

---

## **Co-expositions des abeilles aux facteurs de stress**

---

**Saisine 2012-SA-0176**

### **RAPPORT d'expertise collective**

**Comité d'experts spécialisé Santé animale**

**Groupe de travail « Co-expositions des abeilles aux facteurs de stress »**

**Avril 2015**

## Mots clés

---

Abeille, *Apis mellifera*, co-expositions, interactions, facteurs de stress

## Présentation des intervenants

**PREAMBULE** : les experts, membres de comités d'experts spécialisés, de groupes de travail ou désignés rapporteurs sont tous nommés à titre personnel, *intuitu personae*, et ne représentent pas leur organisme d'appartenance.

### GRUPE DE TRAVAIL « CO-EXPOSITIONS DES ABEILLES AUX FACTEURS DE STRESS »

#### Président

M. Yves LE CONTE – Directeur de recherche, INRA Avignon - Compétences en infectiologie, toxicologie, physiologie, immunologie des abeilles, dans le domaine des interactions pathogènes/ pesticides/ phéromones

#### Membres

M. Cédric ALAUX – Chargé de recherche, INRA Avignon - Compétences en toxicologie, physiologie, immunologie et parasitologie, sur les interactions pathogènes/ pesticides/ phéromones

M. Gérard ARNOLD – Directeur de recherche, laboratoire LEGS, CNRS Gif/ Yvette- Compétences en physiologie et comportements des abeilles, toxicologie des pesticides.

M. Pierrick AUPINEL – Directeur d'unité, INRA Le Magneraud - Compétences en écotoxicologie, pesticides, toxicocinétique

Mme Suzanne BASTIAN – Maître de conférences, Oniris Nantes - Compétences en épidémiologie, bactériologie, parasitologie et pathologie des abeilles

M. Jean-Marc BONMATIN – Chercheur, CNRS Orléans —Compétences en analytique de résidus (méthodes et validations), neurotoxiques du système nerveux central (venins, pesticides), toxicologie des pesticides (mode d'action, métabolisme et effets à faibles doses), interactions croisées toxiques/sols/eau/plantes/abeilles

Mme Magali CHABERT – Chef d'unité pathologie de l'abeille, Anses laboratoire de Sophia Antipolis – Compétences en pathologie/ virologie des abeilles

M. Axel DECOURTYE – Responsable scientifique, Institut technique et scientifique de l'apiculture et de la pollinisation - Institut de l'abeille, – Compétences en écotoxicologie, toxicocinétique, physiologie des abeilles

M. Frédéric DELBAC – Directeur adjoint, Laboratoire Microorganismes Génome et Environnement UMR CNRS 6023, Université Blaise Pascal Clermont-Ferrand – Compétences en pathologie infectieuse, immunologie, interactions agents pathogènes/ pesticides

M. James DEVILLERS – Directeur, Centre de traitement de l'information scientifique – Compétences en écotoxicologie, pesticides et modélisation

Mme Anne-Claire MARTEL – Chargée de projet scientifique, Anses laboratoire de Sophia Antipolis – Compétences dans le domaine des pesticides et des dosages des contaminants chimiques

M. Franco MUTINELLI – Responsable du Laboratoire national de référence en pathologie apicole à l'Institut zooprophyllactique de Vénétie – Compétences en pathologie infectieuse des abeilles

M. Bach Kim NGUYEN – Assistant de recherche et de pédagogie, Unité d'entomologie, Université de Gembloux – Compétences en épidémiologie quantitative, modélisation, pathologie des abeilles. Il convient de noter que, depuis janvier 2014, M. Nguyen a participé à deux des réunions du GT et n'est pas intervenu dans la validation du rapport

Mme Bertille PROVOST – Responsable du groupe « pathologie des abeilles », Laboratoire de pathovigilance et de développement apicole, Université Montpellier SupAgro – Compétences en immunologie des insectes, interactions hôtes / pathogènes, physiologie de la reproduction chez les abeilles

Mme Freddie-Jeanne RICHARD – Maître de conférences, Laboratoire Ecologie et Biologie des Interactions, Université de Poitiers – Compétences en physiologie et écologie comportementale de l'insecte, immunité sociale

M. Christophe ROY – Vétérinaire praticien, clinique vétérinaire des Mazets – Compétences en pathologie clinique des abeilles

M. Cyril VIDAU – Ecotoxicologue, Institut technique et scientifique de l'apiculture et de la pollinisation - Institut de l'abeille – Compétences en pathologie infectieuse des abeilles, physiologie, immunologie et toxicologie des abeilles

## COMITE D'EXPERTS SPECIALISE

---

Les travaux, objets du présent rapport ont été suivis et adoptés par le CES suivant :

- CES Santé animale – Dates des passages en CES : 17 02 2015

### Président

M. Etienne THIRY – Professeur, Faculté de médecine vétérinaire de Liège (infectiologie, immunologie, vaccinologie, virologie)

### Membres

Mme Suzanne BASTIAN – Maître de conférence, ONIRIS Nantes (épidémiologie, bactériologie, parasitologie, pathologie des abeilles)

M. Christophe CHARTIER – Professeur, ONIRIS Nantes (parasitologie, pathologie des petits ruminants)

Mme Véronique CHEVALIER – Chercheur épidémiologiste, CIRAD-EMVT (épidémiologie, pathologie aviaire exotique)

M. Eric COLLIN – Vétérinaire praticien (pathologie des ruminants)

M. Philippe DORCHIES – Professeur émérite, ENV Toulouse (parasitologie, zoonoses)

Mme Barbara DUFOUR – Professeur, ENV Alfort (épidémiologie, maladies infectieuses, pathologie des ruminants)

M. Gilles FOUCRAS – Professeur, ENV Toulouse (immunologie, génétique, pathologie des ruminants)

M. Jean-Pierre GANIERE – Professeur émérite, ONIRIS Nantes (maladies contagieuses, réglementation, zoonoses)

M. Bruno GARIN-BASTUJI – Chef de l'unité Zoonoses bactériennes, Anses Laboratoire de santé animale de Maisons-Alfort (bactériologie – brucellose, tuberculose)

M. Jean GUILLOTIN – Directeur du Laboratoire départemental du Nord (diagnostic de laboratoire, infectiologie)

Mme Nadia HADDAD – Enseignant chercheur, Directrice adjointe de l'UMR BIPAR, ENV Alfort (microbiologie, épidémiologie, maladies contagieuses)

M. Jean HARS – Chargé de mission par le MAAPRAT, Office national de la chasse et de la faune sauvage (pathologie de la faune sauvage libre, épidémiologie)

Mme Claire LAUGIER – Directrice du Laboratoire de pathologie équine, Anses Dozulé (pathologie équine, diagnostic de laboratoire)

Mme Arlette LAVAL – Professeur émérite, Oniris Nantes (pathologie porcine)

M. Yves LEFORBAN – Retraité (virologie, réglementation)

Mme Coralie LUPO – Chercheur épidémiologiste, IFREMER (épidémiologie, pathologies aviaire et aquacole)

M. Gilles MEYER – Maître de conférence, ENV Toulouse (pathologie des ruminants, virologie)

Mme Virginie MICHEL – Chef d'unité de recherche, Anses Laboratoire de Ploufragan/Plouzané (pathologie aviaire, bien-être animal)

M. Yves MILLEMANN – Professeur, chef de département, ENV Alfort (pathologie des animaux de rente, épidémiologie, bactériologie)

Mme Sophie MOLIA – Chercheur, CIRAD (épidémiologie, pathologie tropicale)

M. Pierre MORMEDE – Chercheur, INRA - Centre de Recherches de Toulouse (génétique du stress, endocrinologie, bien-être animal)

M. Philippe NICOLLET – Directeur du Laboratoire d'analyses de Vendée (diagnostic de laboratoire)

M. Jean-Louis PELLERIN – Professeur, Oniris Nantes (microbiologie, immunologie)

Mme Nathalie RUVOEN – Enseignant chercheur, ONIRIS Nantes (maladies contagieuses, zoonoses, réglementation)

M. Claude SAEGERMAN – Professeur, Faculté de médecine vétérinaire de Liège (épidémiologie, maladies contagieuses, maladies émergentes)

M. Bernard TOMA – Professeur émérite, ENV Alfort (épidémiologie, maladies contagieuses)

Mme Jaqueline VIALARD – Directrice du Laboratoire de Niort, Anses (pathologie infectieuse, pathologie des ruminants)

M. Stéphan ZIENTARA – Directeur UMR Virologie, Anses Laboratoire de santé animale de Maisons-Alfort (virologie)

## **PARTICIPATION ANSES**

---

### **Coordination scientifique**

Mme Catherine COLLIGNON – Chef de projet scientifique – Anses Direction de l'évaluation des risques (DER), Unité d'évaluation des risques liés à la santé, à l'alimentation et au bien-être des animaux (UERSABA)

Mme Edith AUTHIE – Adjointe du directeur de l'évaluation des risques – Anses DER

Mme Florence ETORE – Adjointe de la responsable de l'UERSABA

### **Contribution scientifique**

Mme Christine VERGNET – Anses Direction des Produits Réglementés (DPR)

Mme Stéphanie BOUGEARD – Anses Ploufragan

M. Thibault GAUDUCHON

M. Antoine JACQUES

Mme Hélène ROUL

**Secrétariat administratif**

Mme Françoise LOURENCO – Anses DER

**Unité d'évaluation des risques liés à la santé, à l'alimentation et au bien-être des animaux – Anses DER**

Mme Charlotte DUNOYER – Responsable

**AUDITION DE PERSONNALITES EXTERIEURES**

---

**Anses – Unité SURVEPI**

M. Pascal HENDRIKX

Mme Marie-Pierre CHAUZAT

**Brigade nationale d'enquêtes vétérinaires et phytosanitaires (BNEVP)**

Mme Catherine COLLINET

M. Jean-Blaise DAVAINE

**Conseil général de l'alimentation, de l'agriculture et des espaces ruraux (CGAAER)**

M. François GERSTER

**Direction générale de l'alimentation**

M. Alexandre FEDIAEVSKY

M. Fatah BENDALI

**Fédération Nationale des Organisations Sanitaires Apicoles Départementales (FNOSAD)**

M. Jean Marie BARBANCON

**Laboratoire départemental d'analyses du Jura (LDA39)**

M. Alain VIRY

**ONIRIS-Nantes – Centre Vétérinaire de la Faune Sauvage et des Ecosystèmes – Plateforme Environnementale**

Mme Monique L'HOSTIS

## SOMMAIRE

<b>Présentation des intervenants .....</b>	<b>3</b>
<b>Glossaire .....</b>	<b>12</b>
<b>Sigles et abréviations .....</b>	<b>14</b>
<b>Liste des tableaux.....</b>	<b>16</b>
<b>Liste des figures .....</b>	<b>16</b>
<b>1 Contexte, objet et modalités de traitement de la saisine.....</b>	<b>18</b>
1.1 Contexte.....	18
1.2 Objet de l'autosaisine .....	19
1.3 Modalités de traitement : moyens mis en œuvre .....	19
<b>2 Etat de la colonie : définitions, outils de mesure, indicateurs de santé ...</b>	<b>21</b>
2.1 Etat de santé des colonies d'abeilles .....	22
2.1.1 Introduction .....	22
2.1.2 Evolution annuelle de la population dans une colonie.....	22
2.1.3 Etat de santé des colonies d'abeilles.....	24
2.1.3.1 Niveau de la population des abeilles adultes.....	24
2.1.3.2 Niveau de la ponte de la reine.....	24
2.1.3.3 Niveau d'activité de la colonie .....	25
2.1.3.4 Niveau de mortalité normal des abeilles d'une colonie.....	25
2.1.3.5 Niveau d'agents infectieux .....	25
2.2 Outils d'évaluation de la santé des abeilles / colonies d'abeilles.....	25
2.2.1 L'évaluation de la santé d'une colonie d'abeilles.....	26
2.2.1.1 L'examen clinique.....	26
2.2.1.2 Examens complémentaires en cas de suspicion de maladie infectieuse ou d'intoxication.....	27
2.2.2 Evaluation de la santé des abeilles, à l'échelle de l'individu .....	28
2.2.2.1 Examen clinique de l'abeille .....	28
2.2.2.2 Examen clinique du couvain.....	29
2.2.2.3 Outils d'évaluation de la santé des abeilles disponibles en recherche scientifique .....	29
2.2.2.3.1 Tests de comportement.....	29
2.2.2.3.2 Biomarqueurs individuels .....	30
2.2.2.3.3 Poids des abeilles émergentes.....	30
2.2.2.3.4 Radioentomologie .....	30
2.2.2.3.5 Examen anatomopathologique.....	30
2.2.3 Outils disponibles pour évaluer la force d'une colonie à un temps T .....	30
2.2.3.1 Evaluation du nombre total d'abeilles.....	30
2.2.3.2 Evaluation de la surface de couvain.....	31
2.2.3.3 Estimation de l'activité de butinage .....	31
2.2.3.4 Estimation de la mortalité des butineuses .....	32
2.2.3.5 Estimation de la mortalité dans la colonie .....	32
2.2.3.6 Estimation de la ponte de la reine .....	32
2.2.3.7 Autres méthodes et techniques d'évaluation.....	33
2.2.4 Outils disponibles pour suivre l'évolution d'une colonie pendant une période P .....	33
2.2.4.1 Données de production .....	33
2.2.4.2 Suivi de la population .....	34
2.2.4.3 Suivi de la température du couvain .....	34
2.2.4.4 Modèles mathématiques .....	35

