

Seconde Partie : Étude expérimentale

1. Introduction

Varroa destructor (Acari : Varroidae), nouvel ectoparasite sur *Apis mellifera*, sévit sous forme d'épizootie. La plupart des colonies meurent en l'espace de 3 ans si aucune mesure n'est prise. La gravité de la parasitose est due au fait que l'acarien parasite à la fois les abeilles adultes, mais également le couvain sur lequel il effectue sa reproduction.

La femelle *V. destructor* est fécondée une seule fois au cours de sa vie dans l'alvéole operculée où elle est née. La fécondation se déroule dans le cas d'une mono-infestation entre un frère et ses sœurs juste après la mue imaginale. Plusieurs accouplements se succèdent dans l'alvéole au niveau du 'site d'accumulation fécale'. Le mâle change de partenaire environ toutes les 30 heures dès qu'une nouvelle femelle achève sa mue imaginale (Donzé *et al.*, 1996 ; Martin, 1994 ; Martin, 1995b).

Lors de l'accouplement, les pro-spermatozoïdes de forme ovoïde (diamètre 40 µm) contenus dans un spermatophore sont déposés par le mâle à l'aide de ses chélicères aux deux pores d'entrée des voies génitales femelles. Au bout de 2 jours, les spermatozoïdes arrivent dans la spermathèque et prennent peu à peu leur forme définitive en ruban de 180 à 230 µm de long (Donzé *et al.*, 1996).

Le potentiel reproducteur d'une femelle dépendrait du nombre de spermatozoïdes contenus dans la spermathèque. Ce nombre augmenterait avec la fréquence des réaccouplements (Donzé *et al.*, 1996).

La vie de la femelle *V. destructor* est constituée d'une succession de cycles de reproduction (1,5 à 3 en moyenne en condition naturelle) (Fries et Rosenkranz, 1996 ; Martin et Kemp, 1997). Un cycle de reproduction comporte 2 phases : une phase de phorésie, de durée variable et obligatoire pour les jeunes femelles nullipares (5 à 14 jours) (Akimov *et al.*, 1988), ainsi qu'une phase de reproduction de durée imposée par les particularités de la reproduction de son hôte. La phase de reproduction débute juste avant l'operculation de la cellule et se poursuit pendant 270 à 280 heures dans le couvain d'ouvrières et 330 à 360 heures dans le couvain de faux-bourçons (Donzé et Guérin, 1994 ; Martin, 1994 ; Martin, 1995b).

La femelle *V. destructor* qui va initier une phase de reproduction et engendrer une descendance, appelée femelle fondatrice, a une espérance de vie estimée à 2,5 à 3,5 mois pendant la belle saison (Calatayud et Verdu, 1994 ; De Ruijter, 1987).

Les œufs sont pondus uniquement par des fondatrices fécondées dans les alvéoles operculées de couvain d'ouvrières (un total de 5 œufs, rarement 6) et de faux-bourçons (6 œufs, rarement 7), à un rythme d'un œuf toutes les 30 heures. Le premier œuf pondu lors d'un cycle de reproduction engendre un mâle, les suivants des femelles (Martin 1994 ; Martin 1995b). La reproduction de l'acarien est qualifiée d'arrhénotoque ou de pseudo-arrhénotoque suivant les auteurs (Akimov *et al.*, 1986b, 1988 ; Martin *et al.*, 1997). Une fondatrice pourrait pondre une trentaine d'œufs au cours de sa vie (Akimov et Yastrebtsov, 1984 ; Alberti et Hänel, 1986 ; De Ruijter, 1987).

La durée de l'ontogenèse du parasite dans une alvéole operculée est de 144 à 156 heures pour les mâles (haploïdes), et de 116 à 143 heures pour les femelles (diploïdes) (Donzé et Guérin, 1994 ; Martin, 1994 ; Martin, 1995b). Les femelles n'ayant pas atteint l'âge adulte avant l'émergence de la jeune abeille sont vouées à mourir.

Plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer les cas d'infertilité (Akimov *et al.*, 1988 ; Harris et Harbo, 1999): la première est liée à une absence ou un épuisement d'un type de gamète (spermatozoïdes ou ovocytes). La seconde hypothèse consiste en une infertilité de type transitoire (Fries et Rosenkranz, 1996 ; Fuchs, 1994 ; Garrido et Rosenkranz, 2003 ; Kirrane *et al.*, 2011 ; Rosenkranz *et al.*, 2009).

Peu d'informations sont disponibles sur le contenu en spermatozoïdes des spermathèques des femelles *V. destructor*. Les rares études réalisées sur le sujet présentent des résultats issus d'échantillons réduits. La connaissance de la charge spermathécale en spermatozoïdes est toutefois fondamentale pour caractériser à la fois le potentiel reproducteur des femelles *V. destructor*, pour vérifier que cette charge spermathécale initiale ne constitue pas le facteur limitant la reproduction du parasite et pour comprendre les cas d'infertilité.

Le travail de recherche présenté ici, a été réalisé au Laboratoire de Pathovigilance et de Développement Apicole de Montpellier. À partir d'un nombre représentatif de dissections de spermathèques provenant de femelles adultes phorétiques et de femelles adultes prélevées à l'intérieur d'alvéoles de couvain de faux-bourçons operculées, nous avons déterminé le stock initial en spermatozoïdes contenu dans la spermathèque, puis tenté de comprendre les modalités de leur utilisation au cours des cycles de reproduction successifs. La charge spermathécale est-elle dépendante de la saison et du statut physiologique de l'hôte, explique-t-elle les cas d'infertilité observés ? Les perspectives de recherches complémentaires sur la reproduction de cet acarien dans une optique de gestion du parasitisme sont présentées.

2. Matériels et méthodes

2.1. Matériel biologique : *Varroa destructor*

2.1.1. Source

Cinq colonies du rucher d'étude du Laboratoire de Pathovigilance et de Développement Apicole de Montpellier, non traitées contre *V. destructor* depuis au moins 3 années, vont servir comme source de parasites.

2.1.2. Collecte des *Varroa destructor*

2.1.2.1. Femelles adultes phorétiques

Les abeilles adultes sont prélevées directement sur les cadres de couvain. Les récipients fermés de façon non hermétique contenant les abeilles sont placés, en laboratoire, sous atmosphère chargée en CO₂ pendant 2 minutes puis à -22°C pendant 10 minutes. Ce procédé permet l'anesthésie des abeilles et des éventuels acariens phorétiques présents (femelles adultes). Les abeilles sont ensuite sacrifiées par écrasement du thorax. Les parasites sont récupérés en examinant les abeilles une à une à la recherche d'acariens phorétiques. Les acariens recueillis sont placés en attente dans une étuve (température 34°C) avec une source de nourriture (abeille adulte).

Les prélèvements ont été réalisés à quatre périodes de l'année : octobre, décembre, mars et juillet. Pour chaque période, nous avons récupéré assez d'abeilles parasitées pour la réussite d'au moins 30 dissections d'acariens ¹.

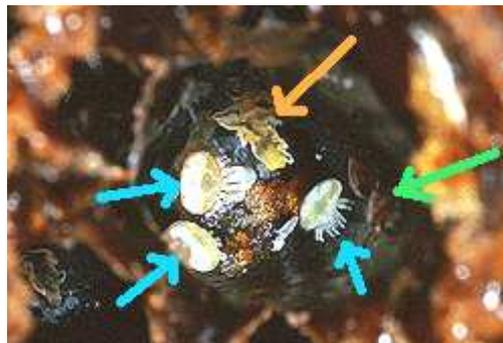
2.1.2.2. Femelles adultes recueillies à l'intérieur d'alvéoles operculées du couvain de faux-bourçons.

