramp, D. *The Beekeepers Field Guide: Solutions for Beekeepers*. (Bassdrum Books Ltd, 2006).
124. Brødsgaard, C. J. & Brødsgaard, H. F. Monitoring Method as a Basis for Need-based Control of Varroa Mites (Varroa jacobsoni) Infesting Honey Bee (Apis mellifera) Colonies. *Altern. Lab. Anim. ATLA* **26,** 413 (1998).
125. Wilkinson, D., Smith, G. C., Hutton, S. & York, Y. Modeling the Efficiency of Sampling and Trapping Varroa destructor in the Drone Brood of Honey bees (Apis mellifera). *Am. Bee J.* **142,** 209–209 (2002).
126. Lee, K., Reuter, G. & Spivak, M. Standardized sampling plan to detect varroa density in colonies and apiaries. *Am. Bee J.* **150,** 1151–1155 (2010).
127. Boncristiani, H., Underwood, R., Schwarz, R., Evans, J. D. & Pettis, J. Direct effect of acaricides on pathogen loads and gene expression levels in honey bees Apis mellifera. *J. Insect Physiol.* **58,** 613–620 (2012).
128. Davenport, A. P., Morton, D. B. & Evans, P. D. The action of formamidines on octopamine receptors in the locust. *Pestic. Biochem. Physiol.* **24,** 45–52 (1985).
129. Roeder, T. Pharmacology of the octopamine receptor from locust central nervous tissue (OAR3). *Br. J. Pharmacol.* **114,** 210–216 (1995).
130. Atkinson, P. W., Binnington, K. C. & Roulston, W. J. High monoamine oxidase activity in the tick Boophilus microplus and inhibition by chlordimeform and related pesticides. *Aust. J. Entomol.* **13,** 207–210 (1974).
131. Hugnet, C., Buronfosse, F., Pineau, X., Cadore, J. L., Lorgue, G. & Berny, P. J. Toxicity and kinetics of amitraz in dogs. *Heart* **2,** 5 (1996).
132. Jorens, P. G., Zandijk, E., Belmans, L., Schepens, P. J. C. & Bossaert, L. L. An unusual poisoning with the unusual pesticide amitraz. *Hum. Exp. Toxicol.* **16,** 600–601 (1997).
133. Dudai, Y., Buxbaum, J., Corfas, G. & Ofarim, M. Formamidines interact withDrosophila octopamine receptors, alter the flies' behavior and reduce their learning ability. *J. Comp. Physiol. A Neuroethol. Sens. Neural. Behav. Physiol.* **161,** 739–746 (1987).
134. Evans, P. D. & Gee, J. D. Action of formamidine pesticides on octopamine receptors. *Nature* **287,** 60–62 (1980).
135. Sanchez-Bayo, F. & Goka, K. Pesticide residues and bees–a risk assessment. *PloS One* **9,** e94482 (2014).
136. Kita, T., Hayashi, T., Ohtani, T., Takao, H., Takasu, H., Liu, G., Ohta, H., Ozoe, F. & Ozoe, Y. Amitraz and its metabolite differentially activate α-and β-adrenergic-like octopamine receptors. *Pest Manag. Sci.* (2016).
137. Hong, J.-Y., Jung, O.-S., Ryoo, J. J. & Hong, J.-K. Determination of acaricides in honey by solid-phase extraction and gas chromatography/mass spectrometry. *Bull. Korean Chem. Soc.* **30,** 61–66 (2009).

138. Martel, A.-C., Zeggane, S., Aurières, C., Drajnudel, P., Faucon, J.-P. & Aubert, M. Acaricide residues in honey and wax after treatment of honey bee colonies with Apivar® or Asuntol® 50. *Apidologie* **38,** 534–544 (2007).
139. Mullin, C. A., Frazier, M., Frazier, J. L., Ashcraft, S., Simonds, R. & Pettis, J. S. High levels of miticides and agrochemicals in North American apiaries: implications for honey bee health. *PLoS One* **5,** e9754 (2010).
140. Rix, R. R. & C. Cutler, G. Acute Exposure to Worst-Case Concentrations of Amitraz Does Not Affect Honey Bee Learning, Short-Term Memory, or Hemolymph Octopamine Levels. *J. Econ. Entomol.* **110,** 127–132 (2017).
141. Davies, T. G. E., Field, L. M., Usherwood, P. N. R. & Williamson, M. S. DDT, pyrethrins, pyrethroids and insect sodium channels. *IUBMB Life* **59,** 151–162 (2007).
142. Wang, S.-Y. & Wang, G. K. Voltage-gated sodium channels as primary targets of diverse lipid-soluble neurotoxins. *Cell. Signal.* **15,** 151–159 (2003).
143. Johnson, R. M., Dahlgren, L., Siegfried, B. D. & Ellis, M. D. Acaricide, fungicide and drug interactions in honey bees (Apis mellifera). *PloS One* **8,** e54092 (2013).
144. Johnson, R. M., Wen, Z., Schuler, M. A. & Berenbaum, M. R. Mediation of pyrethroid insecticide toxicity to honey bees (Hymenoptera: Apidae) by cytochrome P450 monooxygenases. *J. Econ. Entomol.* **99,** 1046–1050 (2006).
145. Chauzat, M.-P. & Faucon, J.-P. Pesticide residues in beeswax samples collected from honey bee colonies (Apis mellifera L.) in France. *Pest Manag. Sci.* **63,** 1100–1106 (2007).
146. Tsigouri, A. D., Menkissoglu-Spiroudi, U. & Thrasyvoulou, A. Study of tau-fluvalinate persistence in honey. *Pest Manag. Sci.* **57,** 467–471 (2001).
147. Aubert, M., Faucon, J.-P. & Chauzat, M.-P. *Enquête prospective multifactorielle : influence des agents microbiens et parasitaires, et des résidus de pesticides sur le devenir de colonies d'abeilles domestiques en conditions naturelles*. (Unité Pathologie de l'abeille (Anses), 2008).
148. Haarmann, T., Spivak, M., Weaver, D., Weaver, B. & Glenn, T. Effects of fluvalinate and coumaphos on queen honey bees (Hymenoptera: Apidae) in two commercial queen rearing operations. *J. Econ. Entomol.* **95,** 28–35 (2002).
149. Fukuto, T. R. Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. *Environ. Health Perspect.* **87,** 245 (1990).
150. Li, A. Y., Davey, R. B., Miller, R. J. & George, J. E. Resistance to coumaphos and diazinon in Boophilus microplus (Acari: Ixodidae) and evidence for the involvement of an oxidative detoxification mechanism. *J. Med. Entomol.* **40,** 482–490 (2003).
151. Johnson, R. M., Pollock, H. S. & Berenbaum, M. R. Synergistic interactions between in-hive miticides in Apis mellifera. *J. Econ. Entomol.* **102,** 474–479 (2009).
152. Chauzat, M.-P., Carpentier, P., Martel, A.-C., Bougeard, S., Cougoule, N., Porta, P., Lachaize, J., Madec, F., Aubert, M. & Faucon, J.-P. Influence of pesticide residues on honey bee (Hymenoptera: Apidae) colony health in France. *Environ. Entomol.* **38,** 514–523 (2009).
153. Karazafiris, E., Tananaki, C., Menkissoglu-Spiroudi, U. & Thrasyvoulou, A. Residue distribution of the acaricide coumaphos in honey following application of a new slow-release formulation. *Pest Manag. Sci.* **64,** 165–171 (2008).
154. Weick, J. & Thorn, R. S. Effects of acute sublethal exposure to coumaphos or diazinon on acquisition and discrimination of odor stimuli in the honey bee (Hymenoptera: Apidae). *J. Econ. Entomol.* **95,** 227–236 (2002).
155. Pettis, J., Collins, A., Wilbanks, R. & Feldlaufer, M. F. Effects of coumaphos on queen rearing in the honey bee, Apis mellifera. *Apidologie* **35,** 605–610 (2004).
156. Holdsworth, P. A. History of ectoparasiticide use in Australian livestock production. *Ectoparasiticide Use Contemp. Aust. Livest. Prod.* 7 (2005).

157. Cabras, P., Martini, M. G., Floris, I. & Spanedda, L. Residues of cymiazole in honey and honey bees. *J. Apic. Res.* **33,** 83–86 (1994).
158. Lümmen, P. Complex I inhibitors as insecticides and acaricides. *Biochim. Biophys. Acta BBA-Bioenerg.* **1364,** 287–296 (1998).
159. Sparks, T. C. & Nauen, R. IRAC: Mode of action classification and insecticide resistance management. *Pestic. Biochem. Physiol.* **121,** 122–128 (2015).
160. O'Reilly, A. O., Williamson, M. S., González-Cabrera, J., Turberg, A., Field, L. M., Wallace, B. A. & Davies, T. G. Predictive 3D modelling of the interactions of pyrethroids with the voltage-gated sodium channels of ticks and mites. *Pest Manag. Sci.* **70,** 369–377 (2014).
161. Ravoet, J., Reybroeck, W. & de Graaf, D. C. Pesticides for apicultural and/or agricultural application found in Belgian honey bee wax combs. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **94,** 543–548 (2015).
162. Marchetti, S., Barbattini, R. & D'Agaru, M. Comparative effectiveness of treatments used to control Varroa jacobsoni Oud. *Apidologie* **15,** 363–377 (1984).
163. Ritter, W. & Roth, H. Experiments with mite resistance to varroacidal substances in the laboratory. (1988).
164. Imdorf, A., Bogdanov, S., Iba ez Ochoa, R. & Calderone, N. W. Use of essential oils for the control of Varroa jacobsoni Oud. in honey bee colonies. *Apidologie* **30,** 209–228 (1999).
165. Imdorf, A., Bogdanov, S., Kilchenmann, V. & Maquelin, C. Apilife VAR: a new varroacide with thymol as the main ingredient. *Bee World* **76,** 77–83 (1995).
166. Colombo, M. & Spreafico, M. Control of Varroa jacobsoni Oud. by a new thymol formulation [Tuscany-Lombardy]. *Sel. Vet. Italy* (1999).
167. Costa, C., Lodesani, M. & Maistrello, L. Effect of thymol and resveratrol administered with candy or syrup on the development of Nosema ceranae and on the longevity of honeybees (Apis mellifera L.) in laboratory conditions. *Apidologie* **41,** 141–150 (2010).
168. Priestley, C. M., Williamson, E. M., Wafford, K. A. & Sattelle, D. B. Thymol, a constituent of thyme essential oil, is a positive allosteric modulator of human GABAA receptors and a homo-oligomeric GABA receptor from Drosophila melanogaster. *Br. J. Pharmacol.* **140,** 1363–1372 (2003).
169. Tong, F. & Coats, J. R. Effects of monoterpenoid insecticides on [3 H]-TBOB binding in house fly GABA receptor and 36 Cl- uptake in American cockroach ventral nerve cord. *Pestic. Biochem. Physiol.* **98,** 317–324 (2010).
170. Enan, E. Molecular response of Drosophila melanogaster tyramine receptor cascade to plant essential oils. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **35,** 309–321 (2005).
171. Parnas, M., Peters, M., Dadon, D., Lev, S., Vertkin, I., Slutsky, I. & Minke, B. Carvacrol is a novel inhibitor of Drosophila TRPL and mammalian TRPM7 channels. *Cell Calcium* **45,** 300–309 (2009).
172. Emsen, B. & Dodologlu, A. Efficacy of different organic compounds against bee mite (Varroa destructor Anderson and Trueman) in honey bee (Apis mellifera L) colonies. *J Anim Vet Adv* **10,** 802–805 (2011).
173. Giacomelli, A., Pietropaoli, M., Carvelli, A., Iacoponi, F. & Formato, G. Combination of thymol treatment (Apiguard®) and caging the queen technique to fight Varroa destructor. *Apidologie* **47,** 606–616 (2016).
174. Gashout, H. A. & Guzmán-Novoa, E. Acute toxicity of essential oils and other natural compounds to the parasitic mite, Varroa destructor, and to larval and adult worker honey bees (Apis mellifera L.). *J. Apic. Res.* **48,** 263–269 (2009).

