

Article original

Activité des huiles essentielles de Labiées sur *Ascosphaera apis* et traitement d'un rucher

M.E. Colin ¹*, J. Ducos de Lahitte ², E. Larribau ² et T. Boué ²

¹ Laboratoire national de pathologie des abeilles, 63, av. des Arènes, 06051 Nice Cedex,
² Ecole nationale vétérinaire, 23, chemin des Capelles, 31076 Toulouse Cedex, France

(reçu le 28 mars 1988, accepté le 10 mars 1989)

Résumé — L'ascosphaerose de l'abeille provoque régulièrement un affaiblissement printanier des colonies. Pour la combattre, on a réalisé un essai préliminaire de traitement à base d'huile essentielle de sarriette, incorporée à du candi à la concentration de 0,1%. Un kilo de candi est donné à chaque colonie traitée à la fin de l'hiver. Les résultats indiquent une nette régression de l'affection pendant les 75 jours suivant le traitement. D'autres huiles essentielles de Labiées (thym type carvacrol, origan) présentent des pouvoirs fongistatique et fongicide déterminés *in vitro*, comparables à ceux de l'huile essentielle de sarriette. L'aromathérapie permet donc d'envisager un traitement préventif de l'ascosphaerose sans risque majeur de pollution des produits de la ruche.

***Ascosphaera apis* — larves — huiles essentielles — Labiées — pouvoirs fongistatiques**

Summary — **Activity of essential oils of Labiaceae on *Ascosphaera apis* and treatment of an apiary.** The first part of the experiment consists of the measurement of fungistatic and fungicidal activities of essential oils of different Labiaceae : *Origanum vulgare* (2 varieties), *Satureia montana* (4 varieties), *Thymus vulgaris* (16 clones issued from the «Chambre d'Agriculture de la Drôme», an agricultural organism of the Drôme department). The chemical composition and type are given in Table I. *In vitro*, the most effective oils generally have a rich carvacrol content (higher than 30%) (Fig. 1, 2 and 3). The clone of thyme (number 133) shows anti-fungal properties relatively constant through time (Fig. 3). The second part of the experiment is a field study to assay the therapeutic value of an oil, which is active and palatable for bees, the essential oil of savory (*Satureia montana*), imported from Albania (Table II). This is mixed with sugar-candy (dilution : 0.1%; dose of 1 ml per colony) and fed at the end of wintering (February). Seven colonies were experimentally treated, 7 colonies were unfed and another 7 received simple sugar-candy. The evolution of chalkbrood was estimated by counting, two times a week, the dead larvae gathered at the entrance of the hive, during the 75 days following treatment (Figure 4 and Table III). Under these conditions, the efficacy of the essential oil of savory is significant (0.05). Moreover, feeding with simple sugar-candy doesn't aggravate the disease.

***Ascosphaera apis* — chalkbrood — essential oil — Labiaceae — fungistatic activity**

* Adresse actuelle : INRA Station de zoologie-apidologie, BP 91, 84140 Montfavet, France