Du couvain operculé de faux-bourçons est prélevé à l'intérieur des ruches. Les alvéoles sont alors ouvertes une à une sous loupe binoculaire. Les nymphes ou imagos d'abeilles sont extraits soigneusement des alvéoles. Le stade larvaire operculé ne sera pas utilisé. Le stade de développement du couvain d'abeilles est alors déterminé d'après les critères morphologiques et colorimétriques présentés par Martin (1995) (Figure 59b). Quand la recherche est positive (Figure 96), le nombre d'acariens adultes est noté (femelles et mâles), le nombre de descendants immatures est déterminé ².

Une présentation plus précise de la méthodologie, ainsi qu'un extrait du tableau de recueil des résultats est placé en annexe (annexe 3).

Figure 96 : Vue de l'intérieur d'une alvéole de couvain infestée après le retrait de la nymphe d'abeille qu'elle contenait (Scott, 2003, image adaptée).

On distingue les descendants (cuticule claire) au fond de l'alvéole (flèches bleues). On devine une ou deux fondatrices sur la paroi droite de l'alvéole (flèche verte). Sur la paroi du haut, d'aspect jaunâtre, on aperçoit la zone d'accumulation fécale (flèche orange).



La couleur de la cuticule est relevée pour les femelles adultes. Elles sont classées en deux modalités : claires ou foncées (Figure 24). Les formes intermédiaires ne seront pas utilisées dans l'exploitation des résultats utilisant le paramètre colorimétrique.

¹En octobre, le prélèvement de 1040 abeilles a été réalisé, ce qui a permis la découverte de 121 acariens phorétiques (taux d'infestation de 12,6 %). Ces acariens ont servi à la fois à l'apprentissage de la technique de dissection, mais également à la réussite de 32 dissections.

En décembre, le prélèvement de 362 abeilles a été réalisé, ce qui a permis la découverte de 160 acariens (taux d'infestation de 44,2 %). Parmi ces acariens, 85 ont été nécessaires pour la réussite de 30 dissections.

En mars, le prélèvement de 258 abeilles a été réalisé, ce qui a permis la découverte de 66 acariens (taux d'infestation de 25,6 %). Ces acariens ont permis la réussite de 30 dissections.

En juillet, le prélèvement de 935 abeilles a été réalisé, ce qui a permis la découverte de 56 acariens (taux d'infestation de 6,0 %). Ces acariens ont permis la réussite de 30 dissections.

² Six cents quatre vingt alvéoles de faux-bourçons ont été examinées, ce qui a permis la découverte de 57 alvéoles parasitées. Ainsi, le taux d'infestation moyen du couvain de faux-bourçons analysé est de 8,4 %.

2.2. Protocole de dissection

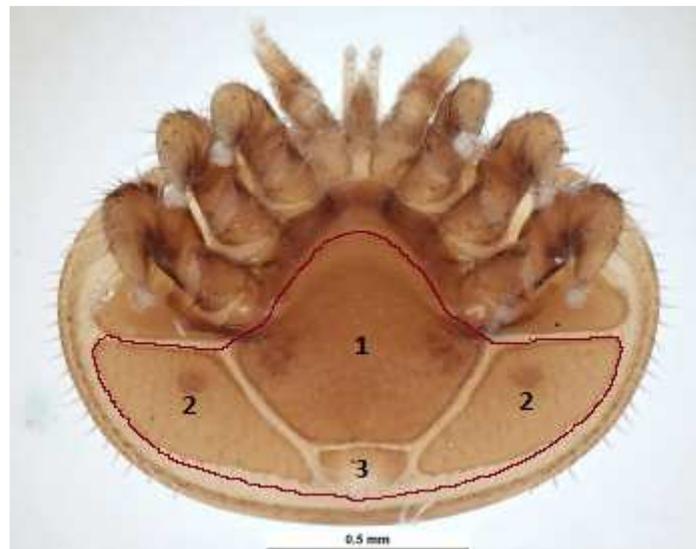
Les femelles *V. destructor* adultes collectées sont anesthésiées par le froid (-22°C) pendant 5 minutes. Elles sont ensuite fixées sur leur face dorsale par de la colle (Super glue-3 ND) et immergées dans une solution tampon de PBS. Une attente d'une demi-heure est nécessaire pour la prise complète de la colle.

La dissection est réalisée sous loupe binoculaire à un grossissement de x 50.

La dissection débute, par le retrait du scutum génito-ventral et se poursuit par le retrait des deux scuta métapodaux postérieurs et du scutum anal à l'aide d'une pince fine (Figure 97).

Figure 97 : Principe de dissection des structures externes de la femelle *V. destructor* (marqueur = 0,5 mm) (Pest and Diseases Image Library, image adaptée).

La dissection est effectuée par la face ventrale d'une femelle adulte *V. destructor*. Lors de cette opération, le retrait des structures délimitées par un trait rouge est réalisé : 1. scutum génito-ventral, 2. scuta métapodaux postérieurs, 3. scutum anal.

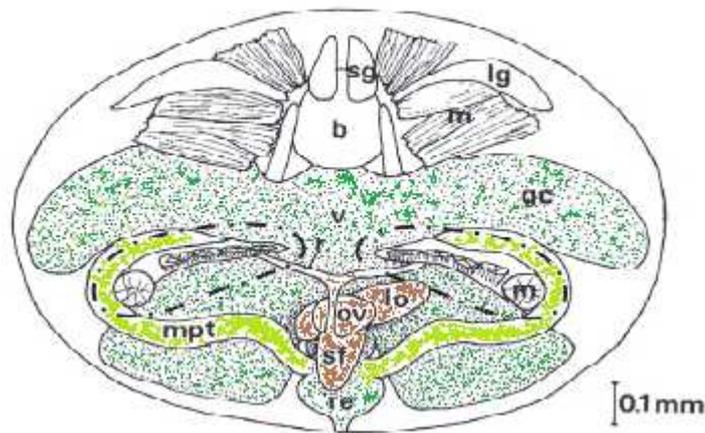


La dissection se poursuit par le retrait des lobes gastro-caecaux, du rectum, ainsi que des tubules de Malpighi (Figure 98).

Figure 98 : Principe de dissection des structures internes de la femelle *V. destructor* (Charrière et Imdorf, 2002, figure adaptée).

Dans un premier temps, les lobes gastro-caecaux (vert foncé), ainsi que les tubules de Malpighi (vert clair) sont retirés afin de faciliter la visualisation de la spermathèque. Dans un second temps, les organes reproducteurs (ovaire, spermathèque, organes lyriformes) sont précautionneusement retirés en masse, puis sont placés dans une goutte d'un mélange de glycérol et de fuchsine.

(m = muscles, gc = lobes gastro-caecaux, lg = glande latérale, b = cerveau, lo = organes lyriformes, mpt = tubules de Malpighi, ov = ovaire, r = ramus, re = rectum, sf = spermathèque, sg = glandes salivaires, v = ventricule).



À l'issue de cette opération, la visualisation des organes reproducteurs devient possible. La spermathèque et les organes lyriformes apparaissent comme 3 poches translucides (diamètre de la spermathèque dans sa plus grande longueur : 210 μm (Akimov *et al.*, 1988)). Ces organes reproducteurs sont alors prélevés à l'aide d'une pince fine et sont placés entre lame et lamelle dans une solution d'un mélange 1 : 1 de glycérol et de fuchsine (Guillet, 2008).