175. Floris, I., Satta, A., Cabras, P., Garau, V. L. & Angioni, A. Comparison between two thymol formulations in the control of Varroa destructor: effectiveness, persistence, and residues. *J. Econ. Entomol.* **97,** 187–191 (2004).
176. Carayon, J.-L., Téné, N., Bonnafé, E., Alayrangues, J., Hotier, L., Armengaud, C. & Treilhou, M. Thymol as an alternative to pesticides: persistence and effects of Apilife Var on the phototactic behavior of the honeybee Apis mellifera. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **21,** 4934–4939 (2014).
177. Bonnafé, E., Drouard, F., Hotier, L., Carayon, J.-L., Marty, P., Treilhou, M. & Armengaud, C. Effect of a thymol application on olfactory memory and gene expression levels in the brain of the honeybee Apis mellifera. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **22,** 8022–8030 (2015).
178. Pietropaoli, M., Mortarino, M. & Formato, G. The nightmare before Christmas: first cases of thymol resistance in Varroa destructor. in 20–24 (2015).
179. Stinson, E. E., Subers, M. H., Petty, J. & White, J. W. The composition of honey. V. Separation and identification of the organic acids. *Arch. Biochem. Biophys.* **89,** 6–12 (1960).
180. Calderon, R. A., Ortiz, R. A., Arce, H. G., Van Veen, J. W. & Quan, J. Effectiveness of formic acid on varroa mortality in capped brood cells of Africanized honey bees. *J. Apic. Res.* **39,** 177–179 (2000).
181. Nicholls, P. Formate as an inhibitor of cytochrome c oxidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **67,** 610–616 (1975).
182. Petersen, L. C. The effect of inhibitors on the oxygen kinetics of cytochrome c oxidase. *Biochim. Biophys. Acta BBA-Bioenerg.* **460,** 299–307 (1977).
183. Song, C. & Scharf, M. E. Formic acid: A neurologically active, hydrolyzed metabolite of insecticidal formate esters. *Pestic. Biochem. Physiol.* **92,** 77–82 (2008).
184. Gashout, H. Effect of sub-lethal doses of synthetic and natural acaricides on honey bee (Apis mellifera L.) health, memory, behaviour and associated gene expression. (2017).
185. Underwood, R. M. & Currie, R. W. Indoor winter fumigation with formic acid for control of Acarapis woodi (Acari: Tarsonemidae) and nosema disease, Nosema sp. *J. Econ. Entomol.* **102,** 1729–1736 (2009).
186. Underwood, R. M. & Currie, R. W. Indoor winter fumigation of Apis mellifera (Hymenoptera: Apidae) colonies infested with Varroa destructor (Acari: Varroidae) with formic acid is a potential control alternative in northern climates. *J. Econ. Entomol.* **97,** 177–186 (2004).
187. Schlüns, H., Welling, H., Federici, J. R. & Lewejohann, L. The glass is not yet half empty: agitation but not Varroa treatment causes cognitive bias in honey bees. *Anim. Cogn.* 1–9 (2016).
188. Holmes, R. P. & Kennedy, M. Estimation of the oxalate content of foods and daily oxalate intake. *Kidney Int.* **57,** 1662–1667 (2000).
189. Rademacher, E. & Harz, M. Oxalic acid for the control of varroosis in honey bee colonies-a review. *Apidologie* **37,** 98–120 (2006).
190. Meimaridou, E., Lobos, E. & Hothersall, J. S. Renal oxidative vulnerability due to changes in mitochondrial-glutathione and energy homeostasis in a rat model of calcium oxalate urolithiasis. *Am. J. Physiol.-Ren. Physiol.* **291,** F731–F740 (2006).
191. Aliano, N. P., Ellis, M. D. & Siegfried, B. D. Acute contact toxicity of oxalic acid to Varroa destructor (Acari: Varroidae) and their Apis mellifera (Hymenoptera: Apidae) hosts in laboratory bioassays. *J. Econ. Entomol.* **99,** 1579–1582 (2006).
192. Carrasco-Letelier, L., Mendoza, Y. & Ramallo, G. Acute Contact Toxicity Test of Oxalic Acid on Honeybees in the Southwestern Zone of Uruguay. *Chil. J. Agric. Res.* **72,** 285 (2012).

193. Asha, R. G. & Sharma, S. K. Comparative evaluation of oxalic acid and formic acid against Varroa destructor Anderson and Trueman in Apis mellifera L. colonies. (2014).
194. Gregorc, A., Adamczyk, J., Kapun, S. & Planinc, I. Integrated varroa control in honey bee (Apis mellifera carnica) colonies with or without brood. *J. Apic. Res.* **55,** 253–258 (2016).
195. Allsopp, M. H. Analysis of Varroa destructor infestation of southern African honeybee populations. (2007).
196. Fries, I., Wei, H., Wei, S. & Chen, S. J. Grooming behavior and damaged mites (Varroa jacobsoni) in Apis cerana cerana and Apis mellifera ligustica. *Apidologie* **27,** 3–12 (1996).
197. Peng, Y.-S., Fang, Y., Xu, S. & Ge, L. The resistance mechanism of the Asian honey bee, Apis cerana Fabr., to an ectoparasitic mite, Varroa jacobsoni Oudemans. *J. Invertebr. Pathol.* **49,** 54–60 (1987).
198. Rath, W. Co-adaptation of Apis cerana Fabr. and Varroa jacobsoni Oud. *Apidologie* **30,** 97–110 (1999).
199. de Mattos, I. M., Soares, A. E. & Tarpy, D. R. Effects of synthetic acaricides on honey bee grooming behavior against the parasitic Varroa destructor mite. *Apidologie* 1–12 (2017). doi:10.1007/s13592-017-0491-9
200. Harris, J. & Harbo, J. Natural and Suppressed Reproduction of Varroa Mites. *Bee Cult.* **129,** 34–38 (2001).
201. Harris, J. W. & Harbo, J. R. The SMR trait explained by hygienic behavior of adult bees. *Am Bee J* **145,** 430–431 (2005).
202. Ibrahim, A. & Spivak, M. The relationship between hygienic behavior and suppression of mite reproduction as honey bee (Apis mellifera) mechanisms of resistance to Varroa destructor. *Apidologie* **37,** 31–40 (2006).
203. Harris, J. W. Bees with Varroa Sensitive Hygiene preferentially remove mite infested pupae aged≤ five days post capping. *J. Apic. Res.* **46,** 134–139 (2007).
204. Plettner, E., Eliash, N., Singh, N. K., Pinnelli, G. R. & Soroker, V. The chemical ecology of host-parasite interaction as a target of Varroa destructor control agents. *Apidologie* **48,** 78–92 (2017).
205. Kraus, B. & Velthuis, H. H. W. High humidity in the honey bee (Apis mellifera L.) brood nest limits reproduction of the parasitic mite Varroa jacobsoni Oud. *Naturwissenschaften* **84,** 217–218 (1997).
206. Le Conte, Y., Arnold, G. & Desenfant, P. H. Influence of brood temperature and hygrometry variations on the development of the honey bee ectoparasite Varroa jacobsoni (Mesostigmata: Varroidae). *Environ. Entomol.* **19,** 1780–1785 (1990).
207. Wilde, J. & Koeniger, N. Selektion auf Verkurzung der Zellverdeckelungsdauer [ZVD] der Arbeiterinnenbrut von Apis mellifera carnica. *Ann. Univ. Mariae Curie-Sklodowska Sect. DD Med. Vet.* **47,** 133–136 (1992).
208. Rinderer, T. E., DeGuzman, L. I., Harris, J., Kuznetsov, V., Delatte, G. T., Stelzer, J. A. & Beaman, L. The release of ARS Russian honey bees. *Am. Bee J.* **140,** 305–310 (2000).
209. Rinderer, T. E., Harris, J. W., Hunt, G. J. & De Guzman, L. I. Breeding for resistance to Varroa destructor in North America. *Apidologie* **41,** 409–424 (2010).
210. Calis, J. N. M., Boot, W. J. & Beetsma, J. Model evaluation of methods for Varroa jacobsoni mite control based on trapping in honey bee brood. *Apidologie* 197–207 (1999).
211. Ruttner, F., Koeniger, N. & Ritter, W. Brutstop und Brutentnahme. *Allg. Dtsch. Imkerztg.* **14,** 159–160 (1980).
212. Rinkevich, F. D., Danka, R. G. & Healy, K. B. Influence of Varroa Mite (Varroa destructor) Management Practices on Insecticide Sensitivity in the Honey Bee (Apis mellifera). *Insects* **8,** 9 (2017).