Zusammenfassung — Wirksamkeit von ätherischen Ölen der Lippenblütler auf *Ascosphaera apis* und Behandlung eines Bienengartens. Der erste Teil des Versuchs bestand aus der Bewertung der fungistatischen und fungiziden Aktivität von ätherischen Ölen einiger Lippenblütler: *Origanum vulgare* (2 Varietäten), *Satureia montana* (4 Varietäten), *Thymus vulgaris* (16 von der Landwirtschaftskammer der Provinz Drôme selektionierte Klone). Die chemische Zusammensetzung und der Chemotyp der verschiedenen Thymian-Klone sind in Tabelle I aufgeführt. Die *in vitro* aktivsten Öle sind die, die reich (> 30%) an Carvacrol sind (Abb. 1, 2 u. 3). Der Klon Nr. 133 von Thymian zeigte eine antimykotische Wirkung, die über die Zeit ausreichend stabil ist (Abb. 3). Der zweite Teil des Experiments ist ein Feldversuch, bei dem ein aktives und für die Bienen angenehmes Öl getestet wird: das ätherische Öl der Winter-Bergminze (*Satureia montana*). Seine Zusammensetzung ist in Tabelle II angegeben. Es wurde in Kandiszucker inkorporiert (Volumenkonzentration 0.1%) und am Ende der Überwinterung (Februar) in einer Dosis von 1 ml Öl pro Volk verabreicht. Sieben Völker wurden damit behandelt, 7 ohne jegliche Fütterung belassen und ein genauso großer Anteil mit reinem Kandiszucker gefüttert. Die Entwicklung der Kalkbrut wurde durch zweimal wöchentliches Auszählen der verpilzten Larven vor dem Stock über einen Zeitraum von 75 Tagen nach dem Einbringen des Kandiszuckers (Abb. 4, Tabelle III) und durch Inspektion der Völker am Tag 56 geschätzt.

Unter diesen Bedingungen ist die therapeutische Wirkung der ätherischen Öle von *Satureia montana* signifikant auf einem Niveau von 5%. Zum anderen wurde im Gegensatz zu Daten aus der Literatur festgestellt, daß die Fütterung von Kandiszucker allein nicht die Krankheitsanfälligkeit erhöht.

Ascosphaera apis — Kalkbrut — ätherische Öle — Lippenblütler — fungistatische Aktivität

Introduction

L'ascosphaerose de l'abeille est une affection des stades larvaires ou nymphaux de l'insecte qui provoque une maladie grave, bien qu'elle ne tue que rarement les colonies. Cependant, elle entraîne un retard du développement printanier et par là même une diminution de la force de la ruche au moment des miellées et finalement une perte de récolte, souvent estimée au tiers de la valeur espérée. En plus des mesures de prophylaxie, basées sur le renforcement du comportement de nettoyage (Gilliam *et al.*, 1983), le traitement classique repose sur l'antibiothérapie antifongique (Giauffret et Taliercio, 1967), mais il procure seulement une rémission momentanée des symptômes. Le risque de répétition ou d'augmentation des doses est alors important et parallèlement celui d'une pollution des produits de la ruche, qui risquerait d'entacher leur caractère naturel.

L'utilisation d'huiles essentielles extraites de plantes aromatiques cultivées pour l'alimentation humaine et visitées régulièrement par les abeilles représente une thérapeutique plus proche de la biologie de la colonie, et elle correspond mieux à la réputation du miel, à condition toutefois de respecter la posologie et le mode d'administration de ces extraits végétaux préconisés en aromathérapie humaine (Belaiche, 1979; Allegrini *et al.*, 1974).

Il devient donc intéressant d'envisager des essais préliminaires d'efficacité avec de telles substances, sous réserve qu'ils soient poursuivis dans le cadre d'un dossier de demande d'autorisation de mise sur le marché d'une formulation vétérinaire.

L'étude présentée commence par des essais d'activité directe des huiles sur le mycélium d'*Ascosphaera apis* et se poursuit par une expérience de terrain après le choix d'une huile essentielle active. Le travail *in vitro* complète ceux de Gross

(1984) et Larribau (1985) par la prise en compte de la variabilité de la composition chimique d'huiles tirées de l'espèce *Thymus vulgaris* par exemple, grâce aux clones réalisés par la Chambre d'agriculture de la Drôme (Lamy, 1981) en fonction des chémotypes (Lamy *et al.*, 1981).

Matériel et Méthodes

Matériel

A partir de larves mycosées (encore appelées momies) de différentes origines, nous avons isolé et identifié 3 souches de champignons (*Ascosphaera apis*) parmi les plus vigoureuses,

donnant un feutrage mycélien épais après culture sur milieu de Sabouraud. Les essais ont été faits en l'absence de fructification.