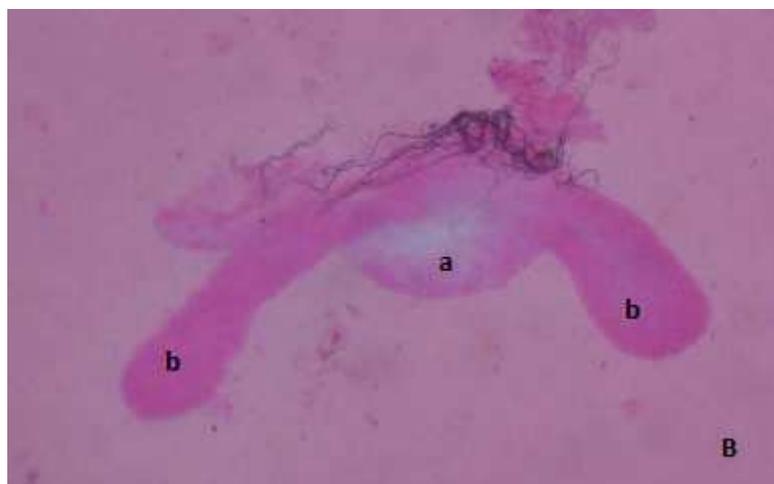
La spermathèque est visualisée aux grossissements x100 et x400 (Figure 99). Si cette spermathèque n'est pas ouverte, une légère rotation de la lamelle est réalisée, ce qui suffit généralement à libérer les spermatozoïdes et permettre le comptage.

Figure 99 : Appareils reproducteurs femelle placés entre lames et lamelles (G. x 400) (Photos personnelles).

(a = spermathèque, b = organes lyriformes)

A : La spermathèque est remplie de spermatozoïdes matures. Elle a été ouverte afin de permettre leur libération et faciliter le comptage.

B : La spermathèque est vide.



Seules sont conservées pour le comptage les lames présentant des spermatozoïdes visibles, en bon état et non éparpillés. Les cas où la spermathèque apparaît vide sont relevés.

Lors de chaque dissection, on relève la forme des spermatozoïdes. Soit ils prennent leur forme immature : ronds, en forme de poire ou de rubans courts (pro-spermatozoïdes) (Figure 100 et Figure 101), soit ils prennent leur forme mature en rubans longs (Figure 99A et Figure 102).

Figure 100 : Contenu spermathécal de type immature (G. x 100) (photo personnelle).

Cette spermathèque (diamètre 210 μm) est celle d'une jeune femelle *V. destructor* possédant une cuticule claire. Cette spermathèque n'a pas été ouverte à ce stade et contient des spermatozoïdes immatures (Figure 101) de 40 μm de diamètre.

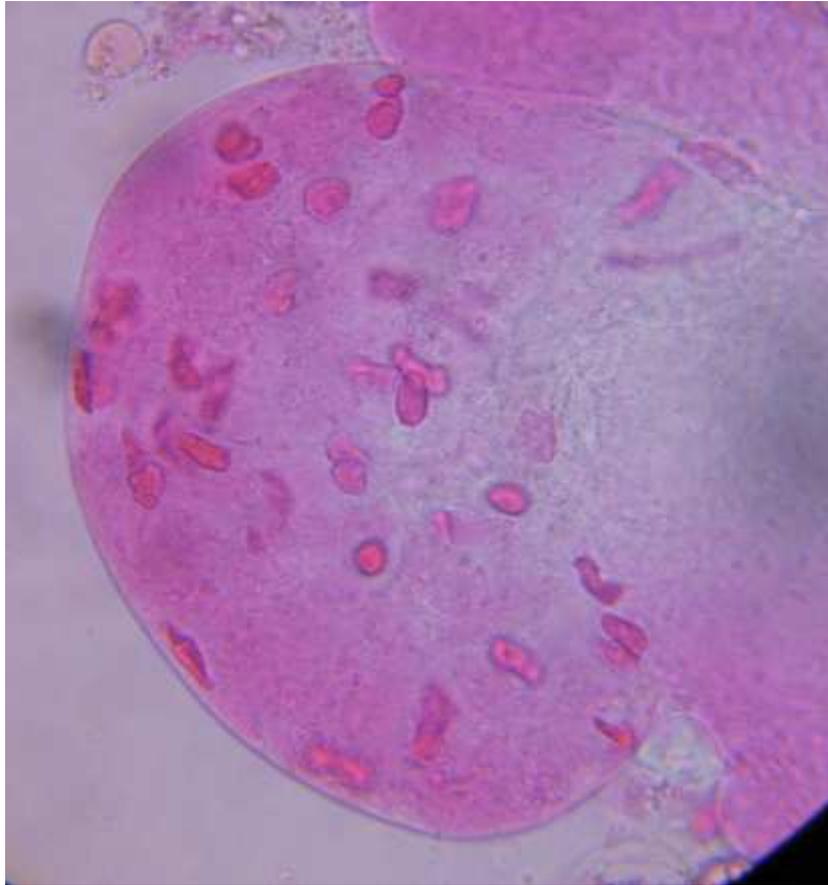


Figure 101 : Pro-spermatozoïdes à différents stades de maturation (G. x 400) (Photos personnelles).

A : Le pro-spermatozoïde (diamètre 40 μm) présente en son centre un noyau rond entouré d'un cytoplasme plus clair.

B et C : La forme des pro-spermatozoïdes évolue sous l'effet de l'allongement progressif du noyau. Ils prennent tout d'abord une forme de poire puis petit à petit leur forme définitive de spermatozoïdes matures en ruban.

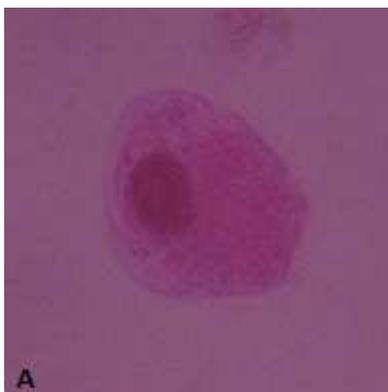


Figure 102 : Spermatozoïdes matures (Guillet, communication personnelle).

Les spermatozoïdes prennent une forme en ruban d'une longueur de 170 à 230 μm . Ces spermatozoïdes apparaissent immobiles. Ils sont constitués d'un noyau allongé entouré d'un fin cytoplasme.



2.3. Analyses statistiques

À partir des résultats de comptages de spermatozoïdes issus des différentes catégories d'acariens, le logiciel 'SigmaStat for Windows Version 2.03' permet l'exploitation statistique des résultats par l'utilisation du t-test, du test ANOVA, et du test de Mann-Whitney (Scherrer, 1984).

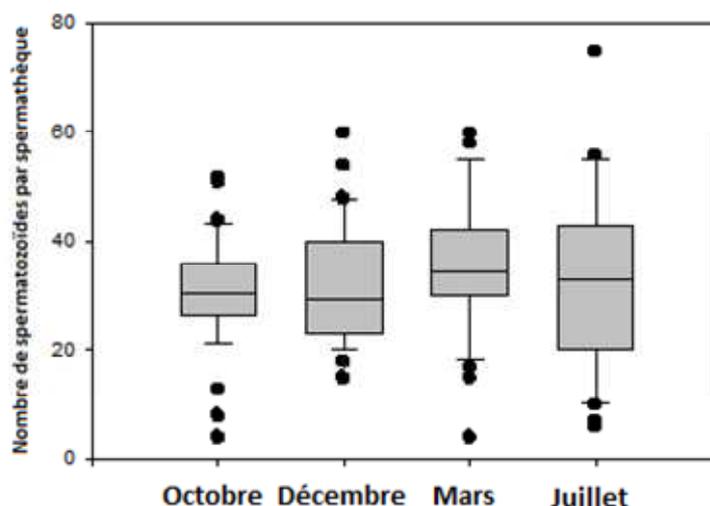
3. Résultats

3.1. Numération des spermatozoïdes contenus dans les spermathèques de femelles phorétiques à quatre périodes de l'année

L'analyse des résultats avec le test ANOVA ($df = 3$, $F = 0,538$, $P = 0,657$) montre qu'il n'existe pas de différence statistique concernant la charge en spermatozoïdes au cours des quatre périodes étudiées.