213. Calderone, N. W. Evaluation of drone brood removal for management of Varroa destructor (Acari: Varroidae) in colonies of Apis mellifera (Hymenoptera: Apidae) in the northeastern United States. *J. Econ. Entomol.* **98,** 645–650 (2005).
214. Charrière, J.-D., Imdorf, A., Bachofen, B. & Tschan, A. The removal of capped drone brood: an effective means of reducing the infestation of varroa in honey bee colonies. *Bee World* **84,** 117–124 (2003).
215. Eilenberg, J., Hajek, A. & Lomer, C. Suggestions for unifying the terminology in biological control. *BioControl* **46,** 387–400 (2001).
216. Chandler, D., Sunderland, K. D., Ball, B. V. & Davidson, G. Prospective biological control agents of Varroa destructor n. sp., an important pest of the European honeybee, Apis mellifera. *Biocontrol Sci. Technol.* **11,** 429–448 (2001).
217. Weygoldt, P. Biology of pseudoscorpions. (1969).
218. Donovan, B. J. & Paul, F. Pseudoscorpions: the forgotten beneficials inside beehives and their potential for management for control of varroa and other arthropod pests. *Bee World* **86,** 83–87 (2005).
219. Fagan, L. L., Nelson, W. R., Meenken, E. D., Howlett, B. G., Walker, M. K. & Donovan, B. J. Varroa management in small bites. *J. Appl. Entomol.* **136,** 473–475 (2012).
220. van Toor, R. F., Read, S., Donovan, B. J. & Howlett, B. Harnessing chelifers for Varroa control. in (2013).
221. Fombong, A. T., Cham, D. T., Nkoba, K., Neethling, J. A. & Raina, S. K. Occurrence of the pseudoscorpions Ellingsenius ugandanus and Paratemnoides pallidus in honey bee colonies in Cameroon. *J. Apic. Res.* **55,** 247–250 (2016).
222. Thapa, R., Wongsiri, S., Lee, M. L. & Choi, Y.-S. Predatory behaviour of pseudoscorpions (Ellingsenius indicus) associated with Himalayan Apis cerana. *J. Apic. Res.* **52,** 219–226 (2013).
223. van Toor, R. F., Thompson, S. E., Gibson, D. M. & Smith, G. R. Ingestion of Varroa destructor by pseudoscorpions in honey bee hives confirmed by PCR analysis. *J. Apic. Res.* **54,** 555–562 (2015).
224. Donovan, B. J. & Paul, F. Pseudoscorpions to the rescue? *Am. Bee J.* **146,** 867–869 (2006).
225. Kleespies, R. G., Radtke, J. & Bienefeld, K. Virus-like particles found in the ectoparasitic bee mite Varroa jacobsoni Oudemans. *J. Invertebr. Pathol.* **75,** 87–90 (2000).
226. Alquisira-Ramírez, E. V., Paredes-Gonzalez, J. R., Hernández-Velázquez, V. M., Ramírez-Trujillo, J. A. & Peña-Chora, G. In vitro susceptibility of Varroa destructor and Apis mellifera to native strains of Bacillus thuringiensis. *Apidologie* **45,** 707–718 (2014).
227. Tsagou, V., Lianou, A., Lazarakis, D., Emmanouel, N. & Aggelis, G. Newly isolated bacterial strains belonging to Bacillaceae (Bacillus sp.) and Micrococcaceae accelerate death of the honey bee mite, Varroa destructor (V. jacobsoni), in laboratory assays. *Biotechnol. Lett.* **26,** 529–532 (2004).
228. Tu, S., Qiu, X., Cao, L., Han, R., Zhang, Y. & Liu, X. Expression and characterization of the chitinases from Serratia marcescens GEI strain for the control of Varroa destructor, a honey bee parasite. *J. Invertebr. Pathol.* **104,** 75–82 (2010).
229. Alquisira-Ramírez, E. V., Peña-Chora, G., Hernández-Velázquez, V. V. M., Alvear-García, A., Arenas-Sosa, I. & Suarez-Rodríguez, R. Effects of Bacillus thuringiensis strains virulent to Varroa destructor on larvae and adults of Apis mellifera. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **142,** 69–78 (2017).
230. Shaw, K. E., Davidson, G., Clark, S. J., Ball, B. V., Pell, J. K., Chandler, D. & Sunderland, K. D. Laboratory bioassays to assess the pathogenicity of mitosporic fungi to Varroa destructor (Acari: Mesostigmata), an ectoparasitic mite of the honeybee, Apis mellifera. *Biol. Control* **24,** 266–276 (2002).

231. Kanga, L. H. B., Jones, W. A. & Gracia, C. 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 (2006).
232. Kanga, L. H. B., Jones, W. A. & James, R. R. Field trials using the fungal pathogen, Metarhizium anisopliae (Deuteromycetes: Hyphomycetes) to control the ectoparasitic mite, Varroa destructor (Acari: Varroidae) in honey bee, Apis mellifera (Hymenoptera: Apidae) colonies. *J. Econ. Entomol.* **96,** 1091–1099 (2003).
233. James, R. R., Hayes, G. & Leland, J. E. Field trials on the microbial control of varroa with the fungus Metarhizium anisopliae. *Am. Bee J.* **146,** 968–972 (2006).
234. Meikle, W. G., Mercadier, G., Holst, N. & Girod, V. Impact of two treatments of a formulation of Beauveria bassiana (Deuteromycota: Hyphomycetes) conidia on Varroa mites (Acari: Varroidae) and on honeybee (Hymenoptera: Apidae) colony health. *Exp. Appl. Acarol.* **46,** 105 (2008).
235. Muerrle, T. M., Neumann, P., Dames, J. F., Hepburn, H. R. & Hill, M. P. Susceptibility of adult Aethina tumida (Coleoptera: Nitidulidae) to entomopathogenic fungi. *J. Econ. Entomol.* **99,** 1–6 (2006).
236. Inglis, G. D., Goettel, M. S., Butt, T. M. & Strasser, H. Use of hyphomycetous fungi for managing insect pests. *Fungi Biocontrol Agents* 23–69 (2001).
237. Meikle, W. G., Sammataro, D., Neumann, P. & Pflugfelder, J. Challenges for developing pathogen-based biopesticides against Varroa destructor (Mesostigmata: Varroidae). *Apidologie* **43,** 501–514 (2012).
238. Vandervalk, L. P., Nasr, M. E. & Dosdall, L. M. New miticides for integrated pest management of Varroa destructor (Acari: Varroidae) in honey bee colonies on the Canadian Prairies. *J. Econ. Entomol.* **107,** 2030–2036 (2014).
239. Rademacher, E., Harz, M. & Schneider, S. The development of HopGuard® as a winter treatment against Varroa destructor in colonies of Apis mellifera. *Apidologie* **46,** 748–759 (2015).
240. Garbaczewska, S., Kazimierczak, J., Lysik, A. & Londzin, W. Ecological mite control agents, particularly against Varroa destructor. *Pestycydy* (2010).
241. Eguaras, M., Del Hoyo, M., Benavente, M., Palacio, A., Velis, G., Floris, I. & Satta, A. Rotenone for Varroa destructor control: effectiveness in field trials. *Biopestic. Int.* **1,** 2 (2005).
242. Satta, A., Floris, I., Caboni, P., Cabras, P., Eguaras, M. & Velis, G. New experimental data on use of rotenone as an acaricide for control of Varroa destructor in honey bee colonies. *J. Econ. Entomol.* **101,** 1075–1080 (2008).
243. Nisbet, A. J. Azadirachtin from the neem tree Azadirachta indica: its action against insects. *An. Soc. Entomológica Bras.* **29,** 615–632 (2000).
244. Naumann, K. & Isman, M. B. Toxicity of a neem (Azadirachta indica A. Juss) insecticide to larval honey bees. *Am. Bee J.* (1996).
245. González-Gómez, R., Otero-Colina, G., Villanueva-Jiménez, J. A., Santillán-Galicia, M. T., Peña-Valdivia, C. B. & Santizo-Rincón, J. A. Effects of neem (Azadirachta indica) on honey bee workers and queens, while applied to control Varroa destructor. *J. Apic. Res.* **55,** 413–421 (2016).
246. Melathopoulos, A. P., Winston, M. L., Whittington, R., Higo, H. & Le Doux, M. Field evaluation of neem and canola oil for the selective control of the honey bee (Hymenoptera: Apidae) mite parasites Varroa jacobsoni (Acari: Varroidae) and Acarapis woodi (Acari: Tarsonemidae). *J. Econ. Entomol.* **93,** 559–567 (2000).
247. Schenk, P., Imdorf, A. & Fluri, P. Effects of neem oil on Varroa mites and bees. *Am. Bee J.* **141,** 878–880 (2001).

