

Détermination de la DL₅₀ de l'amitraz et du coumaphos sur *Varroa jacobsoni* Oud au moyen des acaricides Anti-varroa (Schering) et Perizin (Bayer)

T Abed¹, J Ducos de Lahitte²

¹ Université d'Alep, faculté d'agronomie, département de protection des plantes, Alep, Syrie;

² École nationale vétérinaire de Toulouse, service de parasitologie-zoologie,
31076 Toulouse Cedex, France

(Reçu le 29 novembre 1992; accepté le 6 janvier 1993)

Résumé — Les auteurs décrivent une méthode originale de détermination de la DL₅₀ des produits acaricides sur *Varroa jacobsoni* libre. Cette méthode est appliquée à la détermination de la DL₅₀ à 24 h de l'amitraz sous la forme d'Anti-varroa® (Schering) et du coumaphos sous la forme de Perizin® (Bayer). Les DL₅₀ à 24 h de l'amitraz et du coumaphos dans les conditions expérimentales sont respectivement de 2,16 et 3,15 pg/varroa de principe actif. La DL₅₀ de l'Anti-varroa® (Schering) est de 17,3 pg/varroa, celle de Perizin® (Bayer) est de 98,4 pg/varroa. Les problèmes techniques et le choix de spécialités pharmaceutiques au lieu de molécules actives sont discutés.

Varroa jacobsoni / dose létale 50 / amitraz / coumaphos / résistance aux pesticides

INTRODUCTION

La varroase est devenue la préoccupation majeure de l'apiculture en France depuis la découverte du premier cas d'infestation par *Varroa jacobsoni* Oudemans (Acari, Varroidae) en Alsace, près de Wissembourg, au mois de novembre 1982 (Colin *et al.*, 1983). De nombreux produits acaricides ont été essayés pour lutter contre ce fléau, seules 4 spécialités ont obtenu une autorisation de mise sur le marché

(AMM) en France : dans l'ordre chronologique : Folbex VA® (Ciba Geygi), Anti-varroa® (Schering), Perizin® (Bayer), Apistan® (Zoecon).

Dans les ruchers, les utilisateurs ont parfois constaté une diminution d'efficacité des thérapeutiques et le problème de résistance aux acaricides a été évoqué. Cette baisse d'efficacité peut être liée à des facteurs externes, par exemple climatiques, ou à des défauts du mode d'application.

Pour prouver la réalité de ce phénomène de résistance, il convient de tester la toxicité de la molécule ou de la préparation pour des souches considérées comme sensibles et des souches suspectées de résistance. La comparaison de la dose létale 50 (DL₅₀), de la même présentation, est un moyen d'affirmer une diminution de sensibilité, ou une résistance totale dans le pire des cas (Brown, 1959).

Ce travail se propose de décrire une méthode simple de détermination de la DL₅₀ et l'application à 2 spécialités pharmaceutiques commercialisées en France : Anti-varroa® (Schering) et Perizin® (Bayer).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Anti-Varroa® (Schering) est une spécialité contenant 12,5% d'amitrazé, qui a obtenu une AMM en 1986 pour une utilisation en aérosol thermique : le produit dilué dans la proportion de 2% (v/v) dans l'eau, est envoyé dans la ruche, au moyen d'un générateur d'aérosol vrai pendant 1 min à 1 min 30 s. Cette technique, la seule officiellement autorisée pour ce produit, présentait initialement une efficacité de 95% (Marchetti et Barbattini, 1984).

Perizin® (Bayer) contient 3,2% (p/p) de coumaphos, composé organophosphoré. Cette spécialité a obtenu une AMM en 1987. Elle est utilisée en solution dans l'eau dans la proportion de 2% (v/v), distribuée en goutte à goutte sur les abeilles entre les cadres de la ruche, à raison de 50 ml pour une ruche moyenne. Initialement, en France, son efficacité était de 98,73% (Ducos de Lahitte, 1986, 1987).