Le contenu spermathéal moyen est de 31,0 spermatozoïdes en octobre ($n = 32$), 31,7 spermatozoïdes en décembre ($n = 30$), 35,0 spermatozoïdes en mars ($n = 30$) et 32,3 spermatozoïdes en juillet ($n = 28$).

Figure 103 : Contenu spermathéal en spermatozoïdes de femelles phorétiques à différentes périodes de l'année.



3.2. Relation entre phorésie et contenu spermathéal

Lors de la dissection de femelles phorétiques ($n = 28$) dont la spermathèque était remplie de spermatozoïdes, 7,2 % présentaient des spermatozoïdes de type immature. Les femelles restantes possédaient toutes des spermatozoïdes exclusivement matures.

3.3. Relation entre couleur cuticulaire et type de spermatozoïdes chez les femelles fondatrices

Les femelles fondatrices sont des femelles initiant une phase de reproduction et engendrant une descendance lors de celle-ci. Afin d'être certain d'étudier des fondatrices, nous observons des femelles adultes présentes dans les alvéoles de couvain de faux-bourçons durant le stade nymphal avant l'apparition de nymphes aux yeux pourpres (Figure 59b). A ce stade, les descendantes filles n'ont pas encore atteint l'âge adulte.

Ainsi, toutes les femelles étudiées possèdent une cuticule foncée ($n = 9$). De plus, toutes ces femelles possèdent dans leur spermathèque des spermatozoïdes exclusivement de type mature.

3.4. Relation entre couleur cuticulaire et type de contenu spermathéal chez des femelles adultes du couvain operculé

Quatre vingt quinze pour cent des femelles adultes à cuticule claire ont un contenu spermathéal de type immature (rond, en forme de poire ou en forme de rubans courts (Figure 101)) ($n = 20$).

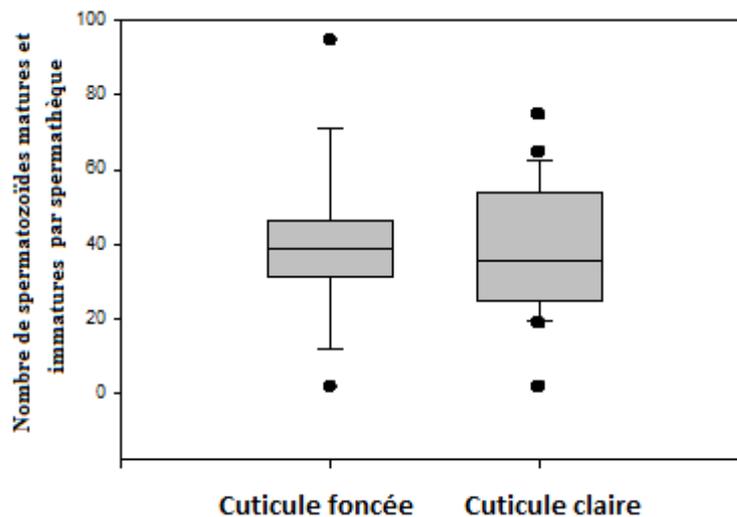
Vingt neuf pour cent des femelles à cuticule foncée prélevées dans le couvain operculé de faux-bourçons possèdent des spermatozoïdes de type immature ($n = 42$).

3.5. Numération globale des spermatozoïdes matures et immatures chez des femelles à cuticule foncée ou claire.

L'analyse des résultats avec le t-test ($t = 0,233$; $P = 0,817$) montre qu'il n'existe pas de différence statistique concernant la charge spermathéciale en spermatozoïdes pour les deux populations étudiées.

Le contenu spermathécial moyen est de 40,4 pour les femelles adultes possédant un contenu spermathécial immature et une cuticule claire ($n = 18$), elle est de 38,7 pour les femelles adultes possédant un contenu spermathécial immature et une cuticule foncée ($n = 13$).

Figure 104 : Comparaison du contenu spermathécial de femelles adultes possédant des spermatozoïdes immatures suivant que leur couleur cuticulaire est foncée ou claire.



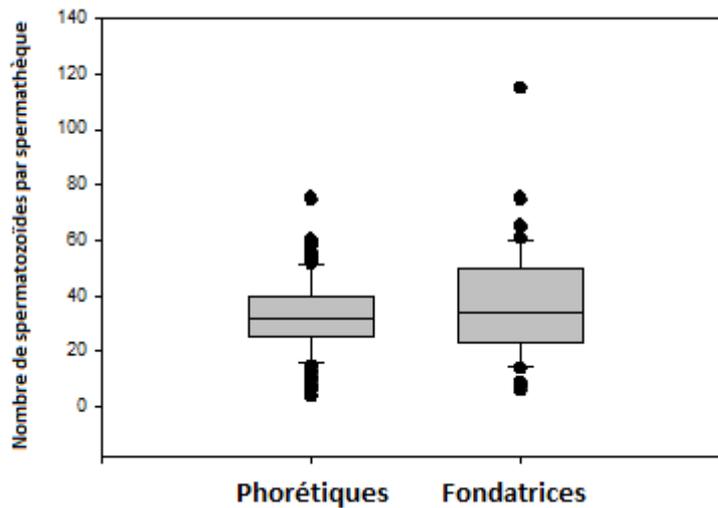
3.6. Numération des spermatozoïdes chez les femelles phorétiques et fondatrices en phase de reproduction

Est considérée comme <<fondatrice>> dans la suite de ce travail toutes les femelles possédant les caractéristiques présentées en partie 4.3. de la discussion.

L'analyse des résultats avec le test de Mann-Whitney ($U = 3875$; $P = 0,364$) montre qu'il n'existe pas de différence statistique concernant la charge en spermatozoïdes pour les deux populations étudiées.

Le contenu spermathécial moyen est de 32,3 spermatozoïdes pour l'ensemble des femelles phorétiques disséquées ($n = 120$) ; il est de 36,9 spermatozoïdes pour les fondatrices ($n = 44$).

Figure 105 : Comparaison du contenu spermathécal en spermatozoïdes de femelles phorétiques et de femelles fondatrices en phase de reproduction.

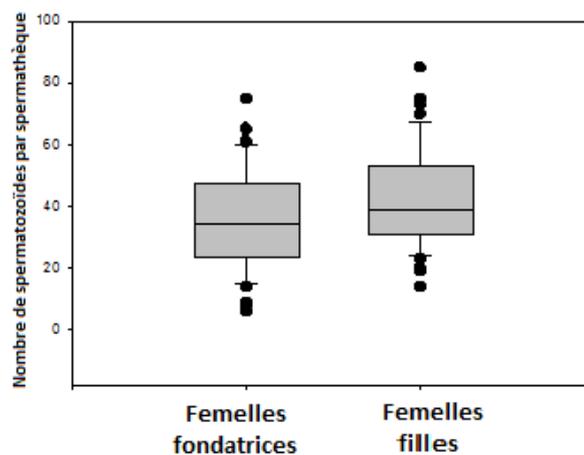


3.7. Comparaison du nombre de spermatozoïdes chez les femelles fondatrices ayant effectué leur ponte et les femelles-filles adultes.