248. Message, D. & Gonçalves, L. S. Effect of the size of worker brood cells of Africanized honey bees on infestation and reproduction of the ectoparasitic mite Varroa jacobsoni Oud. *Apidologie* **26,** 381–386 (1995).
249. Maggi, M., Damiani, N., Ruffinengo, S., De Jong, D., Principal, J. & Eguaras, M. Brood cell size of Apis mellifera modifies the reproductive behavior of Varroa destructor. *Exp. Appl. Acarol.* **50,** 269–279 (2010).
250. Moscatelli, F., Pietropaoli, M., Brocherel, G., Martini, A. & Formato, G. Phosphorus 30 CH to control Varroa population in Apis mellifera colonies. *Eur. J. Integr. Med.* **8,** 861–864 (2016).
251. Jiang, H., Kim, D., Dobesh, S., Evans, J. D., Nachman, R. J., Kaczmarek, K., Zabrocki, J. & Park, Y. Ligand selectivity in tachykinin and natalisin neuropeptidergic systems of the honey bee parasitic mite Varroa destructor. *Sci. Rep.* **6,** (2016).
252. Pattrick, J. G., Block, W. & Glover, B. J. The effect of the 'Bee Gym™'grooming device on Varroa destructor mite fall from honey bee (Apis mellifera) colonies. *J. Apic. Res.* **56,** 63–70 (2017).
253. Vandame, J. Médicaments de lutte contre Varroa destructor. Tests d'efficacité 2016. *La Santé de l'Abeille* 227–250 (2017).
254. Mozes-Koch, R., Slabezki, Y., Efrat, H., Kalev, H., Kamer, Y., Yakobson, B. A. & Dag, A. First detection in Israel of fluvalinate resistance in the varroa mite using bioassay and biochemical methods. *Exp. Appl. Acarol.* **24,** 35–43 (2000).
255. Mallick, A. Action sanitaire en production apicole: gestion de la varroose face à l'apparition de résistance aux traitements chez varroa destructor. (2013).
256. Lodesani, M., Colombo, M. & Spreafico, M. Ineffectiveness of Apistan treatment against the mite Varroa jacobsoni Oud. in several districts of Lombardy (Italy). *Apidologie* **26,** 67–72 (1995).
257. Trouiller, J. Monitoring Varroa jacobsoni resistance to pyrethroids in western Europe. *Apidologie* **29,** 537–546 (1998).
258. Thompson, H., Brown, M., Ball, R. & Bew, M. First report of Varroa destructor resistance to pyrethroids in the UK. *Apidologie* **33,** 357–366 (2002).
259. Gracia-Salinas, M. J., Ferrer-Dufol, M., Latorre-Castro, E., Monero-Manera, C., Castillo-Hernández, J. A., Lucientes-Curd, J. & Peribanez-Lopez, M. A. Detection of fluvalinate resistance in Varroa destructor in Spanish apiaries. *J. Apic. Res.* **45,** 101–105 (2006).
260. Martin, S. J. Acaricide (pyrethroid) resistance in Varroa destructor. *Bee World* **85,** 67–69 (2004).
261. Elzen, P. J., Eischen, F. A., Baxter, J. R., Elzen, G. W. & Wilson, W. T. Detection of resistance in US Varroa jacobsoni Oud.(Mesostigmata: Varroidae) to the acaricide fluvalinate. *Apidologie* **30,** 13–18 (1999).
262. Wang, R., Liu, Z., Dong, K., Elzen, P. J., Pettis, J. & Huang, Z. Association of novel mutations in a sodium channel gene with fluvalinate resistance in the mite, Varroa destructor. *J. Apic. Res.* **41,** 17–25 (2002).
263. Hubert, J., Nesvorna, M., Kamler, M., Kopecky, J., Tyl, J., Titera, D. & Stara, J. Point mutations in the sodium channel gene conferring tau-fluvalinate resistance in Varroa destructor. *Pest Manag. Sci.* **70,** 889–894 (2014).
264. Elzen, P. J., Westervelt, D. & others. Detection of coumaphos resistance in Varroa destructor in Florida. *Am. Bee J.* **142,** 291–292 (2002).
265. Maggi, M. D., Ruffinengo, S. R., Damiani, N., Sardella, N. H. & Eguaras, M. J. First detection of Varroa destructor resistance to coumaphos in Argentina. *Exp. Appl. Acarol.* **47,** 317–320 (2009).
266. Milani, N. The resistance of Varroa jacobsoni Oud. to acaricides. (1999).

267. Pettis, J. S. & Jadczak, T. Detecting coumaphos resistance in Varroa mites. *Am. Bee J.* **145,** 967–970 (2005).
268. Guerrero, F. D., Lovis, L. & Martins, J. R. Acaricide resistance mechanisms in Rhipicephalus (Boophilus) microplus. *Rev. Bras. Parasitol. Veterinária* **21,** 1–6 (2012).
269. Li, A. Y., Pruett, J. H., Davey, R. B. & George, J. E. Toxicological and biochemical characterization of coumaphos resistance in the San Roman strain of Boophilus microplus (Acari: Ixodidae). *Pestic. Biochem. Physiol.* **81,** 145–153 (2005).
270. Pruett, J. H. Comparative inhibition kinetics for acetylcholinesterases extracted from organophosphate resistant and susceptible strains of Boophilus microplus (Acari: Ixodidae). *J. Econ. Entomol.* **95,** 1239–1244 (2002).
271. Elzen, P., Baxter, J., Spivak, M. & Wilson, W. Control of Varroa jacobsoni Oud. resistant to fluvalinate and amitraz using coumaphos. *Apidologie* **31,** 437–441 (2000).
272. Kamler, M., Nesvorna, M., Stara, J., Erban, T. & Hubert, J. Comparison of tau-fluvalinate, acrinathrin, and amitraz effects on susceptible and resistant populations of Varroa destructor in a vial test. *Exp. Appl. Acarol.* **69,** 1–9 (2016).
273. Maggi, M. D., Ruffinengo, S. R., Negri, P. & Eguaras, M. J. Resistance phenomena to amitraz from populations of the ectoparasitic mite Varroa destructor of Argentina. *Parasitol. Res.* **107,** 1189–1192 (2010).
274. Saldivar, L., Guerrero, F. D., Miller, R. J., Bendele, K. G., Gondro, C. & Brayton, K. A. Microarray analysis of acaricide-inducible gene expression in the southern cattle tick, Rhipicephalus (Boophilus) microplus. *Insect Mol. Biol.* **17,** 597–606 (2008).
275. Corley, S. W., Jonsson, N. N., Piper, E. K., Cutullé, C., Stear, M. J. & Seddon, J. M. Mutation in the RmβAOR gene is associated with amitraz resistance in the cattle tick Rhipicephalus microplus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110,** 16772–16777 (2013).
276. Li, A. Y., Davey, R. B., Miller, R. J. & George, J. E. Mode of inheritance of amitraz resistance in a Brazilian strain of the southern cattle tick, Boophilus microplus (Acari: Ixodidae). *Exp. Appl. Acarol.* **37,** 183–198 (2005).
277. Baron, S., van der Merwe, N. A., Madder, M. & Maritz-Olivier, C. SNP analysis infers that recombination is involved in the evolution of Amitraz resistance in Rhipicephalus microplus. *PloS One* **10,** e0131341 (2015).
278. Boucher, S. *Le dépistage de l'infestation varroa*. 1–20 (Parole d'apiculteur - Vétopharma, 2017).
279. Ballis, A. *Bilan de l'enquête régionale grand Est « Pertes de colonies d'abeilles pendant l'hiver 2015-2016 »*. (Chambre d'Agriculture d'Alsace, 2016).
280. Gohlke, H. & Klebe, G. Approaches to the description and prediction of the binding affinity of small-molecule ligands to macromolecular receptors. *Angew. Chem. Int. Ed.* **41,** 2644–2676 (2002).
281. De Ligt, R., Kourounakis, A. P. & IJzerman, A. P. Inverse agonism at G protein-coupled receptors:(patho) physiological relevance and implications for drug discovery. *Br. J. Pharmacol.* **130,** 1–12 (2000).
282. Liu, B., Li, S. & Hu, J. Technological advances in high-throughput screening. *Am. J. Pharmacogenomics Genomics-Relat. Res. Drug Dev. Clin. Pract.* **4,** 263–276 (2004).
283. Ashburn, T. T. & Thor, K. B. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* **3,** 673–683 (2004).
284. Walters, W. P., Stahl, M. T. & Murcko, M. A. Virtual screening—an overview. *Drug Discov. Today* **3,** 160–178 (1998).
285. Sheridan, R. P. & Kearsley, S. K. Why do we need so many chemical similarity search methods? *Drug Discov. Today* **7,** 903–911 (2002).
286. Martin, Y. C., Kofron, J. L. & Traphagen, L. M. Do structurally similar molecules have similar biological activity? *J. Med. Chem.* **45,** 4350–4358 (2002).

287. Todeschini, R. & Consonni, V. *Handbook of molecular descriptors*. **11,** (John Wiley & Sons, 2008).
288. Baskin, I. & Varnek, A. Fragment descriptors in SAR/QSAR/QSPR studies, molecular similarity analysis and in virtual screening. *ChemInform* **40,** i (2009).
289. Essalih, M. L'étude des indices topologiques, leurs applications en QSAR/QSPR et leurs corrélations aux représentation moléculaire 'Plerograph' et 'Kenograph'. (2013).
290. Wiener, H. Structural determination of paraffin boiling points. *J. Am. Chem. Soc.* **69,** 17–20 (1947).
291. Rogers, D. & Hahn, M. Extended-connectivity fingerprints. *J. Chem. Inf. Model.* **50,** 742–754 (2010).
292. Hert, J., Willett, P., Wilton, D. J., Acklin, P., Azzaoui, K., Jacoby, E. & Schuffenhauer, A. Comparison of topological descriptors for similarity-based virtual screening using multiple bioactive reference structures. *Org. Biomol. Chem.* **2,** 3256–3266 (2004).
293. Consonni, V. & Todeschini, R. in *Recent Adv. QSAR Stud.* 29–102 (Springer, 2010).
294. Good, A. C., Cho, S. & Mason, J. S. Descriptors you can count on? Normalized and filtered pharmacophore descriptors for virtual screening. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **18,** 523–527 (2004).
295. Turner, D. B., Willett, P., Ferguson, A. M. & Heritage, T. Evaluation of a novel infrared range vibration-based descriptor (EVA) for QSAR studies. 1. General application. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **11,** 409–422 (1997).
296. Le Guilloux, V. Développement de méthode et d'outils chémoinformatiques pour l'analyse et la comparaison de chimiothèques. (2013). at <ftp://ftp.univ-orleans.fr/theses/vincent-leguilloux_3415_vd.pdf>
297. Flower, D. R. On the properties of bit string-based measures of chemical similarity. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **38,** 379–386 (1998).
298. Jaccard, P. Étude comparative de la distribution florale dans une portion des Alpes et des Jura. *Bull. Société Vaudoise Sci. Nat.* **37,** 547–579 (1901).
299. Mozziconacci, J.-C. Développement et application de méthodes de drug design : combinaison des approches de docking-scoring et de QSAR. (2003).
300. Kendrew, J. C., Bodo, G., Dintzis, H. M., Parrish, R. G., Wyckoff, H. & Phillips, D. C. A three-dimensional model of the myoglobin molecule obtained by x-ray analysis. *Nature* **181,** 662–666 (1958).
301. Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N. & Bourne, P. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* **28,** 235–242 (2000).
302. Brünger, A. T. X-ray crystallography and NMR reveal complementary views of structure and dynamics. *Nat. Struct. Biol.* **4,** 862 (1997).
303. Foster, M. P., McElroy, C. A. & Amero, C. D. Solution NMR of large molecules and assemblies. *Biochemistry (Mosc.)* **46,** 331–340 (2007).
304. Wlodawer, A., Minor, W., Dauter, Z. & Jaskolski, M. Protein crystallography for non-crystallographers, or how to get the best (but not more) from published macromolecular structures. *Febs J.* **275,** 1–21 (2008).
305. Akcesme, F. B. & Can, M. Secondary Structure Segments are Much More Conserved than Primary Sequence Segments. *Southeast Eur. J. Soft Comput.* **4,** (2016).
306. Illergard, K., Ardell, D. H. & Elofsson, A. Structure is three to ten times more conserved than sequence—a study of structural response in protein cores. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **77,** 499–508 (2009).
307. Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215,** 403–410 (1990).

