

Portage des pathogènes

Partie 2 - Prise en charge des colonies : protocoles, résultats

Le genre *Apis* est estimé à cent millions d'années, soit approximativement trente millions de générations au cours desquelles se sont affinés les mécanismes d'homéostasie* et les mécanismes de l'immunité. Les premiers lui ont permis d'adapter son intégrité constitutionnelle et fonctionnelle aux aléas environnementaux, en particulier climatiques. Les seconds lui ont permis de faire face aux prédateurs, aux parasites, aux agents pathogènes. Cette longue évolution s'est traduite par l'émergence progressive d'écotypes en équilibre avec leur milieu.

Depuis quelques décennies, l'homme intervient largement sur son évolution avec une sélection forcée, avec des échanges intercontinentaux sans limites et sans règles sanitaires, avec des pratiques apicoles à haut risque telles que des transhumances à grande échelle. En cinquante ans, l'espérance de vie des abeilles a diminué de 50% et la mortalité des colonies s'est installée durablement à des niveaux supérieurs à 30%.

Dans la première partie de notre témoignage, nous avons rendu compte des moyens mis en œuvre pour évaluer le rôle des agents pathogènes dans cette hécatombe. Dans la seconde partie, nous abordons les mécanismes de l'immunité de l'abeille, les composants de Bee'Full Plus qui modulent cette immunité et enfin les résultats d'une première campagne de mise en place de cet aliment complémentaire dans les ruchers.



Abeille dans l'ambre
(environ 60 millions d'années)

© D'après revue Apistoria Cahier n°6 Fascicule A

Principes généraux de l'immunité de l'abeille, *Apis mellifera*

Principes généraux de l'immunité des êtres vivants

Toutes les espèces végétales et animales se sont succédé sur notre planète, on parle d'évolution depuis 3,5 milliards d'années pour les êtres unicellulaires, et de plusieurs centaines de millions d'années pour les êtres pluricellulaires. Tous se sont maintenus par rapport aux aléas climatiques par des mécanismes que l'on nomme homéostasie, et par rapport aux agents pathogènes par des mécanismes que l'on nomme immunité.

Parmi les paramètres physiques qui caractérisent notre planète, si l'eau est restée relativement constante, l'oxygène a beaucoup évolué, passant d'une présence de 0,5% dans l'air à une présence actuelle de 20%. Cette évolution a permis l'augmentation des performances métaboliques et l'amélioration de certains mécanismes de l'immunité aussi bien chez les végétaux que chez les animaux. Ces mécanismes de l'immunité dépendant de la teneur en oxygène de l'air, soit l'**immunité innée**, constituent les mécanismes les plus anciens, les plus universels et leur efficacité détermine la réussite des mécanismes complémentaires de l'**immunité adaptative** eux-mêmes issus d'une adaptation plus précise des espèces vivantes au milieu dans lequel elles évoluent.

L'immunité innée dans les espèces vivantes se caractérise par quelques fonctions universelles :

- elle est la forme la plus ancienne et la plus éprouvée pour chaque espèce vivante : chez l'abeille, cette immunité a été validée par environ trente millions de générations d'abeilles ;
- elle est toujours présente mais elle dépend pour son efficacité des ressources botaniques et en particulier des apports en oligo-éléments et en métabolites* secondaires (**phytochemicals***) présents dans les pollens ;
- elle est très précoce et se manifeste quelques heures après l'arrivée d'un pathogène ;
- elle est très efficace mais peu sélective et présente des effets secondaires non négligeables imputables au stress oxydant infligé aux agents pathogènes.

De l'efficacité de cette immunité innée dépendent les phases complémentaires et successives de l'immunité adaptative (et sociale chez l'abeille).

Principes généraux de l'immunité de l'abeille

Ces aspects très précis de l'immunité innée sont très bien connus et analysés chez les animaux d'élevage, surtout chez les mammifères tant ils bénéficient des connaissances acquises en santé humaine. Chez les abeilles, des similitudes très fortes sont publiées mais il existe encore des lacunes autant dans l'évolution chronologique des faits que dans la mesure de leur intensité.

Avec vingt années de décalage, elle connaît, comme ce fut le cas pour l'immunité humaine, une sorte de désamour au profit de mécanismes plus complexes comme la production des anticorps pour l'immunité humaine ou pour l'ARN interférent pour l'abeille.

Nous allons aborder les principaux aspects de l'immunité innée individuelle de l'abeille : immunité de barrière, immunité cellulaire, immunité humorale.