2.2.5 Outils manquants .....	35
2.2.5.1 Outils diagnostiques .....	35
2.2.5.2 Estimation des mortalités .....	35
2.2.5.3 Estimation de la répartition des classes d'âge.....	36
2.2.5.4 Données prédictives pour estimer le devenir d'une colonie .....	36
<b>2.3 Propositions d'indicateurs de la santé des abeilles / colonies d'abeilles .....</b>	<b>36</b>
2.3.1 Indicateurs utilisables par l'apiculteur .....	36
2.3.2 Indicateurs utilisables par le vétérinaire clinicien.....	37
2.3.3 Indicateurs utilisables par le chercheur .....	37
<b>2.4 Conclusions / recommandations .....</b>	<b>38</b>
<b>3 Facteurs de stress .....</b>	<b>39</b>
<b>3.1 Données bibliographiques .....</b>	<b>39</b>
3.1.1 Facteurs biologiques.....	39
3.1.1.1 Introduction.....	39
3.1.1.2 Présentation des dangers biologiques d'intérêt dans le cadre des co-expositions et interactions, en France métropolitaine.....	40
3.1.1.2.1 Bactéries .....	40
3.1.1.2.2 Virus.....	44
3.1.1.2.3 Champignons.....	55
3.1.1.2.4 Parasites .....	60
3.1.1.2.5 Prédateurs : frelon asiatique.....	64
3.1.1.3 Portage asymptomatique .....	65
3.1.1.3.1 Agents infectieux et parasitaires trouvés dans les colonies asymptomatiques. Statut du rucher. Agents associés .....	66
3.1.1.3.2 Fréquence dans les ruchers et les colonies. Aspects saisonniers et géographiques .....	72
3.1.1.3.3 Aspects quantitatifs de charge infectieuse ou parasitaire en absence de signes cliniques .....	74
3.1.1.3.4 Caractère prédictif du portage pour des troubles ultérieurs, en particulier la mortalité hivernale .....	76
3.1.2 Facteurs chimiques.....	77
3.1.2.1 Méthodes de mise en évidence d'effets toxiques au niveau individuel chez les abeilles .....	77
3.1.2.1.1 Tests neuronaux et comportementaux .....	77
3.1.2.1.2 Tests de motricité .....	78
3.1.2.1.3 Tests physiologiques.....	78
3.1.2.1.4 Tests moléculaires .....	79
3.1.2.2 Insecticides.....	79
3.1.2.2.1 Insecticides néonicotinoïdes et fipronil et leurs effets sublétaux .....	79
3.1.2.2.2 Insecticides inhibiteurs de croissance (IGR) .....	90
3.1.2.3 Fongicides et herbicides.....	94
3.1.2.3.1 Effets des fongicides .....	94
3.1.2.3.2 Exposition des colonies d'abeilles aux fongicides et aux herbicides .....	94
3.1.2.4 Antibiotiques.....	97
3.1.2.4.1 Aspects réglementaires.....	97
3.1.2.4.2 Usage des antibiotiques chez les abeilles hors Union européenne.....	98
3.1.2.4.3 Conséquences de l'utilisation des antibiotiques dans la ruche .....	99
3.1.2.5 Traitements antiparasitaires dirigés contre <i>Varroa</i> : effets toxiques pour les abeilles .....	102
3.1.2.5.1 Les pesticides organiques de synthèse.....	102
3.1.2.5.2 Produits d'origine naturelle .....	105
3.1.2.6 Polluants industriels .....	109
3.1.2.7 Autres : OGM .....	109
3.1.2.7.1 Introduction.....	109
3.1.2.7.2 Effets liés à l'exposition aux toxines de <i>Bt</i> .....	110
3.1.2.7.3 Inhibiteurs de protéases.....	110
3.1.2.7.4 Autres produits des transgènes.....	111
3.1.3 Alimentation et ressources environnementales .....	112
3.1.3.1 Besoins nutritionnels de la colonie .....	113
3.1.3.2 Disponibilité des ressources alimentaires .....	113
3.1.3.3 Effet de la disponibilité des ressources alimentaires sur la santé des abeilles.....	114
3.1.3.3.1 Abondance .....	114
3.1.3.3.2 Qualité.....	115



3.1.3.3	Diversité .....	115
3.1.3.4	Lacunes/perspectives.....	116
3.1.4	Pratiques apicoles.....	116
3.1.4.1	Impact potentiel de certaines pratiques apicoles.....	117
3.1.4.2	Impact potentiel de certaines pratiques inadaptées ou non réalisées .....	119
3.1.5	Facteurs climatiques .....	122
3.1.5.1	Impacts directs sur le développement des colonies d'abeilles .....	123
3.1.5.2	Effets indirects sur le développement des colonies d'abeilles .....	124
3.1.5.3	Conclusion.....	124
3.1.6	Facteurs physiques : champs électromagnétiques .....	125
3.1.7	Altérations de la structure de la colonie.....	125
<b>3.2</b>	<b>Présentation et analyse de données sur des expositions à des facteurs biologiques et chimiques en France (aspects monofactoriels).....</b>	<b>126</b>
3.2.1	Objectifs de l'examen des données d'exposition disponibles.....	126
3.2.2	Présentation synthétique des neuf jeux de données examinés et des informations apportées par chacun pour les besoins de la saisine .....	129
3.2.2.1	Oniris : étude multicentrique des résidus et agents infectieux et parasitaires (AIP) sur 18 ruchers du Grand-Ouest (2008 – 2009) .....	129
3.2.2.2	Epilobee France (Résabeilles 2012 et 2013) épidémiologie des cas de mortalité sur 391 ruchers ..	130
3.2.2.3	Maïs Cruiser - Plan de surveillance post-homologation 2008-2010 .....	130
3.2.2.4	BNEVP - Suivi temporel de résidus dans cinq ruchers (printemps 2011).....	131
3.2.2.5	ITSAP/CETIOM Suivi temporel des résidus dans 4 ruchers dans un contexte de cultures oléagineuses (avril - mai 2012 et mai - juin 2013).....	131
3.2.2.6	ADARA : Etude des dangers biologiques et chimiques sur 12 ruchers présentant des troubles en saison, en 2013, en région Rhône-Alpes.....	131
3.2.2.7	DGAL : Réseau annuel de surveillance des troubles des abeilles 36 ruchers en 2013.....	132
3.2.2.8	LNR Sophia-Antipolis - Bilan des résultats des échantillons soumis pour analyse au Laboratoire National de Référence 2011-2013.....	132
3.2.2.9	Laboratoire départemental d'analyses du Jura (LDA39) - Bilan des résultats des échantillons soumis pour analyse à un laboratoire départemental agréé 2006-2012 .....	132
3.2.2.10	Grande diversité de dangers détectés dans différentes matrices.....	133
3.2.2.10.1	Dangers biologiques.....	133
3.2.2.10.2	Dangers chimiques.....	134
3.2.2.11	Des charges infectieuses et des quantités de résidus détectées très variables.....	135
3.2.2.11.1	Charges infectieuses.....	135
3.2.2.11.2	Analyse des résidus .....	136
3.2.3	Conclusion .....	136
<b>3.3</b>	<b>Conclusions / recommandations .....</b>	<b>140</b>
<b>4</b>	<b>Co-expositions des abeilles aux facteurs de stress et interactions entre ces facteurs : mécanismes impliqués ; méthodes de mise en évidence. 142</b>	
<b>4.1</b>	<b>Données bibliographiques .....</b>	<b>142</b>
4.1.1	Mécanismes de l'immunité et de détoxification au niveau individuel et à l'échelle de la colonie .....	142
4.1.1.1	Immunité de l'abeille et de la colonie d'abeilles.....	142
4.1.1.1.1	Immunité individuelle.....	142
4.1.1.1.2	Immunité sociale .....	145
4.1.1.2	Le système de détoxification de l'abeille .....	146
4.1.2	Interactions entre facteurs de stress recensées dans la bibliographie .....	151
4.1.2.1	Entre agents biologiques.....	152
4.1.2.1.1	Associations Varroa – virus.....	152
4.1.2.1.2	Association Nosema – virus.....	154
4.1.2.1.3	Autres associations entre agents biologiques .....	154
4.1.2.2	Entre facteurs chimiques.....	156
4.1.2.3	Entre agents biologiques et agents chimiques .....	159
4.1.2.3.1	Conditions contrôlées.....	159
4.1.2.3.2	Conditions naturelles, niveau de la colonie ou du rucher .....	161
4.1.3	Modulation des effets de facteurs chimiques ou biologiques par d'autres facteurs .....	162

4.1.3.1	En fonction de facteurs intrinsèques aux abeilles.....	162
4.1.3.1.1	<i>Selon l'âge des ouvrières</i> .....	162
4.1.3.1.2	<i>Selon le poids des ouvrières</i> .....	163
4.1.3.1.3	<i>Selon l'expérience des abeilles</i> .....	163
4.1.3.1.4	<i>Selon la génétique des abeilles</i> .....	163
4.1.3.1.5	<i>Selon le type d'abeilles</i> .....	165
4.1.3.2	En fonction de facteurs extrinsèques aux abeilles.....	165
4.1.3.2.1	<i>Influence de l'alimentation</i> .....	165
4.1.3.2.2	<i>Selon la saison</i> .....	166
4.1.3.2.3	<i>Selon la formulation</i> .....	166
<b>4.2</b>	<b>Analyse de données disponibles sur les co-expositions des abeilles aux facteurs biologiques et chimiques en France.....</b>	<b>167</b>
4.2.1.1	Réalité des co-expositions aux dangers biologiques et/ou chimiques.....	167
4.2.1.1.1	<i>Cooccurrences d'agents infectieux</i> .....	167
4.2.1.1.2	<i>Cooccurrences de dangers chimiques</i> .....	168
4.2.1.1.3	<i>Cooccurrences de dangers biologiques et chimiques</i> .....	171
4.2.1.2	Lien entre la présence d'agents infectieux et de résidus chimiques et l'état des colonies.....	172
4.2.1.2.1	<i>Bilan de l'examen des jeux de données</i> .....	172
4.2.1.2.2	<i>Essai de quantification du lien entre présence/absence des dangers et variables d'état des colonies</i> .....	172
4.2.1.3	Conclusions et recommandations .....	173
4.2.1.3.1	<i>Conclusions</i> .....	173
4.2.1.3.2	<i>Recommandations</i> .....	174
<b>4.3</b>	<b>Conclusions / recommandations .....</b>	<b>175</b>
<b>5</b>	<b>Question de la prise en compte des interactions dans l'évaluation des risques liés aux produits phytopharmaceutiques .....</b>	<b>178</b>
<b>5.1</b>	<b>Rappels sur l'évaluation réglementaire des produits phytopharmaceutiques .....</b>	<b>178</b>
<b>5.2</b>	<b>Pertinence de la prise en compte des interactions dans l'évaluation des produits phytopharmaceutiques.....</b>	<b>181</b>
<b>5.3</b>	<b>Choix d'interactions à prendre en compte .....</b>	<b>182</b>
5.3.1	Interactions pesticides-pesticides .....	182
5.3.2	Interactions agents biologiques – pesticides .....	183
<b>5.4</b>	<b>Méthodes envisageables pour la prise en compte des interactions dans les méthodes d'évaluation des produits phytopharmaceutiques.....</b>	<b>184</b>
5.4.1	Méthodes expérimentales au laboratoire, en conditions semi-naturelles, en plein champ .....	184
5.4.2	Utilisation de la modélisation pour l'étude des effets de stress multiple chez l'abeille.....	184
<b>5.5</b>	<b>Conclusions / recommandations .....</b>	<b>186</b>
<b>6</b>	<b>Synthèse, conclusions et recommandations du groupe de travail .....</b>	<b>188</b>
<b>6.1</b>	<b>Conclusions.....</b>	<b>188</b>
6.1.1	Sur l'état des colonies et des outils d'évaluation de la santé des colonies d'abeilles .....	188
6.1.2	Sur les facteurs de stress .....	189
6.1.3	Sur les co-expositions et interactions entre facteurs de stress .....	189
6.1.4	Sur les résultats de l'analyse des données (aspects monofactoriels et interactions) .....	191
6.1.5	Sur la question de la prise en compte des interactions dans l'évaluation des produits phytopharmaceutiques.....	191
<b>6.2</b>	<b>Recommandations .....</b>	<b>191</b>
6.2.1	Sur les outils d'évaluation de la santé des colonies d'abeilles .....	191
6.2.2	Sur les facteurs de stress .....	192
6.2.3	Sur les études épidémiologiques et recueils de données visant à répondre à la question des interactions <i>in situ</i> .....	192