Le choix des huiles essentielles reflète la grande variabilité des types chimiques, surtout dans l'espèce *Thymus vulgaris* qui compte 6 chémotypes. Le Tableau I en indique la composition moyenne relevée dans les clones distribués par la Chambre d'agriculture de la Drôme. Origans (*Origanum vulgare*) et sarriettes (*Satureia montana*) proviennent de localisations géographiques différentes.

Un chromatogramme a été effectué sur l'huile essentielle de sarriette des montagnes (importée d'Albanie) choisie dans l'expérience de terrain par le Lab. Anal. Rech. Assoc. de Toulouse (Tableau II).

Le thymol, le carvacrol et le géraniol (Gochnauer *et al.*, 1979), molécules réputées antifongiques et constituants majeurs de ces huiles, ont servi de témoins.

Tableau I. Composition type des huiles essentielles de thym (*Thymus vulgaris*) issues des clones de la Chambre d'agriculture de la Drôme. Les valeurs représentent les pourcentages du composant par rapport à l'huile essentielle totale.

| | n° des clones | Terpènes | Paracymène | Thymol | Carvacrol | Thuyanol | Linalol | MyrcénoI | Geraniol |
|--------------|---------------|----------|------------|--------|-----------|----------|---------|----------|----------|
| Type THY | 349 | 10,7 | 22,6 | 42,4 | 1,3 | | | | |
| | 207 | 13 | 19,3 | 41 | 3,6 | | | | |
| | 477 | 19,9 | 18,7 | 34,4 | 1,8 | | | | |
| | 307 | 13,3 | 30,5 | 32,6 | 5,2 | | | | |
| | 555 | 18,3 | 29,6 | 26,8 | 1,9 | | | | |
| | 377 | 6,3 | 37,3 | 27,5 | 2,7 | | | | |
| Type CAR | 756 | 6,7 | 25,3 | 9,7 | 39,9 | | | | |
| | 133 | 15,2 | 22,2 | 10,1 | 38,6 | | | | |
| | 577 | 6,9 | 30,1 | 0 | 33,9 | | | | |
| | 144 | 4,3 | 33,8 | 7,7 | 33 | | | | |
| | 177 | 6,6 | 20,8 | 11,9 | 33 | | | | |
| | 077 | 8,9 | 28,6 | 8,7 | 32 | | | | |
| Type THU | 572 | 2 | 2 | | | 35,8 | 7,5 | | |
| Type LIN | Pégase | 1,4 | 1,6 | 5,1 | | | 82,9 | | |
| | 240 | 1,5 | 1,8 | 6,2 | | | 77,7 | | |
| Type GER | 535 | | | | | | | 55 | 37,5 |
| Type CAR LIN | 557 | 7,3 | 31,3 | 5,7 | 27,3 | | 8,4 | | |

Méthodes

Mise en culture

Pour ensemercer les milieux de culture solides, nous avons transféré un cube de gélose recouvert de mycélium sur un milieu de Sabouraud solide vierge, mis ensuite à incuber à 28 °C.

Inclusion des huiles essentielles

La dispersion en milieu aqueux (Sabouraud) a été faite par l'intermédiaire d'une solution mère

Tableau II. Composition de l'huile essentielle de sarriette utilisée dans l'expérience de terrain.

| Numéro du pic | Pourcentage du composant dans l'huile essentielle |
|---------------------------------|---|
| 2 α -pinène | 3,17 |
| 3 camphène | 0,53 |
| 4 β -pinène | 0,35 |
| 5 sabinène | 0,04 |
| 7 δ 3 - carène | 0,11 |
| 8 myrcène | 1,93 |
| 9 α -phellandrène | 0,33 |
| 10 α -terpinène | 2,33 |
| 11 limonène | 1,25 |
| 12 1,8 cinéole | 0,63 |
| 13 phellandrène | 0,27 |
| 14 ocimène (cis) | 0,3 |
| 15 γ -terpinène | 11,79 |
| 16 ocimène (trans) + octanone 3 | 0,04 |
| 17 p-cymène | 20,80 |
| 18 terpinolène | 0,14 |
| 19 octénol 3 | 1,24 |
| 20 sabinène hydrate (trans) | 0,57 |
| 22 camphre | 0,13 |
| 24 sabinène hydrate (cis) | 0,21 |
| 25 linalol | 0,92 |
| 28 terpinène - 4 ol | 0,80 |
| 29 β -caryophyllène | 3,64 |
| 35 bornéol | 1,21 |
| 37 β -bisabolène | 0,54 |
| 39 géraniol, carvone | 0,44 |
| 44 caryophyllène oxyde | 0,54 |
| 46 thymol | 4,18 |
| 47 carvacrol | 31,54 |