Les fondatrices étudiées sont les fondatrices ayant achevé leur ponte du cycle de reproduction en cours. Pour cela, les fondatrices sont prélevées à partir du stade nymphal au thorax jaune (Figure 59b).

L'analyse des résultats avec le t-test ($t = 2,229$; $P = 0,029$) montre qu'il existe une différence statistique concernant la charge en spermatozoïdes pour les deux populations étudiées. Le contenu spermathécal moyen est de 44,3 pour les femelles adultes filles ($n = 42$), il est de 34,4 pour les femelles fondatrices ($n = 30$).

Figure 106 : Comparaison du contenu spermathécal de femelles fondatrices ayant effectué au moins un cycle de ponte et de femelles-filles adultes.



3.8. Proportion de spermathèques vides

On observe que 14 des 64 femelles-filles étudiées, soit 21,9 %, ne possèdent pas de spermatozoïdes dans leur spermathèque. L'absence de spermatozoïdes est associée à une absence de mâle dans l'alvéole pour 11 de ces femelles-filles, 2 des 3 femelles-filles restantes proviennent de cellules multi-infestées. On constate l'absence de descendant mâle vivant dans 17,6 % des alvéoles parasitées contenant une descendance femelle adulte (n = 34).

On observe que 7 des 49 femelles (14,3 %) entrées dans une alvéole et recueillies à un stade du couvain d'abeilles postérieur à 'nymphe aux yeux blancs' (Figure 59b) n'ont pas de descendance. Parmi elles, 2 n'ont pas de spermatozoïdes dans leur spermathèque.

Deux femelles phorétiques sur les 30 disséquées au mois de juillet avaient une spermathèque vide, soit 6,7 % des femelles phorétiques.

4. Discussion

4.1. Contenu spermathéal moyen et maximum

Le contenu spermathéal moyen des femelles *V. destructor* est compris entre 31 et 45 spermatozoïdes pour les différentes populations d'acariens étudiées dans notre étude. Il est difficile d'établir une comparaison avec les études réalisées précédemment sur le sujet, faute de représentativité suffisante de ces études. Toutefois, Harris et Harbo (1999), en utilisant une technique de dissection similaire à la nôtre, obtiennent des moyennes de 22 (n = 27) et 35 (n = 18) pour des fondatrices engendrant une descendance.

Le contenu spermathéal maximal observé dans notre étude est de 115 spermatozoïdes. Les études précédentes rapportent un maximum de 75 spermatozoïdes pour Donzé *et al.* (1996), de 90 pour Guillet (2008).

Comme cela est observé chez d'autres espèces d'arthropodes, la charge spermathécale est réduite chez *V. destructor*. Par exemple, la charge spermathécale est de 128 chez *Eupelmus orientalis* (Hymenoptera : Eupelmidae) et 79 chez *Dinarmus basalis* (Hymenoptera : Pteromalidae) (Damiens *et al.*, 2002). D'autres espèces, qui comme *V. destructor*, lors d'une période de fécondation unique stockent les spermatozoïdes dans une spermathèque, conservent en revanche un nombre important de spermatozoïdes. Ainsi, la charge moyenne est de 59020 chez *Plagiolepis pygmaea* (Hymenoptera : Formicidae), 106900 chez *Tapinoma erraticum* (Hymenoptera : Dolichoderinae), 309700 chez *Linepithema humile* (Hymenoptera : Dolichoderinae), 2621680 chez *Lasius niger* (Hymenoptera : Formicidae), 2733520 chez *Crematogaster scutellaris* (Hymenoptera : Myrmicinae) (Cournault et Aron, 2008), plus de 4,7 millions chez la reine d'*A. mellifera* (Koeniger et Koeniger, 2000).

Cournault et Aron (2008) observent, lors de l'étude de différentes espèces de fourmis, une corrélation positive entre la charge spermathécale en spermatozoïdes des femelles reproductrices et la taille de la descendance engendrée par ces femelles. Au vu des résultats établis chez les Hyménoptères et chez *V. destructor*, on peut supposer qu'il s'agit d'une loi plus générale.

4.2. Influence de la phénologie de la colonie sur le contenu spermathécal

Pour avoir des lots les plus homogènes possibles, les dissections ont été réalisées sur des femelles phorétiques. L'étude de cette catégorie nous permet d'avoir un bon reflet de la diversité des femelles concernant le nombre de cycles de reproduction réalisés. Nous émettons l'hypothèse que la proportion de nullipares, de primipares et de multipares reste constante au sein de la cohorte de phorétiques au cours de l'année. Cette hypothèse nous paraît raisonnable d'une part du fait que le nombre de cycles de reproduction moyen réalisé au cours de la vie d'une fondatrice est faible et peu variable: ce nombre est estimé entre 1,5 et 3 (Fries et Rosenkranz, 1996 ; Martin et Kemp, 1997). D'autre part, même si en hiver, la fécondité est plus faible que pendant la belle saison, le déficit en femelle nullipare est réduit du fait de la faible proportion de femelles engendrant un cycle de reproduction pendant cette période.

Nous avons choisi de réaliser les dissections à quatre périodes de l'année correspondant à des stades phénologiques particuliers de la colonie et à différents états physiologiques de l'abeille: en octobre (période de préparation d'hivernage), en décembre (hivernage), en mars (sortie d'hivernage), en juillet (période de pleine activité) (Figure 16).

Nous avons ainsi observé que le stock moyen en spermatozoïdes ne montrait pas de différence statistique au cours des quatre périodes étudiées. Il semble que l'efficacité du transfert des spermatozoïdes dans la spermathèque au cours des accouplements soit similaire au cours de l'année. Chez *A. mellifera*, il a été montré que le contenu spermathécal initial était plus faible lorsque la température au sein de la grappe d'abeilles diminuait (Woyke et Jasinski, 1980). Pour *V. destructor*, la température au lieu de reproduction semble avoir peu d'effets sur le remplissage de la spermathèque, malgré le fait qu'en hiver, la température du couvain au centre de la grappe, varie entre 27°C et 35°C (Owens, 1971), alors qu'en été, cette température est maintenue à 34-35°C (Kraus *et al.*, 1998). Rappelons qu'en hiver et sous notre climat, on observe des périodes sans couvain à l'intérieur des ruches, ce qui empêche de fait la reproduction du parasite.

En outre, la conservation des spermatozoïdes à l'intérieur de la spermathèque au cours du temps semble bonne, particulièrement en hiver. En effet, pendant la belle saison, l'espérance de vie d'une femelle est estimée entre 2,5 et 3,5 mois en été (Calatayud et Verdu, 1994 ; De Ruijter, 1987) alors qu'elle est certainement plus longue en hiver, sans toutefois avoir été précisément caractérisée. Chez certaines espèces, les spermatozoïdes peuvent être conservés durant plusieurs années tout en conservant leur fertilité. Ainsi, chez *A. mellifera*, les spermatozoïdes sont conservés plus de 8 années dans la spermathèque de la reine malgré une évolution de l'environnement spermathécal au cours du temps (Al-Lawati *et al.*, 2009 ; Winston, 1993) ; chez une espèce de fourmi, *Formica exsecta*, cette conservation peut atteindre près de 3 décennies (Pamilo, 1991).

4.3. Distinction femelles fondatrices / femelles-filles adultes au sein d'une population de *V. destructor* adultes recueillie à l'intérieur d'alvéoles de couvain

La femelle fondatrice est une femelle initiant une phase de reproduction et engendrant une descendance, reconnaissable par sa cuticule foncée et par l'absence de spermatozoïdes immatures dans sa spermathèque.