Au cours de l'évolution, ces mécanismes ont été complétés par ceux de l'immunité sociale que nous n'aborderons pas ici : organisation du nid, usage de la propolis, comportements d'épouillage, comportements hygiéniques, essaimage, ...

- Immunité de barrière chez l'abeille

Elle est constituée à l'extérieur par la cuticule, à l'intérieur par la membrane péritrophique.

La **cuticule** s'oppose à la pénétration des agents pathogènes malgré les menaces qui pèsent sur son intégrité.

Tableau n°1 : Menaces sur l'immunité de barrière

Extérieur = Cuticule	Intérieur = Membrane péritrophique
• Usage répété d'acide oxalique (dégouttement ou sublimation) sur une génération d'abeilles à l'occasion du traitement d'été, puis de début de l'hiver et parfois pendant l'hiver. • Compression brutale d'une colonie par retrait simultané de plusieurs hausses : micro érosions de la cuticule par les poils cassés au cours du frottement → portes d'entrée des virus. • Perforation de la cuticule des nymphes et des adultes par <i>Varroa destructor</i>.	• Présence importante des Nosemas → sécrétions d'enzymes qui assurent leur pénétration dans l'épithélium intestinal. • Production massive de NO par les cellules intestinales en réaction aux agents pathogènes (nosemas, trypanosomes, virus).

Outre ses qualités de barrière mécanique, la cuticule oppose également une "barrière chimique" aux agents pathogènes. En effet, avec l'âge et en présence de ces agents, la cuticule noircit en raison des dépôts de mélanine et du processus de sclérotinisation (durcissement de la chitine).

La mélanine* est le témoin du stress oxydant* infligé aux agents pathogènes avec forte libération de phénoloxylase.

Sans relation directe avec sa fonction de barrière, la cuticule joue également le rôle d'exosquelette, le siège d'une libération d'odeurs véritable carte d'identité olfactive des abeilles et enfin par frottement avec l'air d'une production d'électricité statique utile à l'efficacité du vol et à la capture passive des grains de pollen.

Enfin, n'oublions pas que la lutte contre *Varroa destructor* permet de limiter les multiples effractions et inoculations infligées par le parasite au couvain et aux abeilles adultes.

La membrane péritrophique, deuxième type de barrière essentiellement constituée de fibres de chitine, tapisse l'intérieur du tube digestif qu'elle protège des érosions provoquées par des particules alimentaires et par divers mécanismes induits par les agents pathogènes pour assurer leur pénétration dans la muqueuse intestinale.

Outre l'action enzymatique des agents pathogènes, la membrane péritrophique subit également l'action délétère des fortes doses de monoxyde d'azote libérées par les cellules intestinales pour leur défense. Ce stress nitrosant* est modérément réduit par les polyphénols antioxydants présents dans les pollens. En limitant les populations de *Nosema* et des Trypanosomes, nous protégeons partiellement la membrane péritrophique.

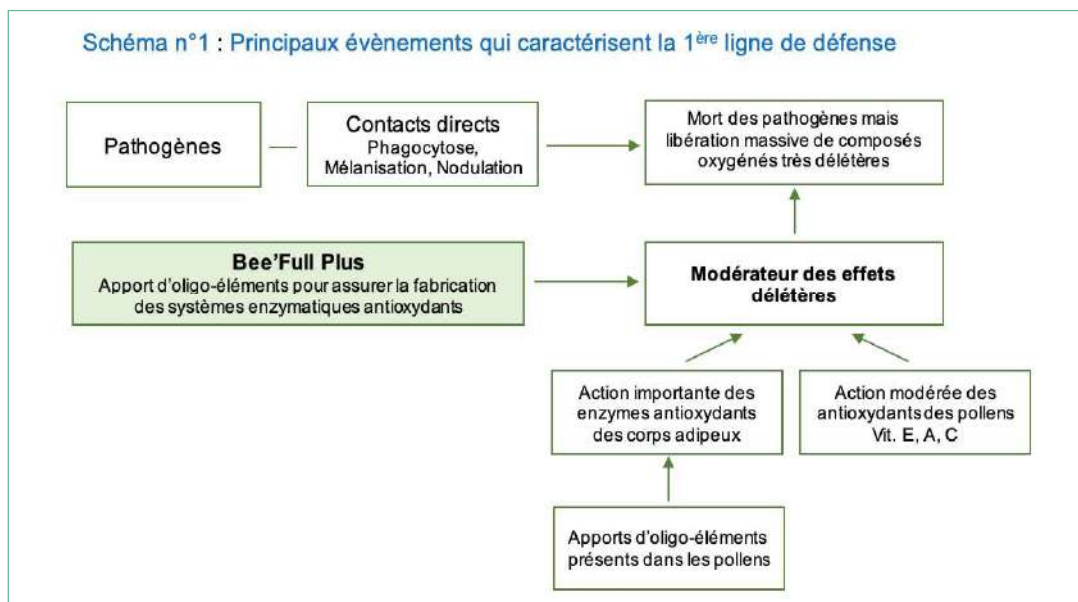
- Immunité cellulaire innée : première ligne de défense dynamique