de ces huiles, dans du propane-diol à la concentration de 5% en volume, au moyen d'une forte agitation. Cet alcool, entrant dans la composition de nombreuses formulations vétérinaires, est préférable au Tween 80 préconisé par Pellecuer *et al.* (1976). Des essais comparatifs entre ces 2 émulsifiants ont permis de vérifier la répétabilité des résultats obtenus.

Les concentrations de solution mère dans le milieu de Sabouraud solide suivent une progression géométrique de raison 0,5, qui semble suffisante pour choisir une huile et une concentration thérapeutique de terrain.

Lecture

Les cultures sont observées après 4 jours pour noter l'aspect fongistatique, les cultures témoins occupant la surface de la boîte en 3 jours.

Le pouvoir fongicide est évalué par repiquage des cubes provenant des boîtes dans lesquelles il n'y a eu aucun développement mycélien pendant 7 jours.

La concentration minimale inhibitrice (CMI) ou fongistatique est déterminée après 4 jours d'incubation. La concentration minimale fongicide (CMF) est définie comme la concentration minimale interdisant la pousse du champignon pendant les 7 jours suivant le repiquage d'une culture inhibée durant 7 jours.

Essais de terrain

Dans le cadre d'une expérience menée en Haute-Garonne au mois de février, un rucher de 21 colonies atteintes d'ascosphaérose à des degrés divers a été divisé en 3 lots, chacun de ceux-ci contenant la même proportion de colonies peu ou pas, moyennement et fortement mycosées. L'huile essentielle de sarriette, choisie pour son activité antifongique et son appétence pour les abeilles, a été incorporée dans un nourrissage hivernal à base de candi au sucre aromatisé à 0,1% en volume. La dose par colonie traitée était de 1 ml d'huile de sarriette (ajoutée à un kilo de candi). Deux lots (7 ruches chacun) servaient de témoins : l'un a reçu du candi simple, l'autre n'a pas été nourri, car la complémentarité en sucre favoriserait la maladie selon les observations d'apiculteurs. Le nourrissage a été consommé en 3 semaines.

Pour juger de l'évolution de l'ascosphaérose, les larves mycosées, rejetées à l'extérieur de chaque ruche, sont dénombrées 2 fois par

semaine pendant 10 semaines. A la fin de cette période, une visite de printemps a permis d'évaluer le taux de larves atteintes demeurées dans les cadres de couvain.

Résultats

Les résultats de l'étude *in vitro* sont exprimés dans les figures 1, 2 et 3, dont l'ordonnée représente la moyenne des logarithmes népériens des CMI et CMF de l'huile essentielle (par rapport au volume du milieu) sur les 3 souches de champignons.

Un certain nombre d'huiles possèdent une CMF voisine de 0,05% (origan de la Drôme, sarriettes, thym 133, 077, 756, 557). Elles sont toutes généralement riches en carvacrol (taux > 30%), bien que ce composant ne soit probablement pas responsable à lui seul des propriétés antimycosiques.

L'huile de thym clone 133 montre une bonne stabilité des propriétés antifongiques en fonction de l'année de récolte (Fig. 3).

Pour l'essai de terrain, la concentration maximale incluse dans le nourrissage et n'entraînant aucun refus est de 0,1% pour la plupart des huiles.