6.2.4	Sur la prise en compte des interactions dans l'évaluation des produits phytopharmaceutiques .....	194
<b>6.3</b>	<b>Perspectives.....</b>	<b>195</b>
<b>7</b>	<b>Bibliographie.....</b>	<b>196</b>
7.1	Publications.....	196
7.2	Normes.....	245
7.3	Législation et réglementation.....	245
<b>ANNEXES</b>	<b>.....</b>	<b>247</b>
Annexe 1 : Autosaisine.....		248
Annexe 2 : substances détectées dans l'étude CETIOM/ITSAP .....		251

## Glossaire

**Abeille émergente** : abeille passant du stade nymphal au stade adulte

**Agent infectieux** : élément microscopique, étranger à un organisme, capable de s'y multiplier ou de s'y reproduire aux dépens de cet organisme

**Agent pathogène (biologique)** : agent dont la présence ou l'excès est responsable de l'apparition d'une maladie (définition dans le contexte du rapport)

**Anamnèse** : histoire de la maladie chez un organisme malade

**Antagonisme** : phénomène survenant lorsque l'effet combiné d'au moins deux substances est moins toxique que les effets individuels de ces substances

**Colonie bourdonneuse** : colonie dont tous les œufs haploïdes donneront des mâles

**Commémoratifs** : antécédents médicaux

**Dose sub létale** : dose d'une substance toxique un peu inférieure à la dose mortelle

**Effet additif** : phénomène qui survient lorsque l'effet combiné d'au moins deux produits chimiques est égal à la somme des effets de chaque produit chimique pris individuellement

**Effet synergique** : lorsque l'effet combiné de deux produits chimiques est supérieur à la somme des effets de chaque produit pris individuellement

**Enzootie** : maladie, cliniquement exprimée ou non, sévissant habituellement chez l'animal dans une région donnée (maladie enzootique)

**Essaimage** : formation d'une nouvelle colonie d'abeilles par émigration d'une partie de la population d'ouvrières et de la reine (essaim)

**Force d'une colonie** : nombre d'individus, adultes et immatures, constituant la colonie à un moment donné, dans une région et pour un génotype donné

**In silico** : ensemble de méthodes numériques utilisant les approches des mathématiques et permettant de simuler ou de modéliser un phénomène biologique à l'aide de l'outil informatique

**Introgession** : transfert (naturel ou non) de gènes d'une espèce dans le génome d'une autre espèce

**Matrice apicole** : abeille vivante ou morte, pollen, nectar, miel, cire, propolis, pain d'abeille, gelée royale

**Miellat** : excrétion sucrée produite par certains insectes suceurs de sève, notamment les pucerons et les cochenilles

**Pain d'abeille** : pollen récolté par les abeilles, mélangé à du miel et des sécrétions salivaires, et stocké dans les alvéoles, constituant la ressource protéique de la colonie

**Parasite** : (1) sens large : entité étrangère qui vit aux dépens d'un hôte ; (2) sens strict : eucaryote uni- ou pluricellulaire dont le cycle vital n'est possible qu'en association étroite avec un hôte, ne serait-ce que pendant une durée limitée

**Pesticide** : selon l'OMS, un pesticide est défini comme « toute substance ou association de substances, ou micro-organismes y compris les virus, destinée à repousser, détruire ou combattre les ravageurs, y compris les vecteurs de maladies humaines ou animales, les ravageurs nuisibles, les espèces indésirables de plantes ou d'animaux causant des dommages ou se montrant autrement nuisibles durant la production, la transformation, le stockage, le transport ou la commercialisation des denrées alimentaires, des produits agricoles, du bois et des produits ligneux, ou des aliments pour animaux, ou qui peut être administrée aux animaux pour combattre les insectes, les arachnides et les autres endo- ou ectoparasites. Le terme inclut les substances destinées à être utilisées comme régulateur de croissance d'insectes ou de plantes, comme défoliant, comme agent de dessiccation, comme agent d'éclaircissage des fruits ou pour empêcher la chute prématurée de ceux-ci, ainsi que les substances appliquées sur les cultures, avant ou après la récolte, pour protéger les produits contre la détérioration durant l'entreposage et le

*transport. Ce terme inclut aussi les produits synergistes et détoxifiants des pesticides quand ils sont essentiels pour obtenir une prestation satisfaisante du pesticide.* Dans le cadre des travaux du GT ont été considérés les produits chimiques utilisés pour le traitement ou la protection des végétaux. Les pesticides comprennent les fongicides, les insecticides et acaricides, les rodenticides, les corvicides les herbicides

**Population** : nombre d'abeilles dans une colonie

**Potentialisation** : phénomène qui survient lorsqu'une substance qui n'a habituellement pas un effet toxique est combinée à un produit chimique, ce qui a pour effet de rendre ce dernier beaucoup plus toxique

**Préparations** telles que définies dans le règlement (CE) n°1107/2009 : les mélanges ou les solutions composés de deux ou plusieurs substances destinés à être utilisés comme produits phytopharmaceutiques ou adjuvants

**Remérage** : remplacement de la reine de la colonie par une nouvelle

**Résidus** tels que définis dans le règlement (CE) n°1107/2009 : une ou plusieurs substances présentes dans ou sur des végétaux ou produits végétaux, des produits comestibles d'origine animale, l'eau potable ou ailleurs dans l'environnement, et constituant le reliquat de l'emploi d'un produit phytopharmaceutique, y compris leurs métabolites et produits issus de la dégradation ou de la réaction

**Stress** : ensemble des réponses aux facteurs menaçant l'intégrité et la santé d'un organisme

**Substances** telles que définies dans le règlement (CE) n°1107/2009 : les éléments chimiques et leurs composés tels qu'ils se présentent à l'état naturel ou tels qu'ils sont produits par l'industrie, y compris toute impureté résultant inévitablement du procédé de fabrication

**Superorganisme** : organisme composé de nombreux individus, organisés en société (colonie), où les individus isolés ne sont pas aptes à vivre par eux-mêmes. Chaque individu est au service de la société, la cohésion entre tous les constituants du groupe social est assurée par un système de communication très élaboré, en particulier la communication chimique basée sur des phéromones nombreuses

**Supersédure** : phénomène de remérage (changement de reine) naturel

**Synergie** : situation qui se produit lorsque l'exposition simultanée à au moins deux produits chimiques provoque des effets sur la santé qui sont supérieurs à la somme des effets individuels de ces produits

**Trophallaxie** : régurgitation de nourriture liquide pour nourrir d'autres abeilles. Ce transfert permet également de faire circuler des informations dans la colonie *via* des messages chimiques

**Xénobiotique** : substance chimique étrangère à un organisme vivant

## Sigles et abréviations

<b>a.i.</b>	active ingredient
<b>AIP</b>	agents infectieux et parasitaires
<b>ABPV</b>	Acute Bee Paralysis Virus (virus de la paralysie aiguë)
<b>ADARA</b>	Association pour le développement de l'apiculture en Rhône-Alpes
<b>AKI</b>	complexe incluant l'ABPV, le KBV et l'IAPV
<b>ALPV</b>	Aphid lethal paralysis virus
<b>AMM</b>	autorisation de mise sur le marché
<b>BQCV</b>	Black queen cell virus (virus de la cellule royale noire)
<b>CBPV</b>	Chronic bee paralysis virus (virus de la paralysie chronique)
<b>CCD</b>	Colony collapse disorder (syndrome d'effondrement des colonies)
<b>CETIOM</b>	Centre technique interprofessionnel des oléagineux et du chanvre
<b>CL50</b>	Concentration létale 50
<b>DL50</b>	Dose létale 50
<b>EBI</b>	Ergosterol Biosynthesis Inhibitor (inhibiteur de la biosynthèse de l'ergostérol)
<b>EILA</b>	Essai inter laboratoire d'aptitude
<b>EILV</b>	Essai inter laboratoire de validation
<b>ELISA</b>	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
<b>EPA</b>	Environmental Protection Agency (Agence de protection de l'environnement)
<b>EPPO</b>	European and Mediterranean Plant Protection Organization (OEPP - Organisation Européenne et Méditerranéenne pour la Protection des Plantes)
<b>FEAGA</b>	Fonds européen agricole de garantie
<b>GHP</b>	Glande hypopharyngienne
<b>HMF</b>	Hydroxyméthylfurfural
<b>IAPV</b>	Israeli acute paralysis virus (variant israélien du virus de la paralysie aiguë)
<b>IGR</b>	Insect Growth Regulator (Inhibiteurs de croissance)
<b>INPN</b>	Inventaire national du patrimoine naturel
<b>ITSAP</b>	Institut technique et scientifique de l'apiculture et de la pollinisation - Institut de l'abeille
<b>KBV</b>	Kashmir bee virus (virus du Cashmire)
<b>LOEC</b>	Lowest Observed Effect Concentration (plus petite concentration dans une expérience induisant un effet observé)
<b>LSV</b>	Lake Sinai virus (virus du lac du Sinai)
<b>MNHN</b>	Museum national d'histoire naturelle
<b>OECD</b>	Organisation for Economic Cooperation and Development (OCDE - Organisation de Coopération et de Développement Économiques)
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction (amplification génique par polymérisation en chaîne)
<b>PER</b>	Proboscis Extension Reflex (réflexe d'extension du proboscis REP)
<b>PPP</b>	Produit phytopharmaceutique
<b>qPCR</b>	PCR quantitative
<b>RFID</b>	Radio-frequency identification (identification par radiofréquence)
<b>RT-PCR</b>	Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction (transcription inverse – amplification génique par polymérisation en chaîne)
<b>SBV</b>	Sacbrood Virus (virus du couvain sacciforme)

**TL50** Temps létal 50

**VdMLV** *Varroa destructor* Macula-like Virus

**VdV1** *Varroa destructor* Virus 1

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1 : Dépérissement, affaiblissement, dépeuplement et effondrement des colonies d'abeilles (schématisation) (source : Afssa, 2009).....</b>	<b>21</b>
<b>Tableau 2 : Agents infectieux et parasitaires circulant en Europe .....</b>	<b>67</b>
<b>Tableau 3 : Etudes de prévalence des agents infectieux et parasitaires en Europe.....</b>	<b>69</b>
<b>Tableau 4 : Résidus d'antibiotiques retrouvés dans le miel (Bogdanov, 2006).....</b>	<b>100</b>
<b>Tableau 5 : Résidus d'antibiotiques traceurs d'une utilisation par les apiculteurs (Reybroeck et al., 2012).....</b>	<b>101</b>
<b>Tableau 6 : Temps de demi-vie (<math>t_{1/2}</math>) de quelques antibiotiques dans le miel (Reybroeck et al., 2012) .....</b>	<b>101</b>
<b>Tableau 7 : Présentation des jeux de données analysés.....</b>	<b>127</b>
<b>Tableau 8 : Recherche et détection de dangers biologiques dans les jeux de données.....</b>	<b>133</b>
<b>Tableau 9 : Bilan des substances recherchées et détectées au moins une fois dans des ruches, dans 9 études sur le territoire français.....</b>	<b>134</b>
<b>Tableau 10 : Récapitulatif, par type paysager, du nombre de traitements phytosanitaires et vétérinaires réalisés dans les aires de butinage des 18 ruchers du Grand Ouest et rapportés à un hectare de surface enquêtée .....</b>	<b>139</b>
<b>Tableau 11 : Comparaison, par type paysager, du nombre de molécules différentes utilisées en 2008 dans les ruchers de l'étude par type paysager (résultats des enquêtes) et du nombre de molécules différentes recherchées et retrouvées dans les matrices apicoles (résultats des analyses toxicologiques) .....</b>	<b>139</b>
<b>Tableau 12 : « Dose létale médiane (DL50) d'acaricides (listés horizontalement) pour les abeilles en 2009, suivant un prétraitement sublétal avec des acaricides, fongicides ou des inhibiteurs d'enzymes (listés verticalement). Les intervalles de confiance à 95% sont indiqués sous les valeurs de DL50. Les différences significatives comparées au traitement contrôle sont indiquées avec une lettre en exposant : a = effet de prétraitement significatif, b = effet dose de prétraitement acaricide significatif (voir table S1 dans Johnson et al., 2013). Les valeurs de DL50 sont issues d'études antérieures : † = Johnson et al. (2006) ; ‡ = Johnson et al. (2009). Un tiret traduit un DL50 non calculée du fait de données insuffisantes. » Johnson et al. (2013).....</b>	<b>148</b>
<b>Tableau 13 : Table des synergies deux-à-deux entre néonicotinoïdes d'après le brevet Bayer (Andersch et al., US patent 7745375 B2, 29/06/2010) pour de très nombreux ordres d'insectes (Lepidoptera, Coleoptera, Hymenoptera, Diptera, etc.) .....</b>	<b>158</b>
<b>Tableau 14 : Coefficients de corrélation les plus élevés (supérieurs à 0,40) parmi les 28 résidus détectés au moins une fois (étude Oniris).....</b>	<b>169</b>
<b>Tableau 15 : Exemple de co-occurrences dans un même lieu, à une même date ou à des dates différentes, de résidus chimiques et d'agents infectieux, lors d'un suivi de 4 ruchers en zone de grande culture. Ici les résultats obtenus sur des abeilles mortes devant la ruche, en présence/absence (1/0), ou en quantité relative, pour jour donné sur un rucher (étude CETIOM/ITSAP) .....</b>	<b>171</b>
<b>Tableau 16 Détail des 30 substances détectées dans le pollen de 4 ruchers à différentes dates (étude CETIOM/ITSAP) .....</b>	<b>251</b>