L'immunité cellulaire innée se manifeste dans l'heure qui suit le contact avec un agent pathogène. Elle représente un mécanisme très ancien, commun à tous les êtres vivants pluricellulaires qu'ils soient végétaux, animaux ou êtres humains. Elle se caractérise toujours par le déversement sur les agents pathogènes de composés oxygénés très agressifs : oxygène singulet, anion superoxyde, radical hydroxyl, peroxyde d'hydrogène, ...

Cette immunité est très bien décrite chez les mammifères et se manifeste principalement par la phagocytose*. Chez l'abeille, elle pourrait être plus sophistiquée que chez les mammifères bien qu'une chronologie ne soit pas encore complètement acquise. Pourtant la présence de molécules oxydées, de systèmes enzymatiques antioxydants de même nature que ceux des mammifères est clairement établie... avec en prime des mécanismes spécifiques aux insectes tels que mélanisation, nodulation*, encapsulation.

Cette première ligne de défense, comme chez les mammifères, est l'objet d'un intense stress oxydant en direction des pathogènes mais aussi très délétère vis-à-vis de l'abeille.

Ces effets délétères sont pondérés par les molécules antioxydantes présentes dans les pollens (vitamines A, E, C, polyphénols) mais surtout par les systèmes enzymatiques libérés par les corps adipeux* (SOD Superoxyde dismutase ; GpX : Glutathion peroxydase. GST : Glutathion S-transferase ; CAT : catalases). Ces systèmes enzymatiques dépendent des apports des oligo-éléments par le pollen, ces derniers sont variables, le plus souvent insuffisants.

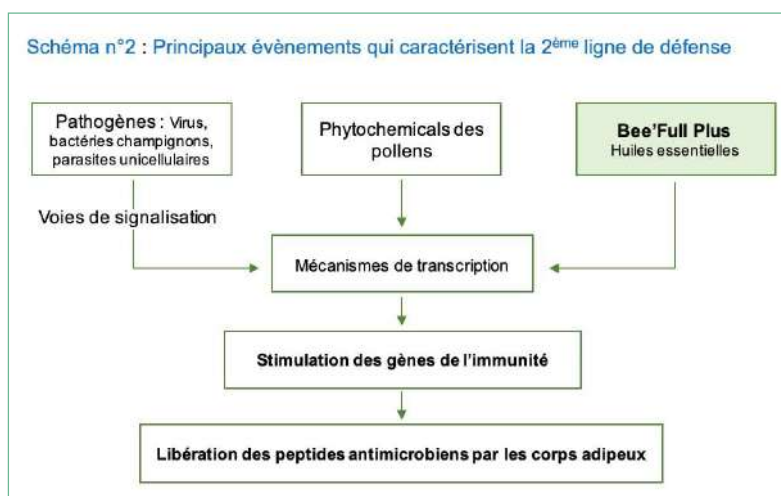


- Immunité humorale : deuxième ligne de défense

Ce mécanisme apparaît 12 à 24 heures après le contact avec les agents pathogènes et sa pleine efficacité dépend en partie de celle de la première ligne de défense.

Les agents pathogènes sont identifiés par une structure située sur leur paroi externe. Leur présence, signalée* par les Voies Toll, Imd, Jack stat, est transcrite* par le système NFκB qui entraîne la mobilisation des gènes de défense des corps adipeux.

Les corps adipeux sécrètent et libèrent des peptides antimicrobiens dont hymenoptaecine, abeacine, defensines, ... Au cours de l'évolution, ces peptides antimicrobiens* se sont adaptés pour lutter efficacement contre les bactéries, virus, champignons ou parasites internes unicellulaires. Leur production est également très stimulée par les phytochemicals (métabolites secondaires dont certains composants des huiles essentielles) présents dans les pollens. Dans un souci d'automédication, les abeilles recherchent avec assiduité les pollens riches en certains phytochemicals.