Une femelle-fille adulte est une femelle n'ayant jamais initié de phase de reproduction. Nos observations confirment les résultats de Donzé (1995) et Lobb et Martin (1997) qui indiquent que la femelle adulte *V. destructor* est de couleur brun clair après la dernière mue et évolue peu à peu vers la couleur définitive brun foncé en l'espace de 24 à 72 heures (Donzé, 1995 ; Lobb et Martin, 1997). En effet, nous observons les premières femelles-filles à cuticule foncée dès que l'abeille atteint le stade nymphal à thorax jaune, ce qui correspond à des femelles-filles adultes âgées d'au maximum 3 jours (Martin, 1995b).

Ainsi, la couleur cuticulaire des femelles-filles adultes peut être claire ou foncée et le contenu spermathécal de type immature ou mature. Toutes les femelles adultes possédant une cuticule claire et/ou des spermatozoïdes immatures sont donc exclusivement des femelles-filles.

Pratiquement, pour être sûr d'avoir affaire à des femelles fondatrices, les prélèvements de femelles adultes à cuticule foncée doivent être réalisés dans le couvain operculé de faux-bourçons avant que la nymphe d'abeille n'atteigne le stade à thorax jaune. Si les prélèvements sont réalisés pendant ou au-delà du stade nymphal à thorax jaune, seule la femelle adulte à cuticule foncée présentant des spermatozoïdes matures est considérée comme fondatrice. Si à ce stade, on observe plusieurs femelles adultes à cuticule foncée et avec des spermatozoïdes de type mature dans la spermathèque, on pourra difficilement savoir si on est dans le cas fille/fondatrice, ou fondatrice/fondatrice dans le cas d'une multi-infestation. Le nombre de mâles présents peut servir d'indice: l'observation de 2 mâles impliquerait 2 fondatrices.

La possibilité offerte par les dissections de pouvoir distinguer, par observation des spermatozoïdes, des femelles-filles ou des fondatrices possédant des caractéristiques de couleur cuticulaire semblable, pourrait aboutir à la découverte de paramètres morphologiques externes facilitant l'évaluation de l'âge des femelles adultes (mensuration des membres, longueur des setae,...).

4.4. Influence de la phorésie sur le contenu spermathécal

Nous n'observons pas de différence statistique entre le contenu spermathécal de femelles en phase de phorésie et le contenu spermathécal de femelles fondatrices en phase de reproduction. Ce résultat indiquerait que l'ensemble des femelles participe à la phase de reproduction. Il ne semble pas exister de sous-population possédant une charge spermathécale faible se maintenant en phase de phorésie. Dans cette hypothèse, on pouvait penser à des femelles ayant consommé une grande partie ou la totalité de leur stock initial en spermatozoïdes, ou encore à des femelles jeunes peu fécondées.

En outre, on observe que 7,2 % des femelles phorétiques présentent des spermatozoïdes immatures dans leur spermathèque. Comme une partie des femelles-filles en phase phorétique ont déjà acquis des spermatozoïdes présentant une morphologie de type mature, ce chiffre minore le nombre de femelles-filles dans la population de phorétiques. Ainsi, la population des phorétiques est constituée d'au moins 7,2 % de femelles-filles dans notre étude.

4.5. Transfert et maturation des spermatozoïdes

Nous n'observons pas de différence statistique concernant le contenu spermathécal de femelles possédant des spermatozoïdes immatures suivant que leur couleur cuticulaire soit claire ou foncée. Ce résultat nous indique que le transfert des pro-spermatozoïdes à travers les

voies génitales (solénostome, tubulus, ramus) des femelles-filles est rapide et que le contenu en pro-spermatozoïdes à l'issu du transfert correspond au contenu définitif en spermatozoïdes matures. La durée de transfert des pro-spermatozoïdes indiquée par Donzé *et al.* (1996) serait d'environ 2 jours. Selon nos observations, cette durée de transfert nous apparaît plus rapide, de quelques heures au maximum. On ne sait toutefois pas s'il y a des pertes de spermatozoïdes au cours de ce transfert. Cette perte est constatée chez d'autres espèces comme *A. mellifera* où seuls 3 à 5 % des spermatozoïdes sont effectivement retenus dans la spermathèque par la reine suite aux accouplements, le reste est perdu lors du transfert (Koeniger et Koeniger, 2000).

L'acquisition d'une morphologie de type mature pour les spermatozoïdes semble rapide ; certainement plus rapide que la période de 5 à 14 jours de phorésie, obligatoire après l'émergence pour permettre la maturation de l'appareil reproducteur (Akimov *et al.*, 1988). En effet, nous avons vu précédemment que les premières filles possédant des spermatozoïdes de type mature apparaissaient au stade nymphal au thorax gris du couvain d'abeilles. Ainsi, on peut penser que la maturation complète des spermatozoïdes dure moins de 5 jours, puisque les filles adultes présentes à l'intérieur des alvéoles ne peuvent être plus âgées (Martin, 1995b). Il est dès lors peu probable que le temps nécessaire à la maturation des spermatozoïdes soit le facteur retardant l'entrée en reproduction des jeunes femelles *V. destructor*.

En outre, comme on observe des spermatozoïdes immatures chez des femelles à cuticule foncée, l'acquisition de la couleur cuticulaire définitive (1 à 3 jours d'après Donzé, 1995 ; Lobb et Martin, 1997 ; et la présente étude) semble plus rapide que l'acquisition de la maturité des spermatozoïdes.

Ainsi, la cuticulisation complète s'acquerrait entre 1 et 5 jours après la mue imaginale. Un intervalle compris entre 3 et 5 jours nous semble toutefois plus probable car une partie des femelles-filles adultes en phase de phorésie possède des spermatozoïdes immatures.

Nous ne pouvons cependant pas déterminer si le passage des spermatozoïdes à la forme mature est concomitant de l'acquisition de leur pouvoir fécondant.

Comme le transfert des spermatozoïdes à l'intérieur de la spermathèque semble rapide et que l'on n'observe pas de différence en terme de nombre de spermatozoïdes contenus dans des spermathèques de filles immatures à cuticule claire ou foncée, on peut penser, contrairement à ce qu'affirment Donzé *et al.* (1996), que le remplissage de la spermathèque serait efficace dès les premiers accouplements et que peu d'accouplements seraient au final nécessaires pour aboutir à un remplissage optimal de la spermathèque.

4.6. Infertilité des femelles *V. destructor*

Une femelle infertile est une femelle n'engendrant pas de descendance (viable ou non viable) lors d'un cycle de reproduction. Cette infertilité peut être transitoire ; cette femelle sera alors capable d'engendrer une descendance lors de cycles de reproduction ultérieurs. L'infertilité peut également être définitive et correspondre alors à une stérilité.

Dans notre étude, une partie des spermathèques apparaissent vides. On ne peut exclure que la technique de dissection, bien qu'elle soit précautionneuse, aboutisse à des observations faussement négatives. En effet, la spermathèque est un organe très fragile et les spermatozoïdes peuvent se perdre lors d'un problème de prélèvement ou lors du transfert de la

spermathèque sur la lame d'observation. Cependant, nous pensons avoir limité ce phénomène en conservant uniquement les résultats issus de la dernière période d'étude (juillet), alors que la technique de dissection était parfaitement maîtrisée et éprouvée.