## Liste des figures

<b>Figure 1 : Evolution annuelle de la population d'une colonie d'abeilles en climat tempéré,.....</b>	<b>23</b>
<b>Figure 2 : Régions biogéographiques transfrontalières dans l'Union Européenne.....</b>	<b>73</b>
<b>Figure 3 : Minimum, maximum, médianes en « nombre de copies de gènes » par abeille détectés par qPCR dans des abeilles adultes de ruchers asymptomatiques durant l'année 2009, pour 12 agents infectieux. ....</b>	<b>135</b>
<b>Figure 4 : Minimum, maximum, médianes et quartiles du nombre de copies de gène par abeille détectés par qPCR dans des abeilles de 12 ruchers symptomatiques en 2013 (cas cliniques étude ADARA), pour 10 agents infectieux. En rouge le nombre d'échantillons pour lesquels les résultats étaient supérieurs à la limite de quantification. ....</b>	<b>136</b>
<b>Figure 5 : Variation interannuelle et inter-régionale des quantités vendues cumulées par usage (en Tonnes) de 15 substances actives détectées dans les matrices apicoles en France (7 fongicides et 8 insecticides). Chaque couleur de barre d'histogramme représente les quantités cumulées pour l'une des 22 régions de France métropolitaine (source : Onema et Anses – Banque nationale des ventes de produits phytopharmaceutiques réalisées par les distributeurs agréés – BNV-D).....</b>	<b>138</b>
<b>Figure 6 : Evolution annuelle du marché des néonicotinoïdes (et fipronil) au Japon en tonnes de matières actives. Le graphe montre l'évolution qualitative et quantitative pour 7 néonicotinoïdes, notamment en termes de multiplicité des matières</b>	



actives utilisées dès 1996. Ces données proviennent de l'Institut National Japonais pour les Etudes Environnementales. D'après Simon-Delso et al. (2015) .....	157
Figure 7 : Evolution des ventes de néonicotinoïdes entre 2009 et 2012 en France, en tonnes de substances actives (Source : Onema et Anses – Banque nationale des ventes de produits phytopharmaceutiques réalisées par les distributeurs agréés – BNV-D) .....	158
Figure 8 : Exemple de co-infections par plusieurs agents infectieux dans 13 cas cliniques de troubles (étude ADARA) .....	167
Figure 9 : Exemple de co-infections par plusieurs agents infectieux dans l'étude ONIRIS.....	168
Figure 10 : Représentation des indices de Bray-Curtis permettant de comparer les profils de 18 ruchers pour la matrice miel, sous forme de dendrogramme (méthode du lien complet) (source : rapport Oniris).....	169
Figure 11 : Exemples de détection conjointe de produits phytosanitaires dans le pain d'abeilles et le pollen de 13 cas cliniques de troubles (étude ADARA).....	170
Figure 12 : Nombre de substances détectées à différentes dates d'une même année de suivi, pour chacun des quatre ruchers (A, B, C et D sont les quatre ruchers suivis dans l'étude CETIOM-ITSAP).....	172
Figure 13 : d'après Goulson et al., Science, février 2015 : « les abeilles gérées et sauvages sont soumises à un nombre significatif de facteurs de stress en interaction. Par exemple, l'exposition à certains fongicides peut fortement augmenter la toxicité des insecticides (références 110 à 112) tandis que l'exposition aux insecticides réduit la résistance aux maladies (références 115-123 et 115-126). Le facteur de stress alimentaire diminue probablement la capacité des abeilles à faire face aux agents toxiques et pathogènes (références 127-129). Photo credit: Beth Nicholls; Flickr Commons, AJC1 ( <a href="https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.0/legalcode_">https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.0/legalcode_</a> )” .....	190

# 1 Contexte, objet et modalités de traitement de la saisine

## 1.1 Contexte

Il existe dans le monde de nombreuses espèces pollinisatrices contribuant à la survie et à l'évolution de plus de 80 % des espèces végétales. Parmi ces pollinisateurs figurent quelque 20 000 espèces d'abeilles dans le monde, dont environ 850 sont présentes en France, notamment l'abeille domestique *Apis mellifera*. Sur son aire de distribution (Europe, Afrique, et Moyen-Orient), cette espèce s'est diversifiée en près de 30 sous-espèces avec des caractéristiques propres, adaptées à leur environnement. En France, la sous-espèce native est *A. mellifera mellifera* (appelée l'abeille noire).

Depuis une cinquantaine d'années, le nombre de pollinisateurs tend à diminuer dans des pays industrialisés. Ce déclin semble s'être accéléré depuis une vingtaine d'années, notamment chez les abeilles domestiques en France (Afssa 2009) avec des conséquences délétères sur les espèces végétales et sur les productions apicoles. D'autres pays d'Europe de l'Ouest ont également rapporté des mortalités anormales dans les ruchers pouvant aller jusqu'à 80 % dans certains pays (Neumann et Carreck 2010; Potts *et al.* 2010). Le rapport Afssa (2009) rappelait cependant que « *des pertes de colonies d'abeilles domestiques ont été décrites dans les revues apicoles anciennes, depuis que l'apiculture a évolué de la ruche traditionnelle à la ruche à cadre.* »

En France métropolitaine en 2010, la filière apicole comptait 41 836 apiculteurs déclarant 1 074 200 ruches (contre 1 350 000 en 2004), pour une production de 18 330 tonnes de miel (FranceAgriMer 2012). Parmi eux, 91 % étaient des apiculteurs amateurs détenant de 1 à 30 ruches, 4 % des professionnels possédant plus de 150 ruches, et 5 % des apiculteurs pluriactifs ayant de 31 à 150 ruches (FranceAgriMer 2012). D'après ces estimations, entre 2004 et 2010, le nombre d'apiculteurs a diminué de 40 %, le nombre de ruches est passé de 1 350 000 à 1 074 200, et la production de miel a baissé de 28 %. Il est à noter que le nombre global de ruches dépend à la fois des pertes et des renouvellements de cheptel assurés par les apiculteurs. Une diminution du rendement à la ruche est constatée, parallèlement avec les phénomènes de surmortalité des abeilles<sup>1</sup>.

Dans ce contexte, les phénomènes d'affaiblissement, d'effondrement et de mortalité des colonies d'abeilles, observés dans la plupart des pays où l'agriculture est intensive (Europe, Amériques), ont fait l'objet, au cours des dernières années, de plusieurs études visant à comprendre le ou les mécanismes impliqués dans ces troubles. Le rapport Afssa (2009) en soulignait l'étiologie multifactorielle (facteurs infectieux, chimiques, physiques, climatiques, alimentaires, *etc.*). Ce rapport concluait notamment sur la nécessité d'évaluer les effets, individuels et conjoints, de l'exposition des abeilles et des colonies d'abeilles aux agents infectieux et aux produits phytopharmaceutiques, et de réaliser des recherches sur les expositions chroniques à des pesticides en présence d'infections latentes, récurrentes, par différents agents infectieux susceptibles de se potentialiser entre eux. L'Anses a émis en 2012, trois avis portant sur deux publications scientifiques (Henry *et al.* 2012; Vidau *et al.* 2011) qui ont rapporté les effets sur les abeilles et/ou les colonies d'abeilles, de doses sublétales de pesticides (Anses 2012a; Anses 2012b; Anses 2012c). L'EFSA a publié, en mai 2012, une « déclaration sur les résultats d'études

---

<sup>1</sup> Voir l'introduction du rapport Afssa 2009 sur les Mortalités, effondrements et affaiblissements des colonies d'abeilles et le chapitre 1 du rapport Anses sur la hiérarchisation des dangers sanitaires chez les abeilles (2013-SA-0049) pour des éléments d'information sur la filière apicole

récentes examinant les effets sublétaux de certains néonicotinoïdes sur les abeilles » (EFSA 2012b).

## 1.2 Objet de l'autosaisine

Dans le contexte évoqué ci-dessus, et compte tenu du travail en cours de l'EFSA sur les effets chroniques de néonicotinoïdes, l'autosaisine porte sur les co-expositions (expositions concomitantes ou successives) des abeilles individuelles et des colonies d'abeilles à différents facteurs de stress, les mécanismes d'action et d'interaction de ces facteurs et leurs rôles respectifs dans les phénomènes de mortalité ou d'affaiblissement des colonies d'abeilles. L'accent est mis sur les interactions entre agents infectieux et parasitaires, d'une part, et facteurs toxiques à des doses sublétales, d'autre part. Les autres facteurs, intrinsèques (patrimoine génétique et diversité) ou extrinsèques (pratiques apicoles, facteurs environnementaux) sont pris en considération dans leur capacité à moduler ces interactions et leurs effets. En raison du nombre d'individus constituant les colonies, du caractère très structuré de ces dernières (par exemple la répartition du travail en fonction de l'âge des ouvrières), les effets sur l'individu abeille (à l'échelle moléculaire, cellulaire, tissulaire ou de l'organisme entier) sont distingués des conséquences à l'échelle des colonies (superorganisme).

Les objectifs du Groupe de travail (GT) mis en place par l'Anses pour traiter cette autosaisine sont les suivants :

(1) mieux comprendre le rôle des facteurs de stress dans les phénomènes d'affaiblissement, de mortalité et d'effondrement des colonies, en particulier :

- les co-expositions des abeilles à des agents pathogènes et à des substances chimiques à des doses sublétales,
- la compréhension des mécanismes d'action (effets additifs, synergiques, potentialisation),
- le rôle modulateur d'autres facteurs de stress (facteurs génétiques ; facteurs nutritionnels, climatiques, champs électromagnétiques, etc.) sur ces effets individuels ou conjoints,

et déterminer, dans la mesure du possible, la part respective de ces facteurs et de leurs interactions en tenant compte également de l'influence des pratiques apicoles et des facteurs environnementaux.

Des résultats d'analyses de données recueillies sur l'état sanitaire du cheptel apicole et sur l'exposition d'abeilles à différents facteurs de stress en France métropolitaine sont examinés au regard des données bibliographiques ;

(2) déterminer si l'élaboration de méthodes prenant en compte, dans l'évaluation des produits phytopharmaceutiques, les interactions éventuelles entre agents infectieux et facteurs toxiques serait pertinente et réalisable, notamment de manière standardisée. Le cas échéant, de telles méthodes pourraient être proposées par le GT ;

(3) émettre des recommandations en termes de pratiques apicoles et de recherche.

## 1.3 Modalités de traitement : moyens mis en œuvre

L'Anses a confié au groupe de travail « Co-expositions des abeilles aux facteurs de stress », rattaché au comité d'experts spécialisé « Santé animale » l'instruction de cette saisine.

Les travaux d'expertise du groupe de travail ont été soumis régulièrement au CES (tant sur les aspects méthodologiques que scientifiques). Le rapport rédigé par le groupe de travail tient compte des observations et éléments complémentaires transmis par les membres du CES.

Ces travaux sont ainsi issus d'un collectif d'experts aux compétences complémentaires.

L'expertise a été réalisée dans le respect de la norme NF X 50-110 « Qualité en expertise – prescriptions générales de compétence pour une expertise (Mai 2003) ».

Concernant les parties bibliographiques du rapport, les méthodes d'expertise ont reposé sur l'analyse critique, par les experts, de travaux originaux d'articles scientifiques publiés principalement dans des revues scientifiques à comité de lecture. Les articles anciens ont été inclus lorsqu'ils étaient appropriés. Les experts ont formé trois sous-groupes pour collecter et discuter de la pertinence de ces articles. Pour les articles relatifs aux pesticides, une attention particulière a été apportée à la qualité de la méthode analytique et à l'échantillonnage. Une actualisation des données bibliographiques a été réalisée tout au long des travaux du GT ; elle s'est terminée à la date de validation du rapport.

Des données recensées en France sur l'état sanitaire de ruchers et sur des co-expositions à des agents infectieux et des xénobiotiques ont été collectées et ont fait l'objet d'analyses statistiques par l'Anses, en lien régulier avec le groupe de travail. Les résultats de ces analyses ont été communiqués au GT qui les a discutés et pris en compte dans l'élaboration du présent rapport.

## 2 Etat de la colonie : définitions, outils de mesure, indicateurs de santé

Les troubles rapportés chez les colonies d'abeilles sont de différents types : affaiblissement, effondrement et mortalité.

Dans son rapport sur les mortalités, effondrements et affaiblissements des colonies d'abeilles, l'Afssa (2009) avait défini plusieurs troubles des colonies d'abeilles comme suit :

« Le *dépérissement des abeilles* est le fait d'aboutir à la destruction des abeilles, sans expression précise de la nature et de la vitesse de destruction (Dictionnaire Petit Robert 2007). Plusieurs termes sont couramment utilisés dans les revues apicoles ou les comptes rendus de conférences pour le désigner et le caractériser. Les scientifiques et les apiculteurs parlent, notamment, d'affaiblissement, d'effondrement, de mortalité, de surmortalité, de dépeuplement ou dépopulation (Haubruge et al. 2006).