Notre choix s'est arrêté sur la sarriette, qui était la moins chère des huiles efficaces.

L'évolution générale des lots (Fig. 4) montre une forte augmentation du nombre de larves mycosées dans les lots témoins pendant les 75 jours d'observation. Dans chacun des lots, une colonie n'a jamais présenté de rejet de momies; celle-ci n'a pas été mentionnée dans le Tableau III.

A la visite de printemps, l'analyse statistique (test de Mann-Witney) n'indique pas de différence significative entre les lots sur le critère «nombre de cadres de couvain». Les lots «sans candi» et «candi simple» ne se distinguent pas non plus avec les critères «nombre total de momies évacuées par les abeilles» et «nombre de larves momifiées sur les cadres» (Tableau III).

L'analyse de variance a été utilisée pour étudier l'efficacité du traitement et l'évolution du rejet des momies au cours

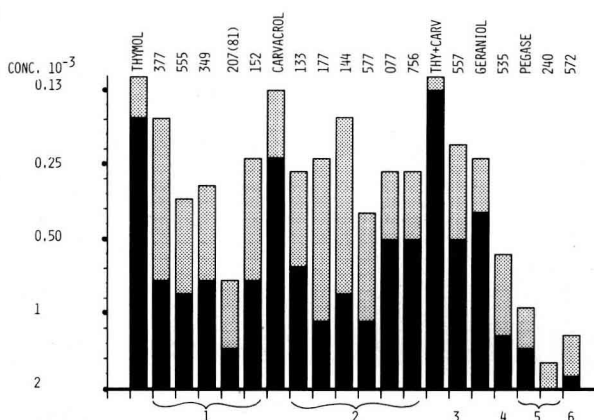


Fig. 1. Activités fongistatique et fongicide des différentes huiles essentielles de thym provenant de la Chambre d'agriculture de la Drôme. Chaque colonie indique les activités fongicide (en noir) et fongistatique (en blanc) du clone de thym en fonction de sa dilution dans le milieu de culture. 1 : type thymol (377, 555, 349, 207, 152); 2 : type carvacrol (133, 177, 144, 577, 077); 3 : type carvacrol-linalol (557); 4 : type géraniol (535); 5 : type linalol (Pégase, 240); 6 : type thuyanol (572).

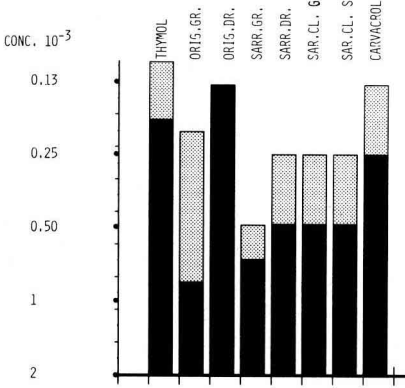


Fig. 2. Activités fongistatique et fongicide des huiles essentielles d'origan et de sarriette. Chaque colonne indique les activités fongistatique (en blanc) et fongicide (en noir) de cette huile en fonction de sa dilution dans le milieu de culture. «Orig.Gr» : origan provenant de Grasse; «Orig.Dr» : origan provenant de la Drôme; «Sarr.Gr» : sarriette provenant de Grasse; «Sarr.Dr» : sarriette provenant de la Drôme; «Sarr.cl. G» : sarriette clone G; «Sarr.cl. S» : sarriette clone S.

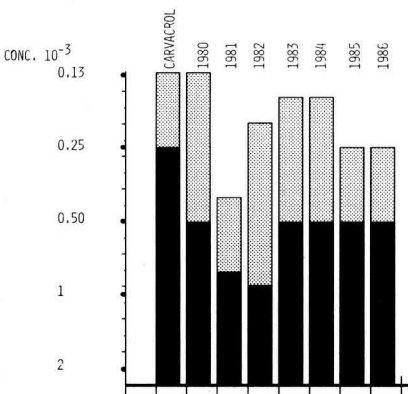


Fig. 3. Activités fongistatique et fongicide de l'huile essentielle de thym clone 133 (Chambre d'agriculture de la Drôme) en fonction de son année de récolte. Chaque colonne indique les activités fongicide (en noir) et fongistatique (en blanc) de ce clone.