308. Söding, J. Protein homology detection by HMM–HMM comparison. *Bioinformatics* **21,** 951–960 (2005).
309. Bishop, A., De Beer, T. A. P. & Joubert, F. Protein homology modelling and its use in South Africa. *South Afr. J. Sci.* **104,** 2–6 (2008).
310. Kopp, J. & Schwede, T. Automated protein structure homology modeling: a progress report. *Pharmacogenomics* **5,** 405–416 (2004).
311. Friesner, R. A., Banks, J. L., Murphy, R. B., Halgren, T. A., Klicic, J. J., Mainz, D. T., Repasky, M. P., Knoll, E. H., Shelley, M. & Perry, J. K. Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy. *J. Med. Chem.* **47,** 1739–1749 (2004).
312. Jones, G., Willett, P., Glen, R. C., Leach, A. R. & Taylor, R. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *J. Mol. Biol.* **267,** 727–748 (1997).
313. Fischer, E. Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme. *Eur. J. Inorg. Chem.* **27,** 2985–2993 (1894).
314. Kuntz, I. D., Carpenter, J. M., Oatley, S. J., Langridge, R. & Ferrin, T. E. A geometric approach to macromolecule-ligand interactions. *J. Mol. Biol.* **161,** 269–288 (1982).
315. Brooijmans, N. & Kuntz, I. D. Molecular recognition and docking algorithms. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **32,** 335–373 (2003).
316. Tousignant, A. & Pelletier, J. N. Protein motions promote catalysis. *Chem. Biol.* **11,** 1037–1042 (2004).
317. Wand, A. J. Dynamic activation of protein function: a view emerging from NMR spectroscopy. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **8,** 926–931 (2001).
318. Jasnin, M., Moulin, M., Haertlein, M., Zaccai, G. & Tehei, M. In vivo measurement of internal and global macromolecular motions in Escherichia coli. *Biophys. J.* **95,** 857–864 (2008).
319. McCammon, J. A., Gelin, B. R. & Karplus, M. Dynamics of folded proteins. *Nature* **267,** 585 (1977).
320. De Groot, B. L., Van Aalten, D. M. F., Scheek, R. M., Amadei, A., Vriend, G. & Berendsen, H. J. C. Prediction of protein conformational freedom from distance constraints. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **29,** 240–251 (1997).
321. Lescot-Fontaine, E. Approches 3D-(Q)SAR et modélisation des interactions ligand-récepteur : applications à l'urotensine-II humaine. (2007).
322. Verlet, L. Computer 'experiments' on classical fluids. I. Thermodynamical properties of Lennard-Jones molecules. *Phys. Rev.* **159,** 98 (1967).
323. Best, R. B., Zhu, X., Shim, J., Lopes, P. E. M., Mittal, J., Feig, M. & MacKerell, A. D. Optimization of the additive CHARMM all-atom protein force field targeting improved sampling of the backbone ϕ, ψ and side-chain $\chi1$ and $\chi2$ dihedral angles. *J. Chem. Theory Comput.* **8,** 3257–3273 (2012).
324. Bronowska, A. K. in *Thermodyn. - Interact. Stud. - Solids Liq. Gases* 930 (Intech Open Access Publisher, 2011).
325. Camacho, C. J., Gatchell, D. W., Kimura, S. R. & Vajda, S. Scoring docked conformations generated by rigid-body protein-protein docking. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **40,** 525–537 (2000).
326. Jain, A. N. Scoring noncovalent protein-ligand interactions: a continuous differentiable function tuned to compute binding affinities. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **10,** 427–440 (1996).
327. Kitchen, D. B., Decornez, H., Furr, J. R. & Bajorath, J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nat. Rev. Drug Discov.* **3,** 935–949 (2004).

328. Wang, R. & Wang, S. How does consensus scoring work for virtual library screening ? An idealized computer experiment. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **41,** 1422–1426 (2001).
329. Brooijmans, N. in *Struct. Bioinforma.* **44,** 635–663 (Wiley-Blackwell, 2009).
330. Yin, S., Biedermannova, L., Vondrasek, J. & Dokholyan, N. V. MedusaScore: an accurate force field-based scoring function for virtual drug screening. *J. Chem. Inf. Model.* **48,** 1656–1662 (2008).
331. Kirtay, C. K., Mitchell, J. B. . & Lumley, J. A. Knowledge based potentials: The reverse Boltzmann methodology, virtual screening and molecular weight dependence. *QSAR Comb. Sci.* **24,** 527–536 (2005).
332. Eldridge, M. D., Murray, C. W., Auton, T. R., Paolini, G. V. & Mee, R. P. Empirical scoring functions: I. The development of a fast empirical scoring function to estimate the binding affinity of ligands in receptor complexes. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **11,** 425–445 (1997).
333. Korb, O., Stutzle, T. & Exner, T. E. Empirical scoring functions for advanced protein-ligand docking with PLANTS. *J. Chem. Inf. Model.* **49,** 84–96 (2009).
334. Verdonk, M. L., Cole, J. C., Hartshorn, M. J., Murray, C. W. & Taylor, R. D. Improved protein–ligand docking using GOLD. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **52,** 609–623 (2003).
335. Jones, G., Willett, P., Glen, R. C., Leach, a R. & Taylor, R. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *J. Mol. Biol.* **267,** 727–748 (1997).
336. Loucif-Ayad, W., Aribi, N. & Soltani, N. Evaluation of secondary effects of some acaricides on Apis mellifera intermissa (Hymenoptera, Apidae): acetylcholinesterase and glutathione S-transferase activities. *Eur J Sci Res* **21,** 642–649 (2008).
337. Badiou, A., Meled, M. & Belzunces, L. P. Honeybee Apis mellifera acetylcholinesterase - a biomarker to detect deltamethrin exposure. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **69,** 246–253 (2008).
338. Boily, M., Sarrasin, B., DeBlois, C., Aras, P. & Chagnon, M. Acetylcholinesterase in honey bees (Apis mellifera) exposed to neonicotinoids, atrazine and glyphosate: laboratory and field experiments. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **20,** 5603–5614 (2013).
339. Gosselin-Badaroudine, P., Moreau, A., Delemotte, L., Cens, T., Collet, C., Rousset, M., Charnet, P., Klein, M. L. & Chahine, M. Characterization of the honeybee AmNaV1 channel and tools to assess the toxicity of insecticides. *Sci. Rep.* **5,** (2015).
340. Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V. & Featherstone, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* **7,** 88IN191–9095 (1961).
341. Vetillard, A., Tabardt-Douzou, J., Colin, M.-E. & Vidau, C. Capsule à membrane étanche aux liquides et perméable aux gaz, procédé de fabrication et utilisation pour l'élevage d'arthropodes in vitro. (2014).
342. Zimmerman, G. & Soreq, H. Termination and beyond: acetylcholinesterase as a modulator of synaptic transmission. *Cell Tissue Res.* **326,** 655–669 (2006).
343. Balfour, W. E. & Hebb, C. Mechanisms of acetylcholine synthesis. *J. Physiol.* **118,** 94 (1952).
344. Colhoun, E. H. The physiological significance of acetylcholine in insects and observations upon other pharmacologically active substances. *Adv. Insect Physiol.* **1,** 1–46 (1963).
345. Osborne, R. H. Insect neurotransmission: neurotransmitters and their receptors. *Pharmacol. Ther.* **69,** 117–142 (1996).
346. Dacher, M. & Gauthier, M. Involvement of NO-synthase and nicotinic receptors in learning in the honey bee. *Physiol. Behav.* **95,** 200–207 (2008).
347. Dacher, M., Lagarrigue, A. & Gauthier, M. Antennal tactile learning in the honeybee: effect of nicotinic antagonists on memory dynamics. *Neuroscience* **130,** 37–50 (2005).