Les cagettes utilisées pour ce travail sont en polycarbonate transparent, et mesurent 20 x 10 x 15 cm. Le couvercle est mobile et les pièces sont assemblées au moyen de bandelettes adhésives. Après chaque essai, les cagettes sont remplacées par des cagettes neuves pour éliminer les risques de résidus d'acaricides. Toutes les cagettes sont pourvues, comme nourrissement, d'une même quantité de miel et d'eau. La température d'essai est comprise entre 26 et 28 °C, l'humidité relative est de 70%.

Les abeilles et les varroas utilisés proviennent d'une ruche traitée 2 ans auparavant par de l'Anti-varroa® (Schering).

Les abeilles sont prélevées une à une et, sous une loupe binoculaire, les parasites sont séparés de leur hôte immobilisé, en les soulevant délicatement à l'aide d'un pinceau fin. L'acarien refuse de monter sur un pinceau propre, mais si on laisse, en revanche, le pinceau au contact de l'abeille parasitée, une quinzaine de secondes, le varroa monte sur le pinceau. La manipulation doit se faire avec délicatesse, afin de ne pas léser l'acarien.

Le varroa est déposé, pour le bloquer, sur une plaque de mousse, de 1 mm de maille environ. Il est ensuite traité par application de 0,25 µl d'une solution aqueuse d'acaricide à 20 °C, à l'aide d'une microseringue (Hamilton®).

Les solutions sont préparées extemporanément. On laisse sécher les acariens traités pendant 5 min, puis on fait remonter les acariens sur les abeilles, à raison d'un parasite par hôte. Cette opération est simple à réaliser, l'abeille qui était porteuse d'un acarien donné est approchée du parasite et celui-ci, au contact, monte sur l'abeille. Si au cours des manipulations le parasite a eu les chélicères ou la première paire de pattes atteintes, le varroa ne peut effectuer cette réinfestation. Il convient, dans la mesure du possible de remettre le varroa sur son hôte car on assiste, parfois, à des «refus» de certains varroas pour des abeilles différentes de leur hôte d'origine. Ce phénomène a été constaté comme une difficulté opératoire possible. Ses causes ne sont pas l'objet de ce travail. Vingt abeilles parasitées sont placées dans chaque cagette et on ajoute 10 abeilles indemnes.

Les mortalités de *Varroa jacobsoni* sont relevées après 24 h. Le calcul de la DL₅₀ est effectué au moyen d'un ordinateur PC IBM Compact Desk Pro 386/20 E, suivant la méthode de Lichtfield et Wilcoxon, au moyen du programme du *Manual of Pharmacologic Calculation*. Les courbes présentent la corrélation entre la dose et la mortalité, en utilisant la régression linéaire.

Chaque série comporte une cagette témoin, dans laquelle les varroas sont traités par 0,25 µl d'eau à 20 °C.

Pour l'Anti-varroa® (Schering), les parasites ont été traités par 0,25 µl de solution déposés sur la face dorsale de l'acarien. Différentes concentrations d'Anti-varroa® (Schering), allant de 10⁻² à 25·10⁻⁹ (v/v), ont été testées.

Pour Perizin[®], 5 concentrations de produit variant de $2 \cdot 10^{-6}$ à $25 \cdot 10^{-8}$ (v/v) ont été utilisées, déposées sur la face ventrale du parasite près de chélicères, à raison de 0,25 µl. Les mortalités ont été relevées à 24 h. Les essais sont réalisés avec des témoins (tableau I).

RÉSULTATS

Anti-varroa (Schering)

Pour les solutions contenant plus de $25 \cdot 10^{-6}$ (v/v) d'Anti-varroa[®] (Schering), le taux de mortalité est de 100%. Les 5

concentrations inférieures entraînent une létalité à 24 h, variant de 84% pour $25 \cdot 10^{-7}$ (v/v) à 24% pour $25 \cdot 10^{-9}$ (v/v) (tableau II).

Les taux de mortalité des varroas aux différentes concentrations sont rapportés sur la courbe de toxicité qui a permis de déterminer la DL₅₀ de l'Anti-varroa[®] (Schering) (fig 1).