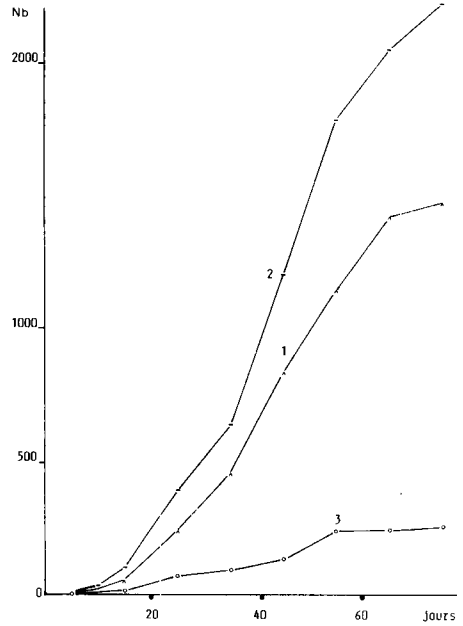


Fig. 4. Cinétique du rejet des larves mycosées par lots. En ordonnées : le nombre de momies évacuées par les abeilles. Chaque point représente le nombre total de momies recueillies par lot, depuis JO (début de l'expérience). 1 : colonie sans nourrissage; 2 : nourrissage au candi simple; 3 : nourrissage au candi aromatisé.

de la période d'observation, après réunion des 2 lots témoins. Respectivement, les valeurs de F calculées sont 5,49 ($P = 0,034$) et 1,99 ($P = 0,0748$). La différence entre les lots traité et témoin est significative au seuil de 5% pour le critère «efficacité» (Tableau III).

Discussion et Conclusion

Les essais *in vitro* montrent que plusieurs huiles essentielles sont très actives et mériteraient d'être essayées sur le terrain, en particulier le clone 133 du thym largement distribué dans la Drôme. Les huiles extraites du thym, de l'origan et de la sar-

Tableau III. Evolution des colonies entre JO et J75. De 1 à 5, numéros des ruches du lot «sans candi»; de 7 à 12, numéros des ruches du lot «candi simple»; de 14 à 19, numéros des ruches du lot «candi aromatisé». A, B, C, D, E, F, G : nombre de momies évacuées par intervalle de 10 jours; H : moyenne (m) et écart type (e) pour les 3 lots; I : nombre de cadres de couvain à J56; J : nombre de momies par cadre à J56.

| | A | B | C | D | E | F | G | H | I | J |
|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--------------------|---|----|
| 1 | 4 | 12 | 16 | 61 | 15 | 6 | 0 | } .m 296 .e 296 | 3 | 3 |
| 2 | 24 | 5 | 43 | 8 | 4 | 37 | 4 | | 4 | 0 |
| 3 | 9 | 46 | 189 | 110 | 152 | 25 | 13 | | 3 | 37 |
| 4 | 13 | 27 | 71 | 193 | 134 | 210 | 33 | | 5 | 82 |
| 5 | 0 | 0 | 5 | 9 | 0 | 0 | 0 | | 4 | 1 |
| 7 | 8 | 144 | 33 | 118 | 211 | 57 | 12 | } .m 371 .e 332 | 4 | 50 |
| 8 | 8 | 16 | 3 | 15 | 36 | 121 | 126 | | 4 | 4 |
| 9 | 38 | 30 | 84 | 86 | 73 | 56 | 6 | | 4 | 10 |
| 10 | 39 | 102 | 117 | 339 | 237 | 26 | 28 | | 2 | 11 |
| 11 | 0 | 0 | 8 | 8 | 8 | 1 | 0 | | 4 | 3 |
| 12 | 9 | 5 | 4 | 4 | 6 | 4 | 0 | | 3 | 24 |
| 14 | 6 | 17 | 8 | 16 | 13 | 4 | 5 | } .m 42 .e 40 | 3 | 14 |
| 15 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | | 4 | 0 |
| 16 | 6 | 12 | 6 | 0 | 15 | 0 | 0 | | 3 | 0 |
| 17 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | | 5 | 1 |
| 18 | 4 | 8 | 8 | 11 | 74 | 1 | 0 | | 5 | 1 |
| 19 | 4 | 11 | 2 | 14 | 0 | 0 | 0 | | 4 | 0 |