- Défense spécifique contre les virus avec l'ARN interférent

Ce mécanisme de défense connaît auprès des chercheurs un enthousiasme qui ne se dément pas aux dépens de la connaissance des premières réactions de l'hôte.

Ce mécanisme induit par l'hôte vise à neutraliser la pénétration et la multiplication d'un virus dans une cellule hôte en se substituant à l'ARN messager de cette dernière.

Chez notre ancêtre universel LUCA (*The last universal common ancestor*), ce mécanisme existe sous forme d'un régulateur de sa population que l'abeille, au cours de l'évolution, a progressivement détourné pour réguler la population des pathogènes envahisseurs.

Ce mécanisme spécifique de la lutte antivirale connaît de sérieuses limites car il demande un temps d'apprentissage relativement long pour chaque nouvelle espèce de virus et se trouve très vite saturé du fait de la présence simultanée de virus différents.

Nous ne savons pas comment intervenir sur ce mécanisme.

Composition et principes d'action de Bee'Full Plus

Lutte contre le stress oxydant

Des antioxydants présents dans les pollens tels que Vitamines A, E et C sont capables de neutraliser, "molécule contre molécule", les composés oxygénés libérés au cours du premier contact de l'abeille avec son pathogène (immunité cellulaire). Leur effet est limité et leur saturation les transforme très vite en molécules pro-oxydantes. Leur incorporation dans des aliments complémentaires présente peu d'intérêt.

Les systèmes enzymatiques antioxydants pos-

sèdent une capacité environ cinquante fois plus importante que celle des vitamines. Les SOD, GpX, GST, CAT dépendent pour leur synthèse de la présence des oligo-éléments tels que Zn, Cu, Mn, Se, Fe et dans une moindre mesure Mo.

Les quantités d'oligo-éléments dans les pollens varient avec chaque espèce végétale et, sauf situation exceptionnelle, d'une biodiversité parfaite, l'équilibre est rarement atteint pour une présence efficace des systèmes enzymatiques antioxydants.

Tableau n° 2 : Teneurs en oligo-éléments de diverses espèces végétales en ppm (Fortin et al. 1995) ppm = mg/kg

	Zn	Cu	Mn	Se	Fe
Conifères : <i>Picea abies</i>	63,7	5,1	82,1	37,4	91,5
Conifères : <i>Picea glauca</i>	117	9,8	34,3	61,4	33,7
Graminées : <i>Dactyle</i>	56,9	7,3	185,5	50,4	67
Graminées : <i>Maïs</i>	105	9,1	14,4	58,4	39,9
Salicacées : <i>Saule</i>	156	19,6	32,7	65,1	868
Bétulacées : <i>Noisetier</i>	77,2	17,5	100,2	46,7	33,9
Ombellifères	52,8	1,8	11,3	55,6	54,6
Astéracées	55,8	18,7	80,1	70,9	1870

Dans l'organisation de Bee'Full Plus, nous avons scrupuleusement respecté les équilibres des oligo-éléments entre eux et évité des apports toxiques. Ces apports sont très bien définis chez les autres animaux d'élevage et le législateur a défini très précisément les doses à ne pas dépasser pour chaque oligo-élément pour chaque espèce animale concernée.

Dans notre usage des oligo-éléments, nous appliquons un principe rarement évoqué, celui de l'hormésie*. En effet, des microdoses de certains polyphénols qui subissent une auto-oxydation permettent la formation plus rapide et plus intense des systèmes enzymatiques antioxydants. Nos observations cliniques confirment ce phénomène.

Production de peptides antimicrobiens

De nombreuses publications font état du rôle des phytochemicals sur l'activation des gènes de production et de libération des peptides antimicrobiens.

Nous nous efforçons de respecter la co-évolution des phytochemicals avec les abeilles. Ainsi nous n'utilisons que des huiles essentielles pour éviter les formes moléculaires mal orientées de certaines molécules de synthèse.

De même, nous respectons leur mission informative stricte pour éviter le risque de toxicité sur les abeilles. En effet, leur action directe sur les pathogènes mesurée *in vitro* (au laboratoire) s'avère très toxique dans leurs usages *in vivo* (sur les colonies), d'où la nécessité de respecter les équilibres et les concentrations présentes dans les végétaux.