La DL₅₀ de l'Anti-varroa[®] (Schering) dans les conditions expérimentales sur cette souche de varroa est de 17,3 pg/varroa pour une sécurité de 0,95, avec un intervalle de moyenne de 11,7 à 25,6 pg/varroa.

L'Anti-varroa[®] (Schering) contenant 12,5% (p/p) (d'amitraze, la DL₅₀ de l'ami-

Tableau I. Efficacité de Perizin[®] Bayer déposé sur la face ventrale de *Varroa jacobsoni*.

Concentration de Perizin (%)	N° de cagette	Nb varroas morts/20		Mortalité (%)		Moyennes des mortalités	
		24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
$2 \cdot 10^{-4}$	1	10	18	50	90	73,2	96,6
	2	15	20	75	100		
	3	19	20	95	100		
	4 (T)	0	0	0	0		
$1 \cdot 10^{-4}$	1	10	13	50	65	46,6	76,6
	2	9	16	45	80		
	3	9	17	45	85		
	4 (T)	0	0	0	0		
$0,5 \cdot 10^{-4}$	1	6	14	30	70	26,6	60
	2	4	10	20	50		
	3	6	12	30	60		
	4 (T)	0	1	0	5		
$0,33 \cdot 10^{-4}$	1	4	11	20	55	21,6	53,3
	2	4	10	20	50		
	3	5	11	25	55		
	4 (T)	0	0	0	0		
$0,25 \cdot 10^{-4}$	1	4	7	20	35	18,3	38,3
	2	3	8	15	40		
	3	4	4	20	40		
	4 (T)	0	0	0	0		

T : cagette témoin.

Tableau II. Mortalité de *Varroa jacobsoni* à 24 h, avec Antivarroa (Schering).

Concentration d'Antivarroa (%)	Nb varroas morts dans les cagettes						Mortalité après 24 h (%)
	1	2	3	4	5	6 (T)	
1	20	20	20	20	20	1	100
0,5	20	20	20	20	20	0	100
0,25	20	20	20	20	20	1	100
0,125	20	20	20	20	20	1	100
0,025	20	20	20	20	20	0	100
0,002 5	20	20	20	20	20	0	100
$25 \cdot 10^{-5}$	16	18	16	16	18	0	84
$12,5 \cdot 10^{-5}$	12	14	16	10	12	0	64
$2,5 \cdot 10^{-5}$	12	14	10	10	12	0	58
$0,625 \cdot 10^{-5}$	8	6	10	4	14	0	42
$0,25 \cdot 10^{-5}$	6	4	4	6	4	1	24

T : cagette témoin.

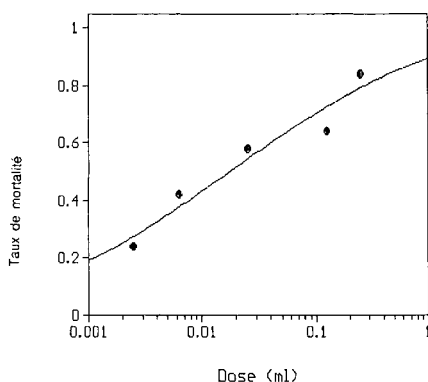


Fig 1. Courbe de DL_{50} d'Anti-varroa (Schering) sur *Varroa jacobsoni* à 24 h ($P < 0,05$). DL_{50} = 17,3 pg/varroa, avec un intervalle de moyenne 11,7 et 25,6 pg/varroa.

traze sous cette formulation d'Anti-varroa® (Schering) est de 2,16 pg/varroa, avec un intervalle de moyenne entre 1,46 et 3,2 pg/varroa ($P < 0,05$).

Perizin (Bayer)

Pour les essais effectués avec cet acaricide, un problème s'est posé au cours des manipulations : au début, l'application de 0,25 μ l de solution a été réalisée sur la face dorsale, mais pour 2 concentrations différentes, appliquées lors de 2 essais, $2 \cdot 10^{-6}$ et $33 \cdot 10^{-8}$ (v/v), les taux de mortalité ont montré de grandes différences (tableau III). Nous avons dû chercher un point d'application donnant des résultats plus constants. Différents essais nous ont amené à choisir la face ventrale de *Varroa jacobsoni*, près des chélicères.