L'affaiblissement caractérise un manque de force (de vigueur) d'une colonie d'abeilles et est lié à une diminution de la densité de peuplement d'une colonie au cours du temps, associée, la plupart du temps, à une diminution de l'activité de la ruche (pour une période de l'année durant laquelle ces diminutions sont inattendues). Des troubles peuvent être observés chez les abeilles tels que, par exemple, des anomalies de développement et de comportement. Sous le vocable affaiblissement se dissimule une multitude de signes cliniques laissés à l'appréciation de l'observateur. L'affaiblissement d'une colonie s'accompagne d'une diminution de sa production de miel.

Le dépeuplement (ou dépopulation) des colonies est une entité nosologique<sup>2</sup> propre, caractérisée par une diminution progressive du nombre d'abeilles dans une colonie au cours du temps, sans cause apparente, jusqu'à sa disparition, en raison de l'incapacité des abeilles survivantes à assurer les tâches élémentaires, indispensables à la survie de la colonie. Ce syndrome<sup>3</sup> peut être mis en relation avec une série de manifestations telles que la diminution de production de miel et de récolte de pollen résultant de la perte progressive des abeilles (Higes et al. 2005).

L'effondrement caractérise une perte rapide d'abeilles au sein d'une colonie, menant à son anéantissement. Ce phénomène correspond au syndrome nommé, en anglais, Colony Collapse Disorder, CCD. » Souvent, les dépeuplements entrent dans le champ de description du CCD.

Le **Tableau 1** (Afssa 2009) schématise ces différents troubles.

**Tableau 1 : Dépérissement, affaiblissement, dépeuplement et effondrement des colonies d'abeilles (schématisation) (source : Afssa, 2009)**

Qualificatif	Diminution du nombre d'abeilles		Diminution de l'activité de la colonie		Diminution de la production de miel	
	Rapide	Progressive	Oui	Non	Oui	Non
Dépérissement	X	X	X		X	X*
Affaiblissement	(X)	X	X		X	
Dépeuplement (dépopulation)		X	X		X	
Effondrement	X		X		X	X*

\* : les abeilles ne produisent pas de grande quantité de miel toute l'année. Il existe des périodes que l'on appelle « miellées »<sup>4</sup> durant lesquelles de grandes quantités de nectar sont accumulées. Si l'effondrement ou le dépérissement ont lieu après la dernière miellée, il n'y aura pas de différence de production de miel observable (à la fin de la saison apicole).

<sup>2</sup> Nosologie : discipline médicale qui étudie les caractères distinctifs des maladies en vue de leur classification méthodique

<sup>3</sup> Syndrome : ensemble de signes cliniques, de symptômes et de modifications morphologiques, fonctionnelles ou biochimiques d'un organisme, constituant une entité morbide pouvant être provoquée par des causes variées ou d'origine mal connue (Toma B, Bénet J-J, Dufour B, Eloit M, Moutou F, Sanaa M (1991) 'Glossaire d'épidémiologie animale.' (Maisons-Alfort, 365 pages)

<sup>4</sup> Miellée : transport, par les abeilles, du nectar sécrété par les nectaires des fleurs, et fabrication du miel

## 2.1 Etat de santé des colonies d'abeilles

### 2.1.1 Introduction

Au cours de son évolution, l'espèce *Apis mellifera* s'est étendue du sud de l'hémisphère Sud (Afrique du Sud) jusqu'au nord de l'hémisphère Nord (à proximité du cercle polaire arctique), en passant par les régions équatoriales (Ruttner 1988). Vers l'est, elle s'est étendue jusqu'à l'Iran (au sud) et l'Oural (au nord) (Rinderer 1986). Puis, à la suite de son élevage par l'Homme<sup>5</sup>, celui-ci l'a disséminée quasiment partout, où les colonies d'abeilles se sont développées dans des conditions climatiques et environnementales très différentes et ont évolué en près de 30 sous-espèces avec des caractéristiques propres, adaptées à leur environnement. L'aire de répartition de l'abeille s'est donc considérablement étendue, quasiment à la Terre entière, incluant l'Amérique du Nord et du Sud, ainsi que l'Océanie. En France, *A. mellifera* était représentée par la sous-espèce *A. mellifera mellifera*, appelée l'abeille noire, et ses différents écotypes dont certains ont été décrits (cas de l'abeille landaise par exemple). Depuis les années 70, les apiculteurs utilisent fréquemment des hybrides inter-raciaux qu'ils obtiennent en croisant des abeilles de sous-espèces différentes qu'ils importent. D'autres apiculteurs utilisent des abeilles sélectionnées à partir d'autres sous-espèces, pour leur productivité, leur douceur ou leur capacité à ne pas essaimer. Les abeilles Buckfast, très appréciées par certains apiculteurs, sont un exemple d'hybridation permettant d'obtenir des colonies d'abeilles avec les caractères d'intérêt de plusieurs sous-espèces géographiques. Ces différentes sous-espèces importées depuis de nombreuses années sont aujourd'hui responsables de niveaux d'introgessions mitochondriales très importants des populations françaises d'abeilles.

Le fait que les abeilles puissent être élevées par l'Homme n'implique pas que toutes les colonies d'abeilles vivent dans les ruches appartenant à des apiculteurs. Il existe des abeilles qui sont redevenues sauvages à la suite d'un essaimage - plus ou moins ancien - à partir de leur ruche d'origine. Le nombre de colonies sauvages n'est pas connu en France, mais il faut souligner qu'elles participent, comme les colonies détenues par les apiculteurs, à la pollinisation des plantes cultivées et sauvages et au maintien de la biodiversité des abeilles. Quand on considère l'abeille domestique, il n'est pas possible de considérer uniquement les colonies élevées par les apiculteurs.

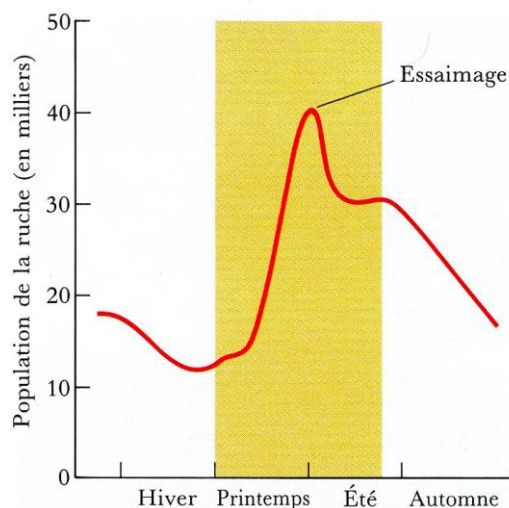
Le succès écologique de l'espèce *Apis mellifera* est dû à plusieurs facteurs qui tiennent beaucoup à l'organisation sociale très développée de cette espèce - et en particulier à la division du travail entre les ouvrières - ainsi qu'à l'optimisation permanente des récoltes de nourriture (pollen, nectar, miellat) ou d'eau (Seeley 1995; Winston 1987). Parmi les facteurs clés, citons également ses capacités cognitives exceptionnelles, son immunité sociale et ses capacités de thermorégulation, qui expliquent que cette espèce puisse se maintenir dans des climats chauds ou froids, si la nourriture et l'eau sont présentes en quantité suffisante.

### 2.1.2 Evolution annuelle de la population dans une colonie

La très grande majorité de la population des abeilles dans une colonie est composée des ouvrières, dont le nombre varie de 40 000 à 60 000 individus durant la belle saison et chute à 15 000 voire 5 000 en hiver. La reine est unique, et les mâles ne représentent que quelques milliers d'individus, présents uniquement pendant quelques mois.

---

<sup>5</sup> L'élevage de l'abeille par l'homme n'implique pas qu'il s'agisse complètement d'une domestication (« abeille domestique »), puisque sa reproduction n'est, généralement, pas contrôlée. Les reines se font féconder librement, par des mâles de différentes origines génétiques.



**Figure 1 : Evolution annuelle de la population d'une colonie d'abeilles en climat tempéré, d'après Gould et Gould (1993)**

La **Figure 1** présente un exemple de cycle annuel « moyen » d'une colonie d'abeilles.

L'évolution de la population d'une colonie d'abeilles au cours de l'année dépend de nombreux paramètres liés à la colonie, tels que l'âge de la reine ou des facteurs génétiques, comme la sous-espèce. A l'intérieur d'une sous-espèce, elle peut dépendre de l'écotype<sup>6</sup>, qui est adapté à un environnement donné.

L'évolution de la population d'une colonie dépend également de sa localisation, du rythme des saisons et, fortement de la végétation disponible dans l'aire de butinage de la colonie.

Le cycle du développement d'une colonie d'abeilles présente, globalement, quatre phases principales :

- *une phase de développement* (explosion démographique), qui débute à la fin de l'hiver. Pendant cette période, la reine pond intensément (de 1 500 à 2 000 œufs par jour), et les ouvrières récoltent abondamment du pollen, du nectar ou du miellat. La durée de vie des ouvrières est à cette époque de quelques semaines (environ 5 à 7 semaines).

Concernant l'activité apicole, cette phase de développement peut être stimulée par un apport de sucres et/ou de pollen. Une grande vigilance doit être apportée à la qualité de ces apports ;

- *une phase liée à la reproduction de la colonie* qui comporte, en particulier, la production annuelle des mâles et, éventuellement, l'élevage d'une nouvelle reine suivi par un essaimage. Les mâles sont présents de la fin de l'hiver jusqu'au début de l'automne. L'essaimage se produit lorsque la population atteint son maximum, vers la fin du printemps (juin). La reine quitte alors sa ruche avec une partie des ouvrières et va fonder plus loin une nouvelle colonie. Une nouvelle reine va éclore dans la colonie mère et remplacer la reine âgée, partie avec l'essaim. Plusieurs essaims successifs peuvent quitter la ruche (essaims secondaires), chacun comportant une jeune reine vierge et un groupe d'ouvrières. Cette période est particulièrement importante pour le niveau de la population, puisque le nombre d'abeilles va considérablement diminuer, et l'activité de récolte s'en trouver réduite d'autant. Un point important est à souligner : une diminution de population à cette période, même si elle n'est pas constatée immédiatement par l'apiculteur (voire jamais), n'est donc pas équivalente à un affaiblissement d'une colonie consécutive à un trouble.

Après l'essaimage, la jeune reine se met à pondre, ce qui va conduire à une augmentation temporaire de la population. Dans certaines circonstances, l'essaimage n'a pas lieu, pour diverses raisons. Dans ce cas, la courbe présentée dans la Figure 1 ne comporte pas la décroissance brutale de la population due à l'essaimage.

<sup>6</sup> Par exemple, l'écotype landais de la sous-espèce *Apis mellifera mellifera* (abeille noire) présente un cycle différent en fin d'été puisque la reine se remet à pondre juste avant la miellée de bruyère callune (Louveaux *et al.*, 1966).

Concernant l'activité apicole, l'apiculteur peut décider d'empêcher l'essaimage, afin de maintenir une population élevée dans la colonie dans le but d'assurer une récolte plus abondante de miel ;

- *une phase de préparation à l'hivernage*, qui débute à la fin de l'été. C'est la période de diminution naturelle de la population de la colonie. Cette phase permettra le meilleur développement possible des colonies dès le printemps suivant. La colonie produit les ouvrières qui passeront l'hiver (« abeilles d'hiver »), qui vivront plus longtemps (plusieurs mois) que les abeilles d'été (quelques semaines).

Concernant l'activité apicole, le rôle de l'apiculteur sera de veiller à ce que le niveau des réserves soit suffisant et pourra, si nécessaire, apporter un supplément nutritionnel (nourrissement) ;

- *une phase hivernale, appelée « hivernage »*, au cours de laquelle la population, réduite à quelques milliers d'ouvrières regroupées autour de la reine, vit sur les réserves accumulées pendant la belle saison. Les ouvrières hivernantes auront la tâche de redémarrer l'activité de la colonie au printemps. L'état de santé de ces individus hivernants est capital pour la survie des colonies à la saison froide

Concernant l'activité apicole, le rôle de l'apiculteur sera de veiller aux réserves de la colonie au cours de l'hiver et il pourra, si nécessaire, apporter un nourrissement supplémentaire.