Outre leur action sur la sécrétion des peptides antimicrobiens, les phytochemicals pourraient modifier le microbiote intestinal et, en stimulant la présence de germes symbiotiques*, faciliter l'expulsion de certains parasites intestinaux tels que les *Nosemas*, *Lotmaria passim* et *Crithidia mellificae*.

Protocoles d'utilisation de Bee'Full Plus et résultats sur le terrain

Bee'Full Plus n'a pas d'action curative dirigée contre des cibles diverses. Il s'agit d'un aliment complémentaire polyvalent de régulation et non de stimulation du système immunitaire inné de l'abeille. Du fait de l'aide qu'elle reçoit, l'abeille utilise le mécanisme le plus adapté à sa défense pour lutter contre la cible bactérienne, virale ou parasitaire.

Quelle que soit la nature de l'agent pathogène, nous proposons un aliment complémentaire unique dont nous devons définir avec précision les quantités apportées à chaque distribution et son nombre, dictées par l'évaluation de la réactivité du système immunitaire. Chaque rucher est un cas particulier caractérisé par les résultats de l'analyse PathoBee et les commémoratifs fournis par l'apiculteur.

Contrairement à la posologie d'un médicament, la distribution de Bee'Full Plus s'inspire d'une évaluation du risque, d'une anomalie de santé possible mais pas encore effective, de mortalités récurrentes mais pas encore constatées, d'événements à causes multiples que l'on pourrait qualifier de syndromes plutôt que de maladies.

Bee'Full Plus n'est en aucun cas l'application d'une recette aléatoire, d'où la nécessité de l'analyse PathoBee préalable avant toute complémentation.

Protocole validé sur la mortalité hivernale

Bee'Full Plus est incorporé à un sirop de stimulation 50/50 à raison de 8 à 12 millilitres par litre. 250 ml de cette solution sont distribués toutes les 48 heures, 4 à 6 fois. La quantité totale de Bee'Full Plus distribuée varie donc considérablement, raison pour laquelle nous insistons sur la nécessité de réaliser une analyse préalable afin de calibrer au mieux la première intervention sur le rucher.

Sur une centaine d'interventions, nous constatons la régression de la mortalité, quel que soit son taux de l'année précédente, jusqu'à un seuil inférieur à 5% dans plus de 90% des ruchers. Le suivi analytique montre une très forte régression des variétés et des populations des agents pathogènes. *Nosema ceranae* est le plus rebelle des pathogènes, surtout lorsqu'il est associé à BQCV et *Lotmaria passim*.

À l'efficacité de ce protocole automnal peut s'ajouter la régression éventuelle de certains virus saisonniers et des taux élevés de vitellogénine si l'alimentation a été abondante et adaptée. Les apiculteurs témoignent systématiquement d'un fort développement de la grappe hivernale en accord avec la régression analytique des pathogènes.

Cependant, ce protocole reste chronophage et pour faciliter sa mise en place, deux autres propositions sont en cours de validation :

- Protocole de fin d'été : 12 ml/litre de Bee'Full Plus par litre de sirop de stimulation 50/50, distribution 1 fois par semaine de 2 litres de cette solution, 3 semaines consécutives.
- Protocole au cours de l'automne : 3 ml de Bee'Full Plus par litre de sirop de stockage 75/25 pour des apports de 10 à 30 litres de cette solution afin d'assurer la sécurité alimentaire hivernale.

En cas d'analyses tardives ou d'insuffisance de réserve en pollen, nous proposons un candi protéiné enrichi en Bee'Full Plus.

Protocole mis en place au printemps

À cette période de forte explosion des populations virales, les contrôles analytiques révèlent des recontaminations fréquentes liées à la fréquentation élevée des mêmes aires de butinage, au phénomène de dérive et à la vulnérabilité accrue des colonies à forte population.

En revanche, après la mise en place du protocole Bee'Full Plus, les remarques des apiculteurs convergent : couvains abondants et homogènes, très forte activité des colonies.

Dans les effectifs ayant fait l'objet d'une complémentation régulière de Bee'full Plus, il nous est également rapporté une baisse significative des chutes naturelles de Varroa. Ce constat pourrait être imputé à l'apport des oligo-éléments dans la lutte contre le stress oxydant engendré par les ponctions répétées de *Varroa destructor* qui désorganisent la lutte des corps adipeux contre le stress oxydant. Ce constat n'affranchit en aucun cas les apiculteurs des traitements antivarroas.

Le protocole de printemps est destiné à diminuer la pression des agents pathogènes afin d'éviter une surmortalité ("non vaeleurs") et permettre d'accélérer le développement des colonies.