On observe que près d'un cinquième des femelles-filles ne contient pas de spermatozoïdes dans la spermathèque. Ceci est lié en grande partie à une non fécondation des filles due à l'absence de mâle au moment de réceptivité des femelles. Cette stérilité est définitive car, pour être fécondée, cette femelle devrait rester réceptive pour un accouplement, ce qui semble peu probable (la durée de réceptivité des femelles *V. destructor* n'a toutefois pas été définie précisément à ce jour).

On observe dans notre étude que les mâles sont absents dans 17,6 % des alvéoles contenant une descendance femelle. Cette observation est en accord avec les résultats de l'étude de Donzé *et al.* (1996). Ces auteurs notent cette absence dans 23,5 % des cas dans le couvain de faux-bourçons mono-infesté.

Dans le cas d'alvéoles multi-infestées où au moins un mâle était présent, l'absence de fécondation s'expliquerait par une compétition entre jeunes femelles au lieu d'accouplements, plusieurs jeunes femelles étant réceptive au même moment pour un accouplement. On peut également penser que ce phénomène est lié à une déficience du ou des mâles, ces derniers étant très sollicités et/ou mal nourris à cause de la compétition alimentaire au site de nourrissage.

On observe que 14,3 % des femelles enfermées dans le couvain operculé ne se reproduisent pas. Ce résultat est en accord avec les données de l'article de synthèse de Rosenkranz *et al.* (2010) indiquant que 5 à 20 % des femelles *V. destructor* restaient infertiles dans ce cas là.

On peut s'interroger sur le devenir des 21,9 % de femelles-filles adultes stériles: correspondent-elles aux 14,3 % de femelles entrées en phase de reproduction restant infertiles? Cette hypothèse est peu probable. En effet, moins de 5 % de ces femelles infertiles ont une spermathèque vide. On peut penser que les femelles non fécondées ont une espérance de vie plus courte que les femelles fécondées et ainsi disparaissent petit à petit de la cohorte des femelles adultes. Cette hypothèse est confortée par le fait que seule 7 % des femelles en phase de phorésie ont une spermathèque vide dans notre étude. Garrido et Rosenkranz (2003) ne trouvent dans leur étude aucune spermathèque vide chez les femelles phorétiques étudiées (n = 59). Le fait que des femelles non fécondées aient une espérance de vie plus courte que des femelles qui l'ont été, est un phénomène décrit chez d'autres espèces d'acariens, par exemple chez *Histiostoma feroniarum* (Acari : Astigmata : Acaridida) (Liana, 2005).

Nous expliquons un tiers des cas d'infertilité par l'absence de spermatozoïdes dans la spermathèque. Harris et Harbo (1999) observent cette absence chez 55 % des femelles infertiles issues de colonies d'abeilles résistantes à *V. destructor*. Nos résultats sont toutefois à interpréter avec grande précaution vu la taille réduite de notre échantillon (n = 7).

La moyenne du contenu spermathécal des femelles infertiles non vide (n = 5) est de 21 spermatozoïdes en moyenne, ce qui est plus faible que le contenu moyen de l'ensemble des fondatrices (34,4). Cette même tendance est observée par Harris et Harbo (1999). Ainsi les auteurs suggèrent qu'une partie des cas d'infertilité est liée soit à un problème lors de la fécondation, soit à un problème lors de la maturation des pro-spermatozoïdes ou enfin un épuisement des réserves en spermatozoïdes.

D'autres hypothèses ont été proposées pour expliquer les cas d'infertilité :

- une stérilité par épuisement du stock d'ovocytes (Akimov *et al.*, 1988) ;
- une infertilité transitoire liée soit à un défaut d'activation de l'ovogenèse (Garrido et Rosenkranz, 2003 ; Rosenkranz *et al.*, 2009), soit à l'entrée dans les alvéoles de

jeunes femelles dont l'appareil reproducteur n'est pas encore tout à fait mature (Fries et Rosenkranz, 1996) ;

- une désynchronisation du cycle de l'hôte et du parasite suite au comportement 'hygiénique' de l'hôte, ce qui diminue le succès reproducteur du parasite (Kirrane *et al.*, 2011).

4.7. Fécondation des ovocytes

Connaissant le faible nombre de spermatozoïdes stockés, la question de savoir s'ils sont suffisamment nombreux pour féconder tous les ovocytes se pose.

Afin d'estimer le potentiel reproducteur des femelles *V. destructor*, il est nécessaire de connaître le nombre moyen de spermatozoïdes contenus initialement dans la spermathèque, ainsi que le nombre de spermatozoïdes recrutés pour la fécondation d'un ovocyte. Ce nombre détermine le nombre maximum d'œufs fécondés pouvant être produit, et donc le nombre maximum de descendants issus de ces œufs qu'une femelle pourra engendrer au cours de sa vie. Ainsi, les filles *V. destructor* ont en moyenne 44,3 spermatozoïdes disponibles suite à la fécondation.

Comment est utilisé le stock initial de 44,3 spermatozoïdes en moyenne suite à la fécondation ?

On constate une différence statistique entre le contenu spermathéal de femelles *V. destructor* fondatrices après l'oviposition complète et celui de femelles-filles *V. destructor*. Ainsi, les fondatrices en question ont effectué 1 ou plusieurs cycles de reproduction de plus que leurs filles. Nous trouvons une différence en terme de contenu moyen en spermatozoïdes chez ces 2 catégories de femelles de près de 10 spermatozoïdes (9,9 exactement). On sait également que dans le couvain de faux-bourçons, 6 œufs, très rarement 7 œufs sont pondus par la fondatrice lors de chaque cycle de reproduction (Martin, 1995b) dont l'un est mâle, donc non fécondé s'il s'agit d'une reproduction arrhénotoque (Akimov *et al.*, 1986b) ou fécondé si elle est pseudo-arrhénotoque (Akimov *et al.*, 1988 ; Martin *et al.*, 1997). Ainsi, un minimum de 5 à 7 spermatozoïdes seraient utilisés lors de chaque cycle de reproduction dans du couvain de faux-bourçons. En émettant l'hypothèse que pour un œuf fécondé, un seul spermatozoïde est nécessaire, on tombe en accord avec le résultat de l'étude de Fries et Rosenkranz (1996) concernant le nombre moyen de cycles réalisés : entre 1,5 (équivalent à un minimum de 7 spermatozoïdes utilisés) et 2 (correspond à un minimum de 10 spermatozoïdes utilisés) pour une femelle *V. destructor*. Une moyenne de 3 cycles de reproduction est peu probable dans le cas de notre étude car elle impliquerait au minimum la consommation de 15 spermatozoïdes, ce qui est supérieur à la différence entre le contenu initial moyen en spermatozoïdes et le contenu moyen en spermatozoïdes des femelles fondatrices ayant effectuée au moins un cycle. L'hypothèse que 2 ou plus de 2 spermatozoïdes soient nécessaire par œuf produit n'est tout simplement pas possible vu la réalité biologique décrite. Ainsi chez *V. destructor*, le nombre de spermatozoïdes nécessaire pour féconder un œuf est proche du minimum nécessaire, c'est-à-dire de 1 spermatozoïde.

Le nombre de spermatozoïdes utilisés est également de 1 par œuf chez *Dinarmus basalis* (Hymenoptera : Pteromalidae) (Damiens *et al.*, 2002). Chez d'autres espèces, le nombre de spermatozoïdes nécessaire est plus élevé : 1,4 chez *Drosophila bifurcata* (Joly *et al.*, 2008), 3 à 100 par œuf suivant les études chez *A. mellifera* (Baer, 2005 ; Rubinsky, 2010).

4.8. Potentiel reproducteur des femelles *V. destructor*

Ainsi le potentiel reproducteur d'une femelle *V. destructor* déterminé par le contenu spermathécral est estimé en moyenne à 44 descendants.