### 2.1.3 Etat de santé des colonies d'abeilles

Il existe généralement un consensus pour considérer que la taille de la population de la colonie représente sa force, sa vigueur, et que plus une colonie est « forte », plus elle pourra récolter de nourriture et résister à certains agents stressants. Des colonies en bonne santé et des récoltes abondantes sont importantes à la fois pour le développement et la survie de la colonie elle-même, et pour l'apiculteur. Comme la taille de la colonie varie fortement au cours de la saison apicole, en fonction des ressources, l'évaluation de la force de la colonie se réfère à la situation « habituelle » dans un contexte géographique et à une époque de l'année données. Elle peut donc être éminemment subjective, et à proprement parler empirique, lorsqu'elle repose sur l'expérience pluriannuelle de l'apiculteur ou d'un visiteur sanitaire, qui évalue la quantité d'abeilles et de couvain, connaissant bien le contexte du rucher. Des paramètres plus objectifs, tels que présentés ci-dessous, devront être confrontés à un référentiel qui tienne compte de l'aspect évolutif au cours de la saison et du contexte local (cf. paragraphe 2.2.4.2). Cette variabilité constitue l'une des principales difficultés de l'étude des facteurs de santé chez l'abeille domestique.

#### 2.1.3.1 Niveau de la population des abeilles adultes

En climat tempéré, une colonie d'abeille en bonne santé est une colonie dont le développement annuel suit, globalement, le cycle de développement présenté dans la Figure 1, dans le contexte où elle se trouve. Le critère du niveau de population est particulièrement important. Hormis le cas de l'essaimage qui provoque une forte diminution de population, la population de la colonie doit être au niveau de ce qu'il est habituellement dans les conditions climatiques et d'environnement où la colonie est située. Cette évaluation de la taille de la population peut être réalisée par un apiculteur expérimenté.

#### 2.1.3.2 Niveau de la ponte de la reine

Un des facteurs importants contribuant à la bonne santé des colonies d'abeilles est le taux de ponte de la reine. La ponte doit permettre l'augmentation du nombre d'ouvrières à la fin de l'hivernage afin d'aboutir à la taille optimale de la colonie, et doit permettre le renouvellement des abeilles mortes au cours de la saison. Elle doit aussi permettre le développement de la population des mâles, et la production de nouvelles reines, lorsque cela s'avère nécessaire. Il est généralement admis que la fertilité de la jeune reine est considérée comme bonne lorsque moins de 10 % des cellules sont inoccupées (Jean-Prost et Le Conte 2005).

Le fait que la reine puisse augmenter sa ponte pour compenser des mortalités anormales d'ouvrières peut permettre, dans certains cas, de retrouver un effectif normal d'ouvrières, mais ce « rattrapage » a un coût biologique, non seulement en raison du nombre d'œufs qu'il nécessite, mais surtout en raison du coût de l'élevage de ces ouvrières en termes de nourriture et de soins par



les nourrices, et du coût en nourriture (miel et pollen) qui leur sera nécessaire au cours de leur vie adulte.

Si, dans des conditions normales, la durée de vie moyenne des reines est évaluée à 3 ans (maximum 4-5 ans) (Jean-Prost et Le Conte 2005), de nombreux témoignages d'apiculteurs et de scientifiques de l'abeille montrent qu'elle est maintenant souvent plus proche d'une seule année, et que la fertilité des reines aurait également diminué, d'où un renouvellement fréquent, parfois annuel, des reines par les apiculteurs (Le Conte, communication personnelle).

### 2.1.3.3 Niveau d'activité de la colonie

Dans les conditions de température, de pluviométrie et de luminosité qui se prêtent au butinage, et si des floraisons attractives pour les abeilles (nectar et/ou pollen) sont présentes dans son aire de butinage, une colonie en bonne santé doit montrer une activité soutenue à l'entrée de la ruche. En particulier, de nombreuses butineuses doivent en partir - et y revenir - chargées de récoltes (pollen, nectar, miellat, eau).

Concernant le rayon de butinage des abeilles autour de leur colonie, il a été montré qu'il varie de quelques centaines de mètres jusqu'à environ 10 km ou plus (von Frisch 1987). Ainsi, des abeilles ont été vues collectant du nectar jusqu'à 13,5 km de leurs colonies (Eckert 1933). La distance de butinage varie en fonction de l'environnement, des besoins alimentaires et en eau, de la génétique de la colonie, etc. Les publications de Visscher et Seeley (1982), Beekman et Ratnieks (2000) et de Steffan-Dewenter et Kuhn (2003) ont présenté des résultats sur la moyenne (de 1,5 à 5,5 km), la médiane (de 1,2 à 6,1 km) et la distance maximale de butinage (de 10 à 12 km).

A ces rayons de butinage autour de la colonie correspondent des aires de butinage potentiellement visitées par les abeilles. Ainsi, pour un rayon de 1 km, la surface exploitable est de 3,14 km<sup>2</sup> (314 ha), pour 2 km elle est de 12,56 km<sup>2</sup> (1256 ha), pour 5 km elle est de 78,5 km<sup>2</sup> (7850 ha) et pour 10 km elle est de 314 km<sup>2</sup> (31 400 ha).

### 2.1.3.4 Niveau de mortalité normal des abeilles d'une colonie

Le niveau de mortalité normal des abeilles d'une colonie en bonne santé n'est pas facile à calculer, car il dépend de nombreux facteurs. Dans une opinion scientifique récente, l'EFSA (2012a) a estimé la mortalité quotidienne normale d'une colonie à environ 1 % du nombre total d'individus, en se basant sur les publications suivantes : i) Sakagami et Fukuda (1968), dont les résultats ont été repris par DeGrandi-Hoffman *et al.* (1989) et Schmickl et Crailsheim (2007), et ii) Gary (1960), dont les résultats ont été repris par Moritz et Southwick (1992). Un taux de mortalité de 1 % correspond à environ 400 à 500 abeilles par jour dans une colonie qui en contient 40 000 au cours de la saison apicole. Il faut souligner que ce chiffre est une estimation très approximative ne reposant, *in fine*, que sur deux publications scientifiques anciennes réalisées dans des contextes particuliers. Il y a donc nécessité de réaliser de nouvelles expérimentations sur ce sujet, basées sur l'utilisation d'outils précis, par exemple des compteurs d'abeilles qui permettent quotidiennement de connaître le nombre d'abeilles qui ne rentrent pas à leur ruche (*cf.* paragraphe 2.2). Ces expérimentations devront être réalisées dans des zones représentatives de régions et paysages caractéristiques, sur des colonies saines et situées dans des zones non exposées (*a priori* et *a posteriori*) aux pesticides.

### 2.1.3.5 Niveau d'agents infectieux

Un certain nombre d'agents infectieux sont présents dans les colonies d'abeilles en bonne santé. De plus, un niveau élevé de ces agents dans une colonie n'est pas forcément un signe de mauvaise santé ou de mauvaise production de miel. Cela traduit un portage asymptomatique, objet d'un paragraphe dans la partie consacrée aux agents biologiques.

## 2.2 Outils d'évaluation de la santé des abeilles / colonies d'abeilles

La colonie d'abeilles doit toujours être considérée dans son ensemble lorsque l'on souhaite évaluer son état de santé : les interrelations entre individus sont essentielles à l'équilibre physiologique de

ce superorganisme<sup>7</sup>. Toute altération d'une partie de sa population (butineuses ou nourrices par exemple) entraîne une compensation par l'autre partie (plasticité de la répartition des tâches entre les ouvrières), autant que possible. L'évaluation de la santé des abeilles et des colonies d'abeilles doit permettre de répondre à deux exigences : d'une part, vérifier leur bonne santé à un temps T (ou *a contrario* leur mauvais état de santé) et, d'autre part, disposer d'éléments concrets et d'outils de mesure permettant de suivre leur évolution pendant une période P : en effet, deux observations normales à deux temps différents ne signifient pas nécessairement une évolution normale pendant la période correspondante. Ces deux objectifs, s'ils sont étroitement liés, restent pourtant distincts et s'appuient sur des méthodes et outils différents. D'une manière générale, définir un état « anormal » d'une colonie devrait se faire par l'identification et la quantification de paramètres définissant un état « normal » de cette même colonie dans les conditions d'environnement qui lui sont propres. C'est un domaine de recherche à développer. Par ailleurs, le regard expert d'apiculteurs avertis et formés permet de déceler des états particuliers (faible, inactif, etc.) qui sont aussi à prendre en compte puisque ces constatations auto-corrèlent le comportement d'une colonie avec son état antérieur.

## 2.2.1 L'évaluation de la santé d'une colonie d'abeilles

### 2.2.1.1 L'examen clinique

La colonie d'abeilles est comparable à un animal qui, lorsqu'il est en bonne santé, assure les fonctions essentielles à sa survie et à son développement, telles que sa reproduction et sa nutrition (cf. paragraphe 2.1). A ce titre, la santé de cet animal peut être appréciée lors d'un examen clinique classique en comparant l'animal examiné avec les constantes physiologiques connues. Dans le cas de la colonie d'abeilles, le vétérinaire clinicien devra donc comparer l'état de développement de la colonie examinée avec le stade de développement théorique d'une colonie placée dans les mêmes conditions en tenant compte de la sous-espèce et de l'environnement (saison, climat, nourriture, etc.). A l'instar des autres espèces domestiques, l'anamnèse (historique de la maladie) et les commémoratifs (antécédents, âge de la reine, etc.) ont également toute leur importance en santé de l'abeille : l'historique du parcours technique, la gestion du parasitisme, certaines pratiques apicoles (changement de reines) ou l'état des productions (miel et pollen en particulier) peuvent notamment influencer l'appréciation clinique.

Le modèle dans lequel s'inscrit l'examen peut varier selon le contexte épidémiologique et l'objectif de l'observation : soit la probabilité de rencontrer une maladie particulière est importante (prévalence de la maladie élevée dans la zone considérée) et l'examen sera déterminant pour vérifier l'absence ou la présence de symptômes évocateurs ; soit l'examen est réalisé dans un objectif de surveillance (prévalence de la maladie faible, voire nulle). Dans les deux cas, des paramètres objectifs de la santé seront alors utiles. A titre d'exemple, l'examen clinique dans le cadre d'importations d'abeilles doit tenir compte du contexte épidémiologique du pays exportateur.

La sémiologie<sup>8</sup> est une science encore peu développée en apiculture qui fait appel principalement à l'observation (absence d'outils utilisés habituellement pour les autres espèces tels que le stéthoscope ou le thermomètre). Le clinicien doit donc être rompu à l'exercice de la démarche diagnostique médicale et vétérinaire en particulier mais aussi à l'observation des abeilles : pour le non-initié, l'aspect physiologique peut aisément être confondu avec une lésion. Plus qu'un outil d'évaluation de la santé des colonies d'abeilles, l'examen clinique est donc la méthode qui permet, de façon synthétique, d'apprécier la santé d'une colonie d'abeilles, même si, faute d'outils d'aide au diagnostic, elle présente des limites. L'examen clinique peut néanmoins s'appuyer sur d'autres outils d'évaluation de la santé des abeilles.

<sup>7</sup> Superorganisme : organisme composé de nombreux individus, organisés en société (colonie), où les individus isolés ne sont pas aptes à vivre par eux-mêmes. Chaque individu est au service de la société, la cohésion entre tous les constituants du groupe social est assurée par un système de communication très élaboré, en particulier la communication chimique basée sur de nombreuses phéromones

<sup>8</sup> En médecine, étude des signes des maladies permettant de poser un diagnostic

### 2.2.1.2 Examens complémentaires en cas de suspicion de maladie infectieuse ou d'intoxication

Certains troubles observés sur la colonie ou sur les abeilles individuelles sont évocateurs d'une cause infectieuse ou toxique connue. Devant ces troubles, on cherchera à confirmer la suspicion par la détection, dans la colonie, de l'agent biologique ou chimique suspecté. Pour ce faire, des prélèvements doivent être réalisés dans des conditions permettant leur analyse et leur interprétation par des laboratoires, notamment :

- le plus tôt possible après l'apparition des troubles, du fait d'une dégradation souvent rapide des agents infectieux et/ou chimiques ;
- si possible avant la mise en œuvre de tout traitement dans le cas de maladies infectieuses ;
- sur des matrices ciblées, adaptées à l'agent recherché, ce qui varie en fonction de l'agent causal recherché (par exemple, certains agents infectieux devront être recherchés sur du couvain plutôt que chez des abeilles adultes). Les laboratoires d'analyse peuvent préciser les types de matrices à cibler ;
- en quantité suffisante, ces quantités pouvant également être précisées par le laboratoire destinataire des prélèvements ;
- dans des conditions d'envoi rapide au laboratoire et adaptées au type de prélèvement et d'analyse demandé (exemple : sous couvert du froid).

Il est en outre important que ces prélèvements soient accompagnés d'un descriptif complet et précis du rucher et du contexte (taille du rucher, environnement, suivi, descriptif des troubles, photos, etc.), données nécessaires à l'interprétation des résultats d'analyse. S'agissant de suspicion d'intoxications, la difficulté est d'abord d'identifier le type de xénobiotique (pesticide ou autres polluants), puis la classe de pesticide (insecticide, fongicide, herbicide, etc.) ou plus précisément la(les) molécule(s) à rechercher. Dans ce cadre, les enquêtes de terrain approfondies sur l'environnement sont un outil précieux sans lequel l'identification *a priori* ne peut être véritablement argumentée avant analyse. Lors de l'analyse, les limitations techniques des méthodes analytiques multi-résidus élargissent souvent la gamme de recherches aux molécules de peu d'intérêt (pesticides absents de l'environnement) tandis qu'elles réduisent la gamme de recherches aux seules molécules « analysables » en termes de coûts, d'échantillonnage pertinent et de détection/quantification pertinente (Bonmatin *et al.* 2015). Lorsqu'une suspicion d'intoxication est établie et qu'elle est étayée par la cohérence avec les enquêtes de terrain, un nombre plus restreint de molécules à rechercher finement est alors possible. Dans la plupart des cas, faute de moyens, les analyses ne vont pas jusqu'à l'identification/quantification des niveaux de résidus concernant les métabolites toxiques.