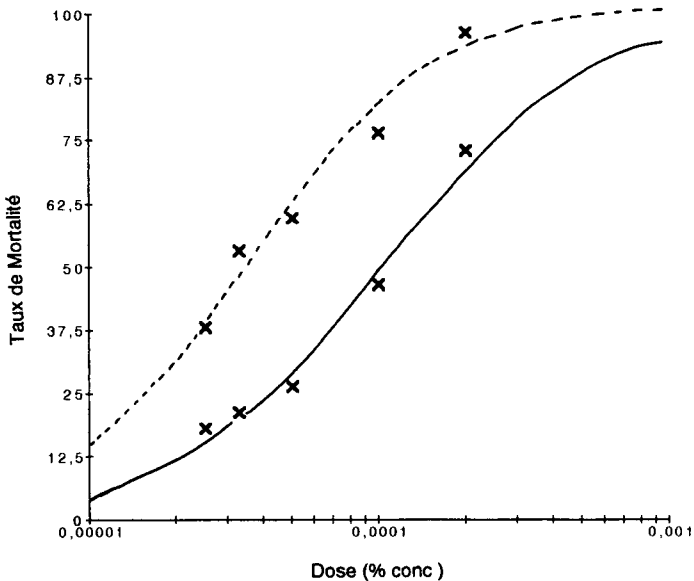
Le calcul de la DL_{50} après 24 h pour Perizin® (Bayer) donne DL_{50} : 98,4 pg/varroa, avec un intervalle de moyenne de 79,1 à 122,3 pg/varroa, pour une sécurité de 0,95.

Ainsi, la DL_{50} après 24 h du coumaphos sous la forme Perizin® (Bayer) est 3,15 pg/varroa, avec un intervalle de moyenne entre 2,53 et 3,91 pg/varroa.

Tableau III. Variations d'efficacité de Perizin (Bayer) sur la face dorsale de *Varroa jacobsoni*.

Concentration de Perizin (%)	Essai	N° de cagette	Nb varroas morts/20		Mortalité (%)		Moyenne des mortalités	
			24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
2·10 ⁻⁴	I	1	14	14	70	70	61,66	63,33
		2	10	11	50	55		
		3	13	13	65	65		
		4 (T)	0	0	0	0		
	II	1	7	8	35	40	41,66	44,9
		2	10	10	50	50		
		3	8	9	40	45		
		4 (T)	0	1	0	5		
0,33·10 ⁻⁴	I	1	3	3	15	15	11,6	11,6
		2	2	2	10	10		
		3	2	2	10	10		
		4 (T)	0	0	0	0		
	II	1	3	3	15	15	13,3	14,9
		2	4	4	20	20		
		3	1	2	5	10		
		4 (T)	0	0	0	0		

T: cagette témoin.

**Fig 2.** Courbes de DL₅₀ de Perizin® (Bayer) sur *Varroa jacobsoni* ($P < 0,05$). — à 24 h : DL₅₀ = 98,4 pg/varroa, avec un intervalle de moyenne 79,1–122,3 pg/varroa; - - - à 48 h : DL₅₀ = 35,2 pg/varroa, avec un intervalle de moyenne 29,4–41,2 pg/varroa.

Les taux de mortalité du varroa aux différentes concentrations sont rapportées sur la courbe de toxicité, qui nous a permis de déterminer la DL₅₀ du Perizin® (Bayer) à 24 h et à 48 h (fig 2).

DISCUSSION

Les problèmes rencontrés au cours des essais ont amené à des adaptations d'une méthode dont le principe est simple. Il convient, pour que les résultats soient reproductibles ou comparables, que les conditions de réalisation des essais soient parfaitement définies. Le point de dépôt de la solution acaricide doit être défini avec précision. Le temps de la lecture doit être précisé. En effet, les mortalités évoluent dans le temps, et si la lecture est effectuée après 48 h et non 24 h, les résultats sont différents. Cela a été effectué pour les essais avec Perizin® (Bayer) et les taux de mortalité ont augmenté, permettant de calculer une DL₅₀ Perizin® (Bayer) à 48 h de 35,2 pg/varroa, avec un intervalle de moyenne entre 29,4 et 41,2 pg/varroa pour une sécurité de 0,95 (tableau I).