Toutefois, en condition naturelle, ce nombre de 44 descendants par femelle n'est jamais observé. Cela nécessiterait au minimum 7 cycles de reproduction (avec l'utilisation de 7 spermatozoïdes par cycle de reproduction) dans du couvain de faux-bourçons. De Ruijter (1987) avait cependant déterminé, toujours en condition expérimentale, que les fondatrices étaient capables de se reproduire plus de 7 fois, sans préciser toutefois le nombre d'œufs pondus.

Contrairement à d'autres espèces tel *Dinarmus basalis* (Damiens *et al.*, 2002), le nombre de spermatozoïdes présent dans la spermathèque d'une femelle *V. destructor* ne semble pas être le facteur limitant pour sa reproduction. Peut-être est-ce le nombre de gamètes femelles selon l'hypothèse d'Akimov *et al.* (1988). Il est sans doute vrai que qu'en condition naturelle, l'espérance de vie du parasite est tout simplement trop courte pour pouvoir épuiser son potentiel reproducteur.

Il paraît important de déterminer le ou les facteurs limitant la reproduction de ce parasite. En effet, la phase de reproduction est une étape-clé pour la dynamique de population.

4.9. Compétition spermatique

Chez *V. destructor*, une compétition spermatique dans les voies génitales femelles ne semble pas exister. On peut y voir plusieurs raisons. Premièrement, chez cet acarien, la viabilité des spermatozoïdes contenus dans la spermathèque est bonne ($\approx 90\%$ de viabilité) (Guillet, 2008). De plus, les spermatozoïdes contenus dans la spermathèque proviennent le plus souvent d'un mâle haploïde unique (cas d'une mono-infestation ou d'une pluri-infestation avec un unique descendant mâle viable à l'âge adulte). L'ensemble des spermatozoïdes possède donc des caractéristiques génétiques semblables, ce qui rend inutile une compétition entre ces derniers. En cas de pluri-infestation avec plusieurs descendants mâles adultes viables, une compétition spermatique pourrait potentiellement se produire à l'intérieur des voies génitales femelles puisque les femelles susceptibles d'être fécondées acceptent plusieurs accouplements. Toutefois, comme *V. destructor* est une espèce quasi clonale (Solignac *et al.*, 2005), on peut s'interroger sur la réalité de cette compétition spermatique chez le parasite lors d'accouplements avec plusieurs mâles, alors qu'elle est pourtant observée chez de nombreuses espèces d'acarides (Witalinsky, 1999). Enfin, contrairement à des espèces utilisant plusieurs spermatozoïdes pour la fécondation d'un ovocyte, une compétition spermatique au lieu de fécondation ne pourra se produire chez *V. destructor* (Baer, 2005).

4.10. Perspectives

Il nous paraît ainsi intéressant de poursuivre les recherches sur les particularités de la reproduction de cet acarien, afin de découvrir, peut-être à terme un nouveau moyen de contrôle du parasite. Certaines voies de recherche sur le sujet nous paraissent intéressantes.

Il a été montré que les cellules de certains arthropodes pouvaient contenir des micro-organismes parasites ou symbiotiques. Par exemple, un acarien, *Pergamasus barbarus* (Gamasida : Pergamasidae) contient des particules virales de type parvovirus ou picornavirus dans le cytoplasme de ses spermatozoïdes (Afzelius *et al.*, 1989)

Quelques études relèvent la présence d'endosymbiontes chez des acariens. Par exemple, on trouve des bactéries du genre *Cardinium* chez *Brevipalpus phoenicis* (Acari : Tenuipalpidae) (Novelli *et al.*, 2008), des *Wolbachia* chez *Tetranychus urticae* (Acari : Tetranychidae) (Tsagkarakou *et al.*, 1996).

L'élimination ou l'introduction d'endosymbiontes pourrait modifier la reproduction de ces espèces. Par exemple, la proportion de mâles, la période d'oviposition, le nombre d'œufs pondus sont modifiés chez *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae) (Novelli *et al.*, 2008). Plus généralement, les endosymbiontes peuvent être à l'origine d'incompatibilités cellulaires, d'induction de la parthénogenèse ou de la modification du ratio de descendants mâles/femelles (Harris et Braig, 2003 ; Zindel *et al.*, 2011).

Chez *V. destructor*, la présence d'endosymbiontes, dont la nature n'a pas été déterminée, a été décrite à ce jour uniquement dans les glandes salivaires (Cicero et Sammataro, 2010). Il serait intéressant d'élargir les recherches à l'appareil reproducteur afin de vérifier la présence de micro-organismes endosymbiotiques et le cas échéant les caractériser. Cela peut avoir un grand intérêt chez cette espèce qui se reproduit dans une alvéole fermée. En effet, rien que le fait de modifier le ratio mâles/femelles peut avoir des conséquences considérables : sans mâle, pas de fécondation des filles ; avoir plus d'un mâle diminue le nombre de descendants femelles produit et ralentit considérablement la cinétique de croissance de la population de parasites. Modifier la période de ponte du parasite peut aboutir également à une baisse de la fécondité des femelles fondatrices.

Une autre voie de recherche potentielle s'appuie sur la connaissance des gènes impliqués dans la reproduction. Guo et Reuben Kaufman (2008) ont réussi à identifier des gènes participant à la maturation des gonades et à la spermatogenèse chez le mâle *Amblyomma hebraeum* (Acari: Ixodidae). L'atténuation de l'expression de 2 de ces gènes a entraîné des malformations des gonades, ainsi qu'une spermatogenèse anormale. Les femelles élevées avec ces mâles ont produit significativement moins d'œufs et certaines restaient infertiles.

Enfin, certaines molécules ont la propriété d'altérer la reproduction de certains parasites. Par exemple, des molécules de la famille des formamidines à laquelle appartient l'amitraz (Ibrahim et Knowles, 1986), ainsi que l'azadirachtin, du groupe des limonoïdes (Martinez-Villar *et al.*, 2005), ont la propriété d'altérer la fécondité, le potentiel reproducteur, la ponte d'œufs chez *Tetranychus urticae* (Acari : Tetranychidae) ; des mono-terpènes (anethol, carvacrol, 1,8-cineole, p-cymene, menthol, γ -terpinen-4-ol, thymol) altèrent la fécondité de *Tetranychus cinnabarinus* (Acari: Tetranychidae) (Erler et Tunç, 2004).

Ainsi chez *V. destructor*, il serait intéressant de tester l'effet de molécules sur la fonction de reproduction. Au préalable, il faudrait mettre en place des protocoles standardisés en laboratoire afin de caractériser objectivement cet effet. Ces tests permettraient de prendre en compte plusieurs paramètres tels la fertilité, la fécondité des fondatrices, mais il serait également intéressant d'y inclure l'observation du contenu spermathécail des filles, un marqueur indirect de la fonction de reproduction des mâles. Les comptages de spermatozoïdes, ainsi que des tests de viabilité de ces spermatozoïdes en serait la base. Une difficulté à relever chez *V. destructor* est que sa reproduction se déroule dans un endroit isolé de l'environnement externe : l'alvéole de couvain operculé. Ainsi, les molécules utilisées devraient avoir une action en phase de phorésie ou alors la propriété de pouvoir pénétrer à l'intérieur des alvéoles de couvain.

Cette démarche présenterait plusieurs intérêts :

- connaître d'éventuels effets sublétaux d'acaricides déjà utilisés,
- développer de nouvelles molécules ciblées spécifiquement sur la reproduction du parasite,

- évaluer la résistance des colonies d'abeilles contre le parasite sur des critères précis de sa reproduction.