Plusieurs laboratoires, notamment privés ou départementaux, peuvent réaliser des recherches d'agents infectieux et/ou chimiques sur les matrices apicoles. Il existe en France un réseau de laboratoires agréés pour le diagnostic des maladies de l'abeille. Les laboratoires national et international de référence (LNR-LRUE Anses Sophia) sont chargés de développer, d'optimiser et de valider (selon les normes en vigueur) des méthodes de références (de détection d'identification et/ou de quantification) pour la réalisation des examens microbiologiques ou chimiques, notamment ceux qui seront utilisés lors des contrôles réglementaires. Cela recouvre le nombre et le type d'échantillons à prélever ainsi que les méthodes d'analyses de laboratoire à mettre en œuvre pour s'assurer des meilleures chances de détection et de la fiabilité de la méthode. Le LNR-LRUE a aussi comme mission d'assurer l'harmonisation des méthodes au sein des réseaux de laboratoires et notamment des réseaux de laboratoires agréés français

En principe, c'est la présence de l'agent causal dans l'échantillon en lien avec sa charge, et avec la présence de signes cliniques spécifiques dans certains cas, qui permet de confirmer la suspicion d'une cause infectieuse ou toxique pour expliquer les troubles observés. Le diagnostic étiologique est ainsi établi et peut conduire à la mise en place d'un traitement adapté. En outre, pour certaines maladies infectieuses réglementées, il pourra conduire à la mise en place de mesures particulières, afin notamment d'éviter la diffusion de l'agent causal aux ruchers voisins. Dans le cas d'agents chimiques, déterminer la substance en cause permet parfois de remonter à la source de l'exposition et d'y remédier.

Il est cependant rare que les troubles observés, souvent peu spécifiques, soient évocateurs d'une cause en particulier. Ils peuvent aussi relever d'un déterminisme multifactoriel. Dans ce cadre, une cause d'affaiblissement peut permettre l'expression clinique d'un portage sain : l'expression d'une maladie n'est alors que la conséquence d'une cause primaire. Il peut parfois y avoir un laps de temps important entre l'exposition à cette cause primaire et les manifestations cliniques. Dans cette hypothèse, un suivi régulier des ruches permettra la détection précoce d'un affaiblissement associé à une cause primaire et pourra prévenir l'effondrement tardif de la colonie. Dans ce contexte multifactoriel, c'est plutôt une batterie d'examens de laboratoire qui seront prescrits, au vu d'un examen attentif des troubles, de l'historique et du contexte dont les résultats seront joints aux prélèvements.

Il convient de noter que l'interprétation des résultats d'analyses multi-résidus et multi-agents infectieux est souvent délicate : en effet, des substances chimiques et agents infectieux pourront être détectés conjointement, à des niveaux de contamination souvent faibles, sans pouvoir attribuer avec certitude l'origine des troubles à l'un ou l'autre des agents détectés.

## 2.2.2 Evaluation de la santé des abeilles, à l'échelle de l'individu

### 2.2.2.1 Examen clinique de l'abeille

Si la santé d'une colonie d'abeille doit être appréciée dans son ensemble, les individus qui la composent peuvent chacun exprimer des symptômes. Ceux-ci peuvent apporter des informations au vétérinaire clinicien quant à la bonne ou à la mauvaise santé du superorganisme.

Ainsi, des anomalies morphologiques sont parfois présentes sur certains individus : port des ailes anormal, forme et taille des ailes, forme et taille de l'abdomen, couleur de l'abdomen, absence de poils, langue extériorisée en permanence, présence de parasites, etc. Quelques symptômes digestifs tels que la diarrhée, remarqués dans l'environnement proche et dans la ruche, peuvent parfois affecter les abeilles. Certains troubles du comportement peuvent également être remarqués par l'observateur (parfois en lien avec les troubles morphologiques) : incapacité à s'envoler, agressivité augmentée, tremblements, prurit, etc. Ces troubles peuvent, lorsqu'ils affectent un groupe d'individus, se traduire par des troubles de comportement sociétal : agressivité marquée, encombrement du trou de vol, disposition anormale d'un groupe d'abeilles, rejets accrus des entrées par les gardiennes, etc. et affecter l'activité de butinage.

Cette liste (non exhaustive) de symptômes doit être interprétée par le clinicien qui devra pondérer, à l'échelle de la colonie, chaque anomalie observée. Certains signes, relevés sur un seul individu, peuvent être plus importants dans la démarche diagnostique que d'autres, même s'ils concernent un plus grand nombre d'individus. A titre d'exemple, quelques abeilles tremblantes peuvent évoquer une intoxication et ne constituer que le seul indice observable.

La présence de cadavres d'abeilles doit aussi être considérée comme un signe individuel important. Lorsque le nombre d'abeilles mortes quotidiennement est supérieur à ce qu'il doit être (plusieurs centaines par jour parfois (EFSA 2012a)) des tapis d'abeilles mortes peuvent être observés. Là encore, l'observateur devra prendre le recul nécessaire pour évaluer s'il est face à une anomalie ou non, en particulier dans le cadre de suspicions d'intoxications. De même, l'absence de cadavres ne permet pas d'exclure certaines hypothèses diagnostiques, par exemple dans le cas des mortalités survenues loin de la ruche, ou lorsque les cadavres d'abeilles ont été mangés par des prédateurs.

Quelques tests rapides peuvent apporter des informations complémentaires sur cet examen individuel tel que l'aspect de l'intestin ou l'examen microscopique de l'appareil respiratoire. Concernant les cadavres, la datation précise de leur mort serait d'une grande aide. Néanmoins, l'aspect « lessivé », l'odeur, le poids ne donnent que des indications approximatives sur le moment de la survenue de la mort.

Concernant la santé de la reine, toute affection qui pourrait la concerner constitue un danger vital pour la colonie dans son ensemble. Dès son émergence, son état de santé et son développement anatomique sont des éléments déterminants pour ses capacités de ponte ultérieures (capacité d'envol, intégrité de l'appareil reproducteur). Ainsi, certaines reines naissent naines ou atteintes d'une hypoplasie de leur appareil reproducteur. Une part parfois non négligeable des naissances est

considérée, par les éleveurs de reines, comme incapable d'assurer la fonction de reproduction à laquelle on la destine. Plus tard, au cours de sa vie, de nombreux pathogènes peuvent l'atteindre au même titre que les ouvrières. Son espérance de vie théorique, de plusieurs années, en font le seul individu survivant d'une saison apicole à l'autre et donc le seul individu durablement exposé à un environnement potentiellement à risque. A titre d'exemple, les effets néfastes de certains xénobiotiques (coumaphos, *tau*-fluvalinate, *etc.*) sur la santé des reines et sur leur élevage sont déjà connus (Haarmann *et al.* 2002; Pettis *et al.* 2004). Les modifications physiologiques liées à son vieillissement (dégénérescence, calcification) ou les affections pathologiques contractées avec l'âge (infections, mélanose, atrophie ovarienne) peuvent également nuire à ses qualités de ponte. L'appréciation de ces anomalies ne peut être réalisée, le plus souvent, que par des examens microscopiques de laboratoire (anatomopathologie) ou grâce à des marqueurs physiologiques (Provost 2013). Cliniquement, ces défaillances de reines correspondent à des remérages naturels (lorsqu'ils sont possibles) ou à des colonies bourdonneuses.

### 2.2.2.2 Examen clinique du couvain

L'examen attentif du couvain revêt une importance capitale car il est révélateur de l'état de santé de la colonie et de son avenir. Si sa « quantité » peut être un indicateur intéressant pour estimer la force de la colonie, sa « qualité » est la garantie d'un état de santé satisfaisant et de bons soins apportés par les jeunes abeilles d'intérieur. Comme pour les abeilles adultes, certains symptômes peuvent être relevés dans le couvain ouvert, comme dans le couvain fermé : larves desséchées, larves de couleur anormale, larves de forme anormale, présence d'écailles, opercules percés, opercules bombés, odeurs anormales, présence de parasites ou de larves d'insectes, *etc.* Les loques, certains parasites et quelques virus peuvent affecter le couvain. Certains toxiques peuvent également nuire au développement des larves en empêchant, par exemple, leur mue.

Toutes les anomalies du couvain, quelles qu'elles soient, doivent être considérées comme de gravité majeure par l'observateur. Dans certains cas, et lorsque la colonie en est capable, le travail des fossoyeuses (comportement hygiénique) est suffisamment efficace pour nettoyer rapidement les alvéoles atteintes. Le couvain apparaît alors « en mosaïque ». Seule une observation attentive et des examens répétés à intervalles réguliers peuvent parfois permettre de dépister un indice d'une affection du couvain. Etant donné le cycle de développement du couvain (21 jours pour l'abeille ouvrière entre l'oviposition et l'émergence), on peut donc considérer qu'une visite mensuelle serait indiquée, en période de développement du couvain, pour vérifier son état de santé.

### 2.2.2.3 Outils d'évaluation de la santé des abeilles disponibles en recherche scientifique

#### 2.2.2.3.1 Tests de comportement

Le comportement des abeilles d'intérieur et des butineuses sont des paramètres importants de leur état de santé. Les capacités cognitives des abeilles sont extrêmement développées et leur altération peut, au-delà du simple individu, perturber le fonctionnement de l'ensemble de la colonie. Quelques tests d'évaluation sont régulièrement utilisés par les chercheurs, en particulier pour mesurer les effets de certains xénobiotiques.

A titre d'exemple, l'observation du comportement d'orientation vers la ruche (notamment du temps mis pour retrouver la colonie d'origine) est utile à la meilleure compréhension de l'effet de certains toxiques. Les nouvelles technologies participent aujourd'hui à mieux appréhender ce type de mesure. La communication sociale par les danses, connue depuis plusieurs décennies maintenant, est un facteur essentiel de partage d'informations entre abeilles ouvrières : la bonne transmission du message peut assez facilement être observée à l'œil nu et révèle ainsi un comportement altéré ou non. Enfin, d'autres tests tels que celui de « l'extension conditionnée du proboscis » ou celui de « labyrinthe en T » sont utilisés en recherche fondamentale pour évaluer le comportement d'abeilles exposées à des perturbateurs. L'ensemble des tests comportementaux et neuronaux sont décrits plus précisément dans le paragraphe 3.1.2. consacré aux stress chimiques.

#### 2.2.2.3.2 Biomarqueurs individuels

L'espérance de vie d'une abeille dépend de nombreux facteurs extrinsèques tels que la saison et intrinsèques (sociaux). Lorsqu'une colonie est en bonne santé, l'espérance de vie des abeilles ne devrait théoriquement pas être réduite. Certains paramètres biochimiques, mesurables, peuvent constituer de véritables biomarqueurs de l'âge de l'abeille : la sénescence cellulaire peut ainsi être mesurée par le dosage de la lipofuscine (Münch *et al.* 2013), tandis que le titre en vitellogénine dans l'hémolymphe participe à moduler les tâches assurées par chaque abeille et donc à écourter ou à allonger l'espérance de vie de chaque individu (Amdam 2011). Toutefois, la modularité de l'espérance de vie des abeilles (abeilles d'hiver vs abeilles d'été – réversion possible des tâches) rend complexe l'utilisation de ces outils principalement réservés à la recherche fondamentale.

#### 2.2.2.3.3 Poids des abeilles émergentes

Le poids des abeilles émergentes pourrait constituer un paramètre intéressant, selon certains auteurs (Scheiner 2012), par le lien démontré entre la morphologie de l'abeille adulte à l'émergence et ses capacités cognitives ultérieures.

#### 2.2.2.3.4 Radioentomologie

D'autres techniques qui s'appuient sur les principes de l'imagerie médicale appliquées à l'échelle de la colonie ont été testées, telles que l'imagerie par résonance magnétique (IRM) et l'ultrasonographie (échographie) (Greco 2010). L'IRM permet une meilleure différenciation des tissus que le scanner mais une moins bonne résolution des images numériques. Les ultrasons (hautes fréquences), qui ne sont pas transmis par l'air, ne donnent qu'une image de basse résolution pour les structures internes des abeilles. En revanche, le scanner semble applicable à l'examen individuel des abeilles avec des images numériques d'une très grande précision (Butzloff 2011). Les auteurs signalent que l'exposition aux rayons X des abeilles par cette technique est largement inférieure à la dose minimale conduisant à un effet biologique indésirable (la dose de 0,14 mGy par abeille, maximale, est près de 3 800 fois plus faible que la dose toxique mesurée pour la *Drosophile*, même s'il la comparaison entre ces deux insectes est sans doute abusive). Cet outil pourrait être intéressant, selon les mêmes auteurs, pour étudier la morphologie des abeilles et leurs structures internes (Greco *et al.* 2008). Il présente l'avantage de conserver les individus vivants (examen sous anesthésie nécessaire) comparé à la dissection et donc de réitérer le même examen à plusieurs moments de sa vie. Enfin, il autorise un plus grand éventail de possibilités (infinité d'angles d'observation) que l'examen microscopique classique. Le principal inconvénient de cet outil est son coût et son accessibilité : il n'est pas transposable à un usage sur le terrain et est réservé à la recherche scientifique.