348. Gauthier, M., Dacher, M., Thany, S. H., Niggebrügge, C., Déglise, P., Kljucevic, P., Armengaud, C. & Grünewald, B. Involvement of α-bungarotoxin-sensitive nicotinic receptors in long-term memory formation in the honeybee (Apis mellifera). *Neurobiol. Learn. Mem.* **86,** 164–174 (2006).
349. Shang, Y., Claridge-Chang, A., Sjulson, L., Pypaert, M. & Miesenböck, G. Excitatory local circuits and their implications for olfactory processing in the fly antennal lobe. *Cell* **128,** 601–612 (2007).
350. Badiou, A., Brunet, J.-L. & Belzunces, L. P. Existence of two membrane-bound acetylcholinesterases in the honey bee head. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **66,** 122–134 (2007).
351. Kral, K. & Schneider, L. Fine structural localisation of acetylcholinesterase activity in the compound eye of the honeybee (Apis mellifica L.). *Cell Tissue Res.* **221,** 351–39 (1981).
352. Massoulie, J. & Bon, S. The molecular forms of cholinesterase and acetylcholinesterase in vertebrates. *Annu. Rev. Neurosci.* **5,** 57–106 (1982).
353. Massoulié, J. & Rieger, F. L'acétylcholinestérase des organes électriques de poissons (torpille et gymnote); complexes membranaires. *Eur. J. Biochem.* **11,** 441–455 (1969).
354. Massoulié, J., Pezzementi, L., Bon, S., Krejci, E. & Vallette, F.-M. Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Prog. Neurobiol.* **41,** 31–91 (1993).
355. Massoulié, J. & Toutant, J.-P. in *Cholinergic Synap.* 167–224 (Springer, 1988).
356. Toutant, J.-P. Insect acetylcholinesterase: catalytic properties, tissue distribution and molecular forms. *Prog. Neurobiol.* **32,** 423–446 (1989).
357. Belzunces, L. P., Toutant, J. P. & Bounias, M. Acetylcholinesterase from Apis mellifera head. Evidence for amphiphilic and hydrophilic forms characterized by Triton X-114 phase separation. *Biochem. J.* **255,** 463–470 (1988).
358. Massoulié, J., Bon, S., Perrier, N. & Falasca, C. The C-terminal peptides of acetylcholinesterase: cellular trafficking, oligomerization and functional anchoring. *Chem. Biol. Interact.* **157,** 3–14 (2005).
359. Pang, Y.-P. Insect acetylcholinesterase as a target for effective and environmentally safe insecticides. *Adv. Insect Physiol.* **46,** 435–494 (2014).
360. Sussman, J. L. & Harel, M. Atomic structure of acetylcholinesterase from Torpedo californica: a prototypic acetylcholine-binding protein. *Science* **253,** 872 (1991).
361. Harel, M., Kryger, G., Rosenberry, T. L., Mallender, W. D., Lewis, T., Fletcher, R. J., Guss, J. M., Silman, I. & Sussman, J. L. Three-dimensional structures of Drosophila melanogaster acetylcholinesterase and of its complexes with two potent inhibitors. *Protein Sci.* **9,** 1063–1072 (2000).
362. Bourne, Y., Taylor, P., Radić, Z. & Marchot, P. Structural insights into ligand interactions at the acetylcholinesterase peripheral anionic site. *EMBO J.* **22,** 1–12 (2003).
363. Kryger, G., Harel, M., Giles, K., Toker, L., Velan, B., Lazar, A., Kronman, C., Barak, D., Ariel, N. & Shafferman, A. Structures of recombinant native and E202Q mutant human acetylcholinesterase complexed with the snake-venom toxin fasciculin-II. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **56,** 1385–1394 (2000).
364. Levitt, M. & Chothia, C. Structural patterns in globular proteins. *Nature* **261,** 552–558 (1976).
365. Dvir, H., Silman, I., Harel, M., Rosenberry, T. L. & Sussman, J. L. Acetylcholinesterase: from 3D structure to function. *Chem. Biol. Interact.* **187,** 10–22 (2010).
366. Kraut, J. Serine proteases: structure and mechanism of catalysis. *Annu. Rev. Biochem.* **46,** 331–358 (1977).
367. Zhang, Y., Kua, J. & McCammon, J. A. Role of the catalytic triad and oxyanion hole in acetylcholinesterase catalysis: an ab initio QM/MM study. *J. Am. Chem. Soc.* **124,** 10572–10577 (2002).

368. Harel, M., Quinn, D. M., Nair, H. K., Silman, I. & Sussman, J. L. The X-ray structure of a transition state analog complex reveals the molecular origins of the catalytic power and substrate specificity of acetylcholinesterase. *J. Am. Chem. Soc.* **118,** 2340–2346 (1996).
369. Colletier, J.-P., Fournier, D., Greenblatt, H. M., Stojan, J., Sussman, J. L., Zaccai, G., Silman, I. & Weik, M. Structural insights into substrate traffic and inhibition in acetylcholinesterase. *EMBO J.* **25,** 2746–2756 (2006).
370. Ordentlich, A., Barak, D., Kronman, C., Flashner, Y., Leitner, M., Segall, Y., Ariel, N., Cohen, S., Velan, B. & Shafferman, A. Dissection of the human acetylcholinesterase active center determinants of substrate specificity. Identification of residues constituting the anionic site, the hydrophobic site, and the acyl pocket. *J. Biol. Chem.* **268,** 17083–17095 (1993).
371. Wlodek, S. T., Antosiewicz, J. & Briggs, J. M. On the mechanism of acetylcholinesterase action: The electrostatically induced acceleration of the catalytic acylation step. *J. Am. Chem. Soc.* **119,** 8159–8165 (1997).
372. Ripoll, D. R., Faerman, C. H., Axelsen, P. H., Silman, I. & Sussman, J. L. An electrostatic mechanism for substrate guidance down the aromatic gorge of acetylcholinesterase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90,** 5128–5132 (1993).
373. Botti, S. A., Felder, C. E., Lifson, S., Sussman, J. L. & Silman, I. A modular treatment of molecular traffic through the active site of cholinesterase. *Biophys. J.* **77,** 2430–2450 (1999).
374. Tai, K., Shen, T., Henchman, R. H., Bourne, Y., Marchot, P. & McCammon, J. A. Mechanism of acetylcholinesterase inhibition by fasciculin: a 5-ns molecular dynamics simulation. *J. Am. Chem. Soc.* **124,** 6153–6161 (2002).
375. Zhou, H. X., Wlodek, S. T. & McCammon, J. A. Conformation gating as a mechanism for enzyme specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95,** 9280–9283 (1998).
376. Shen, T., Tai, K., Henchman, R. H. & McCammon, J. A. Molecular dynamics of acetylcholinesterase. *Acc. Chem. Res.* **35,** 332–340 (2002).
377. Xu, Y., Colletier, J. P., Weik, M., Jiang, H., Moult, J., Silman, I. & Sussman, J. L. Flexibility of aromatic residues in the active-site gorge of acetylcholinesterase: X-ray versus molecular dynamics. *Biophys. J.* **95,** 2500–2511 (2008).
378. Patel, R., Sanders, R., Brown, L., Baker, S., Tsigelny, I. & Pezzementi, L. A tryptophan in the bottleneck of the catalytic gorge of an invertebrate acetylcholinesterase confers relative resistance to carbamate and organophosphate inhibitors. *Cell Biochem. Biophys.* **46,** 253–264 (2006).
379. Mallender, W. D., Szegletes, T. & Rosenberry, T. L. Acetylthiocholine binds to Asp74 at the peripheral site of human acetylcholinesterase as the first step in the catalytic pathway. *Biochemistry (Mosc.)* **39,** 7753–7763 (2000).
380. Szegletes, T., Mallender, W. D., Thomas, P. J. & Rosenberry, T. L. Substrate binding to the peripheral site of acetylcholinesterase initiates enzymatic catalysis. Substrate inhibition arises as a secondary effect. *Biochemistry (Mosc.)* **38,** 122–133 (1999).
381. Marcel, V., Palacios, L. G., Pertuy, C., Masson, P. & Fournier, D. Two invertebrate acetylcholinesterases show activation followed by inhibition with substrate concentration. *Biochem. J.* **329,** 329–334 (1998).
382. Radic, Z., Pickering, N. A., Vellom, D. C., Camp, S. & Taylor, P. Three distinct domains in the cholinesterase molecule confer selectivity for acetyl-and butyrylcholinesterase inhibitors. *Biochemistry (Mosc.)* **32,** 12074–12084 (1993).
383. Stojan, J., Brochier, L., Alies, C., Colletier, J. P. & Fournier, D. Inhibition of Drosophila melanogaster acetylcholinesterase by high concentrations of substrate. *Eur. J. Biochem.* **271,** 1364–1371 (2004).

384. Changeux, J. . Responses of acetylcholinesterase from Torpedo marmorata to salts and curarizing drugs. *Mol. Pharmacol.* **2,** 369–392 (1966).
385. De Ferrari, G. V., Mallender, W. D., Inestrosa, N. C. & Rosenberry, T. L. Thioflavin T is a fluorescent probe of the acetylcholinesterase peripheral site that reveals conformational interactions between the peripheral and acylation sites. *J. Biol. Chem.* **276,** 23282–23287 (2001).
386. Johnson, G. & Moore, S. W. The peripheral anionic site of acetylcholinesterase: structure, functions and potential role in rational drug design. *Curr. Pharm. Des.* **12,** 217–225 (2006).
387. Birks, J. S. Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Cochrane Libr.* (2006).
388. Mehndiratta, M. M., Pandey, S. & Kuntzer, T. Acetylcholinesterase inhibitor treatment for myasthenia gravis. *Cochrane Libr.* (2011).
389. Marchot, P., Khelif, A., Ji, Y. H., Mansuelle, P. & Bougis, P. E. Binding of 125I-fasciculin to rat brain acetylcholinesterase. The complex still binds diisopropyl fluorophosphate. *J. Biol. Chem.* **268,** 12458–12467 (1993).
390. Cervenansky, C., Dajas, F., Harvey, A. L. & Karlsson, E. Fasciculins, anticholinesterase toxins from mamba venoms: biochemistry and pharmacology. *Snake Toxins* 303–321 (1991).
391. Radić, Z., Duran, R., Vellom, D. C., Li, Y., Cervenansky, C. & Taylor, P. Site of fasciculin interaction with acetylcholinesterase. *J. Biol. Chem.* **269,** 11233–11239 (1994).
392. Bourne, Y., Taylor, P. & Marchot, P. Acetylcholinesterase inhibition by fasciculin: crystal structure of the complex. *Cell* **83,** 503–512 (1995).
393. Harel, M., Kleywegt, G. J., Ravelli, R. B. G., Silman, I. & Sussman, J. L. Crystal structure of an acetylcholinesterase–fasciculin complex: interaction of a three-fingered toxin from snake venom with its target. *Structure* **3,** 1355–1366 (1995).
394. Hall, L. M. & Spierer, P. The Ace locus of Drosophila melanogaster: structural gene for acetylcholinesterase with an unusual 5'leader. *EMBO J.* **5,** 2949 (1986).
395. Eichler, J., Anselment, A., Sussman, J. L., Massoulié, J. & Silman, I. Differential effects of' peripheral' site ligands on Torpedo and chicken acetylcholinesterase. *Mol. Pharmacol.* **45,** 335–340 (1994).
396. Szegletes, T., Mallender, W. D. & Rosenberry, T. L. Nonequilibrium analysis alters the mechanistic interpretation of inhibition of acetylcholinesterase by peripheral site ligands. *Biochemistry (Mosc.)* **37,** 4206–4216 (1998).
397. Marchot, P., Bourne, Y., Prowse, C. N., Bougis, P. E. & Taylor, P. Inhibition of mouse acetylcholinesterase by fasciculin: crystal structure of the complex and mutagenesis of fasciculin. *Toxicon* **36,** 1613–1622 (1998).
398. Radić, Z., Quinn, D. M., Vellom, D. C., Camp, S. & Taylor, P. Allosteric control of acetylcholinesterase catalysis by fasciculin. *J. Biol. Chem.* **270,** 20391–20399 (1995).
399. Eastman, J., Wilson, E., Cerveñansky, C. & Rosenberry, T. L. Fasciculin 2 binds to the peripheral site on acetylcholinesterase and inhibits substrate hydrolysis by slowing a step involving proton transfer during enzyme acylation. *J. Biol. Chem.* **270,** 19694–19701 (1995).
400. Proudfoot, A. The Early Toxicology of Physostigmine. *Toxicol. Rev.* **25,** 99–138 (2006).
401. Jackson, C. J., Oakeshott, J. G., Sanchez-Hernandez, J. C. & Wheelock, G. E. in *Anticholinesterase Pestic. Metab. Neurotox. Epidemiol.* (John Wiley & Sons, 2011).
402. Kuhr, R. J. & Dorough, H. W. *Carbamate insecticides: chemistry, biochemistry, and toxicology.* (CRC Press, Inc., 1976).
403. Ashburn, T. T. & Thor, K. B. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* **3,** 673–683 (2004).