La DL₅₀ du coumaphos sous forme Perizin® (Bayer) à 48 h est 1,13 pg/varroa, avec un intervalle de moyenne entre 0,94 et 1,32 pg/varroa.

La présentation utilisée doit aussi être précisée. Nous avons opté pour des présentations commerciales des produits acaricides, pour différentes raisons.

Ces formulations sont plus faciles à se procurer que les principes actifs purs. Ce sont ces formes galéniques qui sont utilisées dans la pratique et la toxicité peut être modulée par les excipients, qui en particulier, interviennent pour rendre plus solubles certains composants (le cou-

maphos dans le Perizin® Bayer par exemple).

D'un point de vue administratif, dans les dossiers de pharmacotoxicologie, pour les demandes d'AMM, les autorités demandent que les essais soient conduits, chaque fois que cela est possible, avec le produit fini, et non avec le seul principe actif, à cause d'interactions possibles entre les constituants du médicament.

Dans le cas de Perizin® (Bayer), le produit, qui est utilisé habituellement comme systémique, a été testé par contact avec le parasite, par souci de simplification de la méthode. Le passage par les abeilles, habituel lors du traitement d'une ruche, est une étape de réalisation délicate, qui pourrait compliquer les calculs par les facteurs de variations supplémentaires provenant des abeilles.

L'originalité de la méthode réside, aussi, dans le fait que les acariens restent libres sur les abeilles, ils peuvent donc s'alimenter, évitant ainsi la mortalité par inanition qui existe dans les méthodes classiquement utilisées, dérivant des techniques d'acarologie pratiquées sur les tiques, où les varroas sont collés sur des morceaux de bristol.

La technique proposée se rapproche davantage de la réalité, où l'acarien peut trouver dans l'hémolymphe de l'abeille, outre sa nourriture, des éléments modulant la toxicité du produit utilisé.

CONCLUSION

La méthode proposée est de réalisation relativement simple, mais la description du protocole doit être de la plus grande rigueur, afin de rendre comparables les résultats obtenus dans différents laboratoires.

REMERCIEMENTS

Ce travail sur les doses létales 50% et les résistances de varroa aux acaricides a été permis grâce à une subvention d'Intermiel.

Summary — Determination of LD₅₀ of amitraz and coumaphos on *Varroa jacobsoni* Oud by means of Anti-varroa® (Schering) and Perizin® (Bayer) acaricides. The occurrence of a resistance phenomenon in *Varroa jacobsoni* can be shown by comparing the LD₅₀ of an acaricide formula over time. This work proposes a simple method for determining the LD₅₀ and applies it to 2 compounds: Anti-varroa® (Schering) and Perizin® (Bayer). Tests were made in polycarbonate boxes which were changed each time. Temperature was 26–28 °C, humidity 70%. *Varroa* mites were taken from infested bees with a paintbrush and immobilized on a foam-rubber bed. 0.25 ml of an acaricide solution was applied *via* a microsyringue. The mites were then replaced on the bees. Each box contained 20 infested bees and 10 non-infested bees. Different solutions of the acaricide were tested to determine a toxicity curve and to calculate the LD₅₀ after 24 h by the method of Lichtfield and Wilcoxon (Thalarida and Murry, 1988). The mean LD₅₀ of Anti-varroa® was 17.3 pg per *varroa* (11.7–25.6 pg per *Varroa*; $P < 0.05$). The LD₅₀ of amitraz in the product Anti-varroa® was 2.16 pg per *Varroa* (1.46–3.2 pg). The mean LD₅₀ of Perizin® was 98.4 pg per *varroa* (79.1–122.3 pg per *Varroa*; $P < 0.05$). The LD₅₀ of coumaphos in the product Perizin® was 3.15 pg per *Varroa* (2.53–3.91 pg). The experimental conditions must be accurate in order to obtain reproducible or comparable results: the area where the acaricide solution is deposited must be precisely defined and the reading time specified. Commercial products were used in this study because exci-

pients may influence the toxicity of the active ingredients. This method, using free *Varroa* mites on bees is more representative of the actual field conditions than methods using isolated mites.