riette sont d'ailleurs considérées comme majeures en aromathérapie humaine (Belaiche, 1979). La constitution d'un dossier d'Autorisation de mise sur le marché d'une spécialité contenant une huile essentielle antimycosique est envisageable.

Sur le terrain, on note que l'administration de candi simple n'a pas favorisé l'ascospaerose par comparaison avec les ruches non nourries.

Dans ces conditions expérimentales, le traitement des colonies à l'huile de sarriette des montagnes s'est montré efficace. Il a réduit le taux d'infestation mycosique à un seuil permettant un bon développement printanier des colonies. Cependant, les possibilités de réinfestation de la colonie demeurent, car l'huile essentielle de sarriette n'est pas sporicide par ce mode d'administration. Il est important de souli-

gner la date de début du traitement (février), très antérieure à la reprise d'activité printanière normale dans cette région, mais qui paraît la plus adaptée à un traitement de fond de l'affection. D'un point de vue prophylactique, ce traitement doit être accompagné de l'élimination des colonies faibles et d'un effort de sélection de souches d'abeilles plus résistantes (Gilliam *et al.*, 1983).

Références

Allegrini J., Simeon de Buochberg M. & Pellecier J. (1974) Etude *in vitro* de l'activité antibactérienne et antifongique de l'essence de *Satureia montana* L. *J. Pharm. Belg.* 29, 137-144
 Belaiche P. (1979) *Traité de Phytothérapie et d'Aromathérapie. Tome II : Maladies Infectieuses.* Maloine, Paris

- Giauffret A. & Taliercio Y.P. (1967) Les mycoses de l'abeille (*Apis mellifica* L.). Etude de quelques antimycosiques. *Bull. Apic.* 10, 163-174
- Gilliam M., Taber S. & Richardson G.V. (1983) Hygienic behavior of honey bees in relation to chalk-brood disease. *Apidologie* 14, 29-39
- Gochnauer T.A., Boch R. & Margetts V.J. (1979) Inhibition of *Ascosphaera apis* by citral and geraniol. *J. Invertebr. Pathol.* 34, 57-61
- Gross J.P. (1984) *L'ascosphaerose de l'abeille domestique. Recherche de l'activité in vitro de trois huiles essentielles.* Thèse Méd.-Vét., Alfort
- Larribau E. (1985) *La lutte contre les mycoses de l'abeille domestique. Essai d'utilisation de l'huile essentielle de sarriette* (*Satureia montana*) *au laboratoire et au rucher.* Thèse Med.-Vét., Toulouse
- Lamy J. (1981) Rapport du Service technique et économique de la Chambre d'agriculture de la Drôme
- Lamy J., Passet J., Vernet P., Goyon P. & Valdeyron G. (1983) La variabilité chimique chez le thym (*Thymus vulgaris* L.). Bases scientifiques et applications agronomiques. *Proc. Intern. Symp. Arom. Plants, Sci. Ann. Fac. Phys. Math. Aristotelian Univ. Thessaloniki*, 22 (12) 48-52
- Pellecuer J., Allegrini J. & Simeon de Buochberg M. (1976) Huiles essentielles bactéricides et fongicides. *Rev. Inst. Pasteur Lyon* 9, 135-159