404. Dulin, F., Zatylny-Gaudin, C., Ballandonne, C., Guillet, B., Bonafos, R., Bureau, R. & Halm, M.-P. Protecting honey bees: identification of a new varroacide by in silico, in vitro, and in vivo studies. *Parasitol. Res.* **113,** 4601–4610 (2014).
405. Dahlgren, L., Johnson, R. M., Siegfried, B. D. & Ellis, M. D. Comparative toxicity of acaricides to honey bee (Hymenoptera: Apidae) workers and queens. *J. Econ. Entomol.* **105,** 1895–1902 (2012).
406. Badiou, A. Caractérisation cinétique et moléculaire du biomarqueur acétylcholinestérase chez l'abeille, Apis mellifera. (2007).
407. Belzunces, L. P., Tchamitchian, S. & Brunet, J.-L. Neural effects of insecticides in the honey bee. *Apidologie* **43,** 348–370 (2012).
408. Williamson, S. M., Moffat, C., Gomersall, M., Saranzewa, N., Connolly, C. & Wright, G. A. Exposure to acetylcholinesterase inhibitors alters the physiology and motor function of honeybees. *Front. Physiol.* **4,** 13 (2013).
409. Guez, D., Zhang, S.-W. & Srinivasan, M. V. Methyl parathion modifies foraging behaviour in honeybees (Apis mellifera). *Ecotoxicology* **14,** 431–437 (2005).
410. Nigg, H. N., Russ, R. V., Mahon, W. D., Stamper, J. H. & Knapp, J. L. Contamination of sucrose solution with aldicarb sulfoxide inhibits foraging by honeybees (Hymenoptera: Apidae). *J. Econ. Entomol.* **84,** 810–813 (1991).
411. Schmid-Hempel, P. Evolutionary ecology of insect immune defenses. *Annu Rev Entomol* **50,** 529–551 (2005).
412. Siva-Jothy, M. T. & Thompson, J. W. Short-term nutrient deprivation affects immune function. *Physiol. Entomol.* **27,** 206–212 (2002).
413. Rothe, U. & Nachtigall, W. Flight of the honey bee. *J. Comp. Physiol. [B]* **158,** 739–749 (1989).
414. Sokolowski, M. B. C. & Abramson, C. I. From foraging to operant conditioning: A new computer-controlled Skinner box to study free-flying nectar gathering behavior in bees. *J. Neurosci. Methods* **188,** 235–242 (2010).
415. Tomlin, C. *The pesticide manual*. (British Crop Protection Council, Surrey, UK, 1994).
416. Piechowicz, B., Grodzicki, P., Stawarczyk, M. & Stawarczyk, K. Circadian and seasonal changes in the honeybee (Apis mellifera) workers susceptibility to diazinon, teflubenzuron, pirimicarb and indoxacarb. *Pol J Env. Stud* **22,** 1457 (2013).
417. Fluri, P., Lüscher, M., Wille, H. & Gerig, L. Changes in weight of the pharyngeal gland and haemolymph titres of juvenile hormone, protein and vitellogenin in worker honey bees. *J. Insect Physiol.* **28,** 61–68 (1982).
418. Harris, J. W. & Woodring, J. Effects of stress, age, season, and source colony on levels of octopamine, dopamine and serotonin in the honey bee (Apis mellifera L.) brain. *J. Insect Physiol.* **38,** 29–35 (1992).
419. Kunert, K. & Crailsheim, K. Seasonal changes in carbohydrate, lipid and protein content in emerging worker honeybees and their mortality. *J. Apic. Res.* **27,** 13–21 (1988).
420. Shehata, S. M., Townsend, G. F. & Shuel, R. W. Seasonal physiological changes in queen and worker honeybees. *J. Apic. Res.* **20,** 69–78 (1981).
421. Smirle, M. J. & Winston, M. L. Intercolony variation in pesticide detoxification by the honey bee (Hymenoptera: Apidae). *J. Econ. Entomol.* **80,** 5–8 (1987).
422. Meled, M., Thrasyvoulou, A. & Belzunces, L. P. Seasonal variations in susceptibility of Apis mellifera to the synergistic action of prochloraz and deltamethrin. *Environ. Toxicol. Chem.* **17,** 2517–2520 (1998).
423. Wright, G. A., Mustard, J. A., Simcock, N., Ross-Taylor, A. R., McNicholas, L. D., Popescu, A. & Marion-Poll, F. Parallel reinforcement pathways for conditioned food aversions in the honeybee. *Curr. Biol.* **20,** 2234–2240 (2010).

424. Belzunces, L. P. & Colin, M. E. Differential response of Apis mellifera acetylcholinesterase towards pirimicarb. *Neuroreport* **2,** 265–268 (1991).
425. Decourtye, A., Lacassie, E. & Pham-Delègue, M.-H. Learning performances of honeybees (Apis mellifera L) are differentially affected by imidacloprid according to the season. *Pest Manag. Sci.* **59,** 269–278 (2003).
426. Rochais, C., Lecoutey, C., Gaven, F., Giannoni, P., Hamidouche, K., Hedou, D., Dubost, E., Genest, D., Yahiaoui, S., Freret, T., Bouet, V., Dauphin, F., Sopkova-de Oliveira Santos, J., Ballandonne, C., Corvaisier, S., Malzert-Fréon, A., Legay, R., Boulouard, M., Claeysen, S. & Dallemagne, P. Novel multitarget-directed ligands (MTDLs) with acetylcholinesterase (AChE) inhibitory and serotonergic subtype 4 receptor (5-HT4R) agonist activities as potential agents against Alzheimer's disease: the design of donecopride. *J. Med. Chem.* **58,** 3172–3187 (2015).
427. Cheung, J., Rudolph, M. J., Burshteyn, F., Cassidy, M. S., Gary, E. N., Love, J., Franklin, M. C. & Height, J. J. Structures of human acetylcholinesterase in complex with pharmacologically important ligands. *J. Med. Chem.* **55,** 10282–10286 (2012).
428. Consortium, U. UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res.* **45,** D158–D169 (2017).
429. Kim, Y. H., Cha, D. J., Jung, J. W., Kwon, H. W. & Lee, S. H. Molecular and kinetic properties of two acetylcholinesterases from the western honey bee, Apis mellifera. *PloS One* **7,** e48838 (2012).
430. Kim, Y. H. & Lee, S. H. Which acetylcholinesterase functions as the main catalytic enzyme in the Class Insecta? *Insect Biochem. Mol. Biol.* **43,** 47–53 (2013).
431. Dulin, F., Halm-Lemeille, M.-P., Lozano, S., Lepailleur, A., Sopkova-de Oliveira Santos, J., Rault, S. & Bureau, R. Interpretation of honeybees contact toxicity associated to acetylcholinesterase inhibitors. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **79,** 13–21 (2012).
432. Wiesner, J., Kříž, Z., Kuča, K., Jun, D. & Koča, J. Influence of the acetylcholinesterase active site protonation on omega loop and active site dynamics. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **28,** 393–403 (2010).
433. Li, H., Robertson, A. D. & Jensen, J. H. Very fast empirical prediction and rationalization of protein pKa values. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **61,** 704–721 (2005).
434. Pan, Y., Huang, N., Cho, S. & MacKerell, A. D. Consideration of molecular weight during compound selection in virtual target-based database screening. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **43,** 267–272 (2003).
435. Erlanson, D. A., Braisted, A. C., Raphael, D. R., Randal, M., Stroud, R. M., Gordon, E. . & Wells, J. . Site-directed ligand discovery. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97,** 9367–9372 (2000).
436. Bu, C., Peng, B., Cao, Y., Wang, X., Chen, Q., Li, J. & Shi, G. Novel and selective acetylcholinesterase inhibitors for Tetranychus cinnabarinus (Acari: Tetranychidae). *Insect Biochem. Mol. Biol.* **66,** 129–135 (2015).
437. Pang, Y. P., Singh, S. K., Gao, Y., Lassiter, T. L., Mishra, R. K., Zhu, K. Y. & Brimijoin, S. Selective and irreversible inhibitors of aphid acetylcholinesterases: steps toward human-safe insecticides. *PLoS One* **4,** e4349 (2009).
438. Pang, Y. P., Brimijoin, S., W Ragsdale, D., Yan Zhu, K. & Suranyi, R. Novel and viable acetylcholinesterase target site for developing effective and environmentally safe insecticides. *Curr. Drug Targets* **13,** 471–482 (2012).
439. Gillard, A. C., Rault, S., Boulouard, M. & Robba, M. Thiazolo [4, 3-c][1, 4] benzodiazepines. II. Synthesis of fused [a] triazolo, tetrazolo and oxadiazolo derivatives. *J. Heterocycl. Chem.* **33,** 275–279 (1996).
440. Niehoff, B. & Poehling, H.-M. Population dynamics of aphids and syrphid larvae in winter wheat treated with different rates of pirimicarb. *Agric. Ecosyst. Environ.* **52,** 51–55 (1995).