***Varroa jacobsoni* / lethal dose 50 / amitraz / coumaphos / pesticide resistance**

Zusammenfassung — Bestimmung der LD₅₀ von Amitraz und Coumaphos gegenüber *Varroa jacobsoni* Oudemans (Für die Akarizide Antivarroa (Schering) und Perizin (Bayer)). Das Auftreten von Resistenzerscheinungen bei *Varroa jacobsoni* kann durch den Vergleich der LD₅₀ eines *Varroa*-Präparates im Laufe der Zeit nachgewiesen werden. In dieser Arbeit wird eine einfache Methode zur Bestimmung der LD₅₀ für zwei Präparate vorgeschlagen, und zwar für Antivarroa Schering und Perizin Bayer.

Die Versuche wurde in jedesmal gewechselten Kunststoffboxen durchgeführt. Die Temperatur betrug 23–28 °C, die rel Feuchte 70%. *Varroa*-Milben wurden mit einem feinen Pinsel von einer Biene aufgenommen, auf einer Unterlage aus Schaumgummi fixiert und mittels einer Mikrospritze mit 0,25 µl einer Akarizidlösung übertraufelt. Dann wurden die Milben auf die Biene zurückgesetzt. Jede Box enthielt 20 befallene und 10 gesunde Bienen. Es wurden verschiedene Konzentrationen des Akarizids getestet, um eine Kurve der Toxizität zu gewinnen und die LD₅₀ nach 24 h entsprechend der Methode von Lichtfield und Wilcoxon zu berechnen.

Die mittlere LD₅₀ von Antivarroa Schering beträgt 17,3 pg pro *Varroa* (11,7–25,6 pg pro *Varroa* mit 0,95 Wahrscheinlichkeit). Die LD₅₀ von Amitraz in dem Präparat Antivarroa Schering liegt bei 2,16 pg pro *Varroa* (1,46–3,2 pg). Die mittlere LD₅₀ von Perizin Bayer beträgt 98,4 pg pro

Varroa (79,1–122,3 pg pro *Varroa*, mit 0,95 Wahrscheinlichkeit). Die LD₅₀ von Coumaphos in dem Präparat Perizin Bayer beträgt 3,15 pg pro *Varroa* (2,53–3,91 pg).

Die Versuchsbedingungen sollten immer exakt sein. Kommerzielle Präparate wurden deshalb benutzt, weil Zusätze die Toxizität der aktiven Substanz beeinflussen könnten. Diese Methode, bei der frei an Bienen gehaltene *Varroa*-Milben benutzt werden, berücksichtigt die Feldbedingungen besser als gängige Methoden mit isolierten Milben.

***Varroa* / LD₅₀ / Amitraz / Coumaphos /
Medikamenten-Resistenz**

RÉFÉRENCES

- Brown A (1959) *Résistance des arthropodes aux insecticides*. OMS, Genève, monographie n° 38, 260 p
- Colin ME, Faucon JP, Herinrich A, Ferry R, Giauffret A (1983) Étude du premier foyer français de varroase de l'abeille. *Bull Acad Vét Fr* 56, 89-93
- Ducos de Lahitte J (1986) Essai Perizin-Amitraz. *Rev Fr Apic suppl juillet*, 4-5
- Ducos de Lahitte J (1987) Perizin. Utilisation, efficacité, toxicité. *Rev Fr Apic* 461, 137-139
- Marchetti S, Barbattini R (1984) Comparative effectiveness of treatments used of control *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie* 15 (4), 363-378
- Thalarida E, Murry S (1988) *Manual of Pharmacologic Calculation with Computers Program*