- Protocole de printemps : 8 ml de Bee'Full Plus par litre de sirop de stimulation 50/50, distribuer 250 ml de cette solution toutes les 48 heures, au total 5 passages et si risque d'essaimage sur des colonies déjà sur 5 à 6 cadres, réduire à 3 passages.

- Protocole entre deux miellées : Après des transhumances à risques en particulier sur les lavandes, il est possible d'appliquer 1 ou 2 passages de la solution indiquée ci-dessus.

La pose des hausses pour la miellée suivante doit impérativement s'effectuer plus d'une semaine après la dernière distribution afin d'éviter toute adultération du miel.





Protocole destiné à l'élevage

Les analyses pratiquées chez les producteurs de reines ou d'essaims révèlent une présence élevée de virus transmis par voie verticale, donc par des reines contaminées. Le protocole de "décontamination" des colonies donneuses de larves, de mâles et les éleveuses nous laisse entrevoir un résultat encourageant sur la production des reines. La production d'essaims demande un contrôle plus large des colonies qui fournissent les paquets d'abeilles et souvent le suivi de plusieurs ruchers et de nombreuses colonies. La forte pollution intracellulaire exercée par les virus apporte de toute évidence une gêne à l'expression des caractères retenus pour la sélection. Il est difficile de progresser en sélection en conservant d'importantes populations de virus.

Protocoles destinés aux effectifs expérimentaux

Le bon sens voudrait que nous rappelions la nécessité de travailler avec des effectifs expérimentaux "*Pathogen free*", ce qui est rarement signalé dans les publications et qui pourraient expliquer les divergences de résultats sur les mêmes sujets.

La réduction de la mortalité, d'abord hivernale mais aussi annuelle des colonies est l'affaire de tous : apiculteurs, chercheurs, spécialistes apicoles.

Nous avons remis en question tous les dogmes qui définissaient jusqu'alors la santé de l'abeille et les moyens de l'accompagner. Les résultats sont au rendez-vous et de nombreux essais sont nécessaires pour améliorer les protocoles issus d'une approche clinique des mortalités.

Notre statut de "Lauréat France 2030" nous ouvre de nouvelles possibilités de travaux auxquels nous souhaitons associer les spécialistes de la recherche, de la formation et de la diffusion des techniques apicoles. L'évaluation d'une situation par la pratique d'analyses et le recueil de commémoratifs, suivis de la proposition raisonnée d'un protocole de complémentation resteront la règle de notre méthode.

Vous pouvez adresser vos remarques, poser vos questions ou demander des références bibliographiques à l'adresse suivante : methode-pepss@orange.fr ●

Glossaire

Corps adipeux : Chez l'abeille, ensemble de tissus d'organisation et de composition complexes situés principalement dans l'abdomen, assurant une multitude de fonctions : réserves énergétiques, immunité, détoxification, sécrétion et libération de la vitellogénine.

Germes symbiotiques : Germes favorables à opposer à germes pathogènes.

Homéostasie : Processus physiologique permettant le maintien constant du milieu intérieur de l'organisme afin d'en assurer le bon fonctionnement.

Hormésie : Phénomène physiologique qui à partir d'un petit stress oxydant prépare l'organisme à résister à un fort stress oxydant.

Mélanine : Chez l'abeille, pigment noir qui apparaît dans la cuticule à la suite de la pénétration de certains agents pathogènes.

Métabolite : Composé organique issu de la construction ou de la dégradation des constituants du vivant.

Nodulation : Action de neutralisation d'un agent pathogène par plusieurs cellules de défense qui l'entourent.

Peptide antimicrobien : Molécule sécrétée par les corps adipeux pour neutraliser bactéries, virus, champignons et parasites internes monocellulaires.

Phagocytose : Action de neutralisation d'un agent pathogène par une cellule de défense qui l'englobe.

Phytochemicals : Éléments chimiques présents naturellement dans les plantes, exemple phénol tel que le thymol, les polyphénols, ...

Signalée, Voie de signalisation : Mécanismes par lesquels la présence d'un pathogène est signalée à une cellule pour déclencher sa réaction.

Stress nitrosant : Stress oxydant infligé aux cellules intestinales par le monoxyde d'azote.

Stress oxydant : Dégâts infligés aux cellules par des molécules agressives contenant de l'oxygène.

Transcrite, Mécanisme de transcription NFκB : Mécanisme qui transmet le message signalé aux gènes pour activer leur réaction.