441. Erspamer, V. & Boretti, G. Identification and characterization, by paper chromatography, of enteramine, octopamine, tyramine, histamine and allied substances in extracts of posterior salivary glands of octopoda and in other tissue extracts of vertebrates and invertebrates. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* **88,** 296 (1951).
442. Nathanson, J. A. & Greengard, P. Octopamine-sensitive adenylate cyclase: evidence for a biological role of octopamine in nervous tissue. *Science* **180,** 308–310 (1973).
443. Roeder, T. Octopamine in invertebrates. *Prog. Neurobiol.* **59,** 533–561 (1999).
444. Farooqui, T. in *Trace Amines Neurol. Disord. Potential Mech. Risk Factors* 401 (Academic Press, 2016).
445. Burrell, B. D. & Smith, B. H. Modulation of the honey bee (Apis mellifera) sting response by octopamine. *J. Insect Physiol.* **41,** 671–680 (1995).
446. Schulz, D. J. & Robinson, G. E. Octopamine influences division of labor in honey bee colonies. *J. Comp. Physiol. A* **187,** 53–61 (2001).
447. Kolakowski J., L. F. GCRDb: a G-protein-coupled receptor database. *Receptors Channels* **2,** 1–7 (1994).
448. Bockaert, J. & Pin, J. P. Utiliser un recepteur couplé aux protéines G pour communiquer. Un succès évolutif. *Comptes Rendus Académie Sci.-Ser. III-Sci. Vie* **321,** 529–551 (1998).
449. Nygaard, R., Frimurer, T. M., Holst, B., Rosenkilde, M. M. & Schwartz, T. W. Ligand binding and micro-switches in 7TM receptor structures. *Trends Pharmacol. Sci.* **30,** 249–259 (2009).
450. Evans, P. D. & Maqueira, B. Insect octopamine receptors: a new classification scheme based on studies of cloned Drosophila G-protein coupled receptors. *Invert. Neurosci.* **5,** 111–118 (2005).
451. Hirashima, A. & Huang, H. Homology modeling, agonist binding site identification, and docking in octopamine receptor of Periplaneta americana. *Comput. Biol. Chem.* **32,** 185–190 (2008).
452. Farooqui, T. Review of octopamine in insect nervous systems. *Open Access Insect Physiol* **4,** 1–17 (2012).
453. Grohmann, L., Blenau, W., Erber, J., Ebert, P. R., Strünker, T. & Baumann, A. Molecular and functional characterization of an octopamine receptor from honeybee (Apis mellifera) brain. *J. Neurochem.* **86,** 725–735 (2003).
454. Balfanz, S., Strünker, T., Frings, S. & Baumann, A. A family of octapamine receptors that specifically induce cyclic AMP production or Ca2+ release in Drosophila melanogaster. *J. Neurochem.* **93,** 440–451 (2005).
455. Balfanz, S., Jordan, N., Langenstück, T., Breuer, J., Bergmeier, V. & Baumann, A. Molecular, pharmacological, and signaling properties of octopamine receptors from honeybee (Apis mellifera) brain. *J. Neurochem.* **129,** 284–296 (2014).
456. Blenau, W., Balfanz, S. & Baumann, A. Characterization of a Gene from Honeybee (Apis mellifera) Brain Encoding a Functional Tyramine Receptor. *J. Neurochem.* **74,** 900–908 (2000).
457. Huang, J., Ohta, H., Inoue, N., Takao, H., Kita, T., Ozoe, F. & Ozoe, Y. Molecular cloning and pharmacological characterization of a Bombyx mori tyramine receptor selectively coupled to intracellular calcium mobilization. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **39,** 842–849 (2009).
458. Maqueira, B., Chatwin, H. & Evans, P. D. Identification and characterization of a novel family of Drosophilaβ-adrenergic-like octopamine G-protein coupled receptors. *J. Neurochem.* **94,** 547–560 (2005).
459. Stone, B. F., Atkinson, P. W. & Knowles, C. O. Formamidine structure and detachment of the cattle tick Boophilus microplus. *Pestic. Biochem. Physiol.* **4,** 407–416 (1974).

460. Enan, E. Insecticidal activity of essential oils: octopaminergic sites of action. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* **130,** 325–337 (2001).
461. Blenau, W., Rademacher, E. & Baumann, A. Plant essential oils and formamidines as insecticides/acaricides: what are the molecular targets? *Apidologie* **43,** 334–347 (2012).
462. Carpenter, E. P., Beis, K., Cameron, A. D. & Iwata, S. Overcoming the challenges of membrane protein crystallography. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **18,** 581–586 (2008).
463. Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C. A., Motoshima, H., Fox, B. A., Le Trong, I., Teller, D. C., Okada, T. & Stenkamp, R. E. Crystal structure of rhodopsin: AG protein-coupled receptor. *science* **289,** 739–745 (2000).
464. Cherezov, V., Rosenbaum, D. M., Hanson, M. A., Rasmussen, S. G. F., Thian, F. S., Kobilka, T. S., Choi, H. J., Kuhn, P., Weis, W. I. & Kobilka, B. K. High-resolution crystal structure of an engineered human β2-adrenergic G protein–coupled receptor. *science* **318,** 1258–1265 (2007).
465. Shin, D. H. & Hsu, W. H. Influence of the Formamidine Pesticide Amitraz and Its Metabolites on Porcine Myometrial Contractility-Involvement of α2-Adrenoceptors and Ca2+ Channels. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **128,** 45–49 (1994).
466. M'diaye, K. & Bounias, M. Sublethal effects of the formamidine amitraz on honeybees gut lipids, following in vivo injections. *Biomed. Environ. Sci. BES* **4,** 376–383 (1991).
467. Katritch, V., Rueda, M., Lam, P. C.-H., Yeager, M. & Abagyan, R. GPCR 3D homology models for ligand screening: lessons learned from blind predictions of adenosine A2a receptor complex. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **78,** 197–211 (2010).
468. Rovati, G. ., Capra, V. & Neubig, R. R. The highly conserved DRY motif of class AG protein-coupled receptors: beyond the ground state. *Mol. Pharmacol.* **71,** 959–964 (2007).
469. Cavasotto, C. N. & Phatak, S. S. Homology modeling in drug discovery: current trends and applications. *Drug Discov. Today* **14,** 676–683 (2009).

Application de la démarche de drug-design pour la conception de nouveaux médicaments vétérinaires contre le parasite Varroa destructor (Acari : Varroidae)

Résumé : L'acarien *Varroa destructor* est l'un des principaux responsables de l'effondrement des colonies d'abeilles domestique *Apis mellifera*. L'arsenal thérapeutique disponible pour lutter contre ce parasite ubiquiste apparait insuffisant à ce jour. Dans le cadre de cette thèse, la démarche de *drug design*, généralement utilisée en santé humaine, a été appliquée pour le développement de nouveaux médicaments vétérinaire à usage varroacide.
Les travaux de cette thèse se sont focalisés sur deux cibles du système nerveux : l'acétylcholinestérase et les récepteurs à l'octopamine. Ces deux cibles ont déjà montré leur intérêt varroacide, notamment au travers des médicaments contenant du coumaphos ou de l'amitraze. Concernant l'acétylcholinestérase, un criblage fait avec le modèle 3D de l'enzyme, construit par homologie de séquences, a permis d'identifier deux composés de la chimiothèque du CERMN. Nous avons également exploré le potentiel varroacide d'acaricides de la famille des carbamates, démontrant l'intérêt du pirimicarbe comme varroacide. Concernant l'octopamine, l'étude de quatre dérivés de l'amitraze a montré l'intérêt de l'un d'entre eux. Un criblage par similarité de structure avec ce dérivé a mis en exergue une molécule issue de la chimiothèque du CERMN. Toutes les molécules pointées par ces travaux de thèse montrent de bons résultats lors de tests *in vitro* ou *in vivo*. Toutefois, afin de minimiser le risque pour l'abeille et maximiser l'efficacité anti-varroa, ces *leads* doivent être optimisés avant d'être ajouté à l'arsenal des médicaments varroacides.

Application of the drug-design approach for the design of new veterinary drugs against the parasite Varroa destructor (Acari: Varroidae)

Abstract: The mite Varroa destructor is one of the main contributors to the collapse of honey bee colonies *Apis mellifera*. The therapeutic arsenal available against this ubiquitous parasite appears insufficient to date. In this thesis, the drug design approach, generally used in human health, was applied to the development of new varroacide veterinary drugs.
The works of this thesis focused on two nervous system targets: acetylcholinesterase and octopamine receptors. These two targets have already shown their varroacide interest, especially through drugs containing coumaphos or amitraz. Regarding acetylcholinesterase, a screening made on the 3D model of the enzyme, built by sequence homology, allowed to identify two compounds from the CERMN compound library. We also explored the varroacide potential of carbamate acaricides, demonstrating the interest of pirimicarb as a varroacide. Regarding octopamine, the study of four derivatives of amitraz has shown the interest of one of them. Structural similarity screening with this derivative highlighted one hit from the CERMN compound library. All molecules pointed out by these thesis works show good results during *in vitro* or *in vivo* tests. However, to minimize the risk to honey bees and maximize their anti-varroa efficiency, these leads need to be optimized before being added to the arsenal of varroacide drugs.

Mots clés : abeille ; varroacide ; acétylcholinestérase ; récepteurs à l'octopamine ; drug design ; tests *in vivo*

Discipline : Physiologie et biologie des organismes - populations - interactions

Laboratoire : Centre d'Études et de Recherche sur le Médicament de Normandie