#### 2.2.2.3.5 Examen anatomopathologique

L'examen microscopique de tissus est une technique applicable chez les insectes (chez l'abeille notamment) pour observer les structures internes et externes. Néanmoins, les images microscopiques documentées sont encore assez peu nombreuses pour l'abeille. Des techniques de fixation ont été développées récemment et devraient permettre d'envisager cette méthode à des fins diagnostiques et scientifiques (Scudamore *et al.* 2012).

### 2.2.3 Outils disponibles pour évaluer la force d'une colonie à un temps T

#### 2.2.3.1 Evaluation du nombre total d'abeilles

La population totale d'abeilles présentes au sein de la colonie saine fluctue énormément, notamment selon son cycle de développement : la ponte quotidienne de la reine et l'élevage par les ouvrières font varier le nombre de jeunes émergentes et équilibrent la population de la ruche par rapport aux mortalités « normales » d'abeilles en fin de vie. La taille de la population est souvent considérée par les apiculteurs et les chercheurs comme un signe évocateur de la santé (hors la question de l'essaimage). L'évaluation du nombre d'abeilles au sein d'une colonie intéresse depuis longtemps le monde apicole comme un élément indicateur de la future productivité de la ruche.

Ainsi, dès les années 50, on évaluait la population d'abeilles en secouant tous les cadres et en pesant l'essaim nu (Moeller 1958). Cette méthode reste la plus précise et est encore utilisée à des fins scientifiques (Costa *et al.* 2012; CST 2003; Odoux *et al.* 2014). En revanche, relativement invasive, elle a été délaissée par les apiculteurs dans leurs pratiques au profit de l'estimation de la surface de cadre occupée par les abeilles (Burgett et Burikam 1985). Pour être le plus précis possible, cet examen doit se faire tôt le matin ou tard le soir afin de prendre en compte la population des butineuses (en dehors des périodes de butinage donc). On considère qu'un cadre recouvert d'une couche uniforme d'abeilles représente environ, par face, 1400 abeilles pour une ruche Dadant et 1 100 pour une ruche Langstroth (Imdorf *et al.* 2010). De façon plus générale, on considère que 130 abeilles recouvrent chaque  $\text{dm}^2$  de cadre. Ainsi, la mesure du nombre de  $\text{dm}^2$  recouverts d'abeilles dans la ruche permet d'estimer approximativement l'importance de la population. Même si cette méthode reste la plus répandue, elle reste peu précise (surfaces inégalement occupées, abeilles enfoncées dans les alvéoles, abeilles qui ne tiennent pas au cadre, butineuses hors ruche, abeilles sur les parois de la ruche, *etc.*), et le nombre d'abeilles par élément de surface peut facilement varier (de 130 à 400 abeilles par  $\text{dm}^2$  (Imdorf *et al.* 2010)). Imdorf recommande de calibrer cette mesure sur quelques ruches en complétant le résultat de l'évaluation par la pesée du nombre d'abeilles balayées et récoltées dans un contenant (Imdorf *et al.* 2010). Cette calibration est utilisée sur le terrain dans le cadre de programmes de recherche (par exemple actuellement dans le cadre de la méthode ColEval développée par l'INRA et l'UMT-Prade dans le suivi de colonies sur lavande).

### 2.2.3.2 Evaluation de la surface de couvain

En dehors de la période hivernale pendant laquelle le couvain peut être absent, le nombre de cellules contenant des œufs, larves et nymphes est un indicateur de développement de la colonie et de fertilité de la reine. Ces cellules sont généralement placées au cœur de la ruche et constituent le nid à couvain. On peut estimer la surface occupée par ces cellules (couvain operculé et non operculé) par une observation attentive des cadres porteurs de couvain. Un « cadre-étalon », dont la surface est subdivisée en  $\text{dm}^2$  par des fils peut être superposé sur chaque cadre à évaluer afin de mieux appréhender les surfaces observées (Imdorf *et al.* 2010).

Des outils modernes peuvent améliorer la qualité de la mesure et la faciliter telle que la photographie numérique de chaque face de cadre. Ces images peuvent ensuite être interprétées par des logiciels informatiques (Emsen 2006; Imdorf *et al.* 2010; Yoshiyama *et al.* 2011).

Une des méthodes de mesure de ces deux paramètres (nombre d'abeilles et surface de couvain) est la méthode dite « de Liebefeld » élaborée par le Centre suisse de recherche apicole (Imdorf et Gerig 1999). C'est probablement actuellement la méthode d'évaluation de la force d'une colonie la plus répandue. Elle a fait ses preuves et obtient, sous réserve d'une réalisation attentive par l'opérateur, une bonne corrélation entre les évaluations et les mesures, en particulier pour le nombre d'abeille et la surface de couvain fermé. Concernant le couvain ouvert, l'évaluation est souvent surestimée (Imdorf *et al.* 2010). Afin de rendre plus rapide l'évaluation des cadres, une autre technique (dérivée de la méthode de Liebefeld) consiste à diviser virtuellement les cadres en quatre quarts : le relevé des observations effectuées pour chaque quart permet alors une estimation semi quantitative. Néanmoins, cette méthode traditionnelle est plus invasive et peut être source d'erreurs qui doivent être corrigées par des méthodes complémentaires (exemple de ColEval).

### 2.2.3.3 Estimation de l'activité de butinage

L'estimation de l'activité de butinage au sens strict présente l'intérêt de mesurer l'effort consenti par une colonie pour la collecte des ressources environnementales : une activité intense est un signe positif, généralement évocateur de bonne santé de la colonie. L'intensité du butinage par les abeilles peut être appréciée par l'observation attentive et continue de la planche d'envol. Des compteurs d'abeilles automatiques ont été très tôt mis au point dans le but d'estimer aussi le non-retour des butineuses à la ruche (Pham-Delègue *et al.* 2002). Les compteurs anciens enregistraient des impulsions électriques ou des signaux photoélectriques au passage des abeilles. Les divers appareils ont finalement été adaptés aux ruches, reliés à des systèmes informatiques performants et à des algorithmes qui autorisent, d'une part le suivi dans le temps de l'activité de butinage et,

d'autre part, la mesure de la balance entrées-sorties des abeilles pour évaluer les mortalités hors ruches. Aujourd'hui, de nombreux systèmes automatiques permettent de mesurer les comportements normaux et anormaux des colonies d'abeilles (Devilliers et Devilliers 2014).

Parmi les méthodes les plus performantes, on peut citer les compteurs apiSCAN dont la technologie repose sur des détecteurs infrarouges (Struye *et al.* 1994) et qui sont utilisés dans certains protocoles expérimentaux pour leur précision (Danka et Beaman 2007). Ces outils s'appuient parfois sur des compteurs à détection de métal voire à détection de couleurs lorsqu'ils sont couplés à des caméras (Le Conte et Crauser 2006; Poirot *et al.* 2012). Les abeilles sont alors identifiées dès leur émergence soit par des pastilles métalliques collées sur leur thorax, soit marquées à la peinture (Dussaubat *et al.* 2013; Le Conte et Crauser 2006), ce qui permet enfin le suivi de cohorte d'abeilles au sein d'une colonie et leur trait de vie (*i.e.* la chronologie des tâches effectuées par les abeilles). L'utilisation de caméras ou de radars peut enfin permettre de mesurer l'activité à la planche d'envol de façon non invasive (Campbell *et al.* 2008; Devilliers et Devilliers 2014).

#### 2.2.3.4 Estimation de la mortalité des butineuses

Certaines technologies modernes appliquées à l'abeille telle que la RFID (Radio Frequency Identification) permettent aujourd'hui de compléter cette mesure en évaluant également la durée de sortie des butineuses suivies (Decourtye *et al.* 2011b; Devilliers et Devilliers 2014; Streit *et al.* 2003). Cette technique nécessite le marquage individuel des butineuses. La précision de cette mesure automatisée est élevée et constitue un outil précieux dans la mise en place de certains protocoles expérimentaux (Henry *et al.* 2012). Les compteurs d'abeilles le permettent aussi, par différence (le soir) entre le nombre d'abeilles rentrées par rapport au nombre d'abeilles sorties ; on peut considérer qu'une grande partie d'entre elles étaient des butineuses.

#### 2.2.3.5 Estimation de la mortalité dans la colonie

Le nombre d'abeilles mortes quotidiennement au sein d'une colonie est parfois important. Ces pertes peuvent être la conséquence de la mort d'abeilles en fin de vie ou d'un trouble qui affecterait les abeilles adultes en réduisant leur espérance de vie. La ponte de la reine, qui peut atteindre la moyenne de 1 500 œufs par jour pendant la saison (Jean-Prost et Le Conte 2005; Winston 1987), doit au moins compenser les pertes en période de développement de la population. Les troubles peuvent se manifester par la présence de nombreux cadavres sur le fond de ruche ou au pied de la planche d'envol. Malheureusement, les outils disponibles pour dénombrer les abeilles mortes (trappes à abeilles mortes sur le fond ou à l'entrée de la ruche, collecteurs devant la planche d'envol) sont souvent imprécis : d'une part, ils ne mesurent que le nombre d'abeilles mortes à l'intérieur mais ne comptabilisent pas les butineuses mortes à l'extérieur (pourtant les plus exposées) et, d'autre part, l'activité des fossoyeuses qui transportent les cadavres loin de la ruche n'est par exemple pas prise en compte. Ainsi, les valeurs obtenues sont toujours sous estimées et doivent être corrigées pour être interprétables. La manière la plus fiable est probablement celle qui s'appuie sur les compteurs d'abeilles (*cf. supra*, les manquantes sont, par définition, les disparues mortes, perdues ou ayant dérivé), nombre auquel on peut ajouter celles présentes dans les collecteurs d'abeilles mortes pour obtenir la mortalité totale.

#### 2.2.3.6 Estimation de la ponte de la reine

Le bon accouplement de la jeune reine émergente est vérifié par l'apiculteur-éleveur en constatant la ponte régulière sur la portion de cadre où elle a choisi de pondre : la fertilité de la reine est généralement considérée comme bonne lorsque moins de 10 % des cellules sont inoccupées. L'observation régulière de tous les cadres du nid à couvain peut permettre de mesurer la ponte quotidienne de la reine, et donc de connaître la population d'ouvrières et de mâles à naître (elle est estimée à 1 500 œufs par jour en moyenne durant une saison apicole selon Winston (1987) et peut atteindre les 3 000 œufs pondus quotidiennement (Jean-Prost et Le Conte 2005). La fécondité, qui mesure le nombre d'adultes viables obtenus, est un paramètre plus difficilement mesurable tandis qu'il donne des informations quant aux perturbations sur le bon développement des œufs.



### 2.2.3.7 Autres méthodes et techniques d'évaluation

La radioentomologie (DR pour Diagnostic Radioentomology) est présentée par certains auteurs comme prometteuse pour l'évaluation de la santé des insectes, dont les abeilles (Greco 2010). La technique est basée sur l'utilisation d'outils sophistiqués et modernes d'imagerie médicale tels que le scanner (voir paragraphe précédent sur cette technologie). Cette technique utilise donc les rayons X et la tomодensitométrie pour obtenir des images numérisées des structures internes de la ruche (lorsque c'est la ruche peuplée qui est concernée par l'examen). Cette méthode présente l'avantage d'être peu invasive (puisqu'il n'est pas nécessaire d'ouvrir la ruche pour l'examiner) et précise (car elle permet d'observer des détails tels que les œufs ou les larves et nymphes). Néanmoins, la ruche examinée doit être déplacée et donc fermée, ce qui peut perturber les observations et surtout, comme évoqué précédemment l'usage de telles méthodes est encore réservé à la recherche.

## 2.2.4 Outils disponibles pour suivre l'évolution d'une colonie pendant une période P

Le suivi de la dynamique d'une colonie est un paramètre à prendre en compte pour mesurer son état de santé. La multiplication des examens à des temps différents et leur comparaison peut permettre de définir cette dynamique mais certains paramètres sont, de façon plus spécifique, adaptés à l'évaluation de cette trajectoire. La fréquence des visites de ses ruches par l'apiculteur est un élément essentiel pour s'assurer du bon état de santé des colonies. Les bonnes pratiques apicoles exigent des visites de printemps et d'automne ainsi que des visites en saison « aussi souvent que nécessaire » (ITSAP 2014). Pendant les périodes de développement du couvain ou lors de miellées/pollinées à risque, les visites doivent nécessairement être plus fréquentes afin de déclencher l'alerte, le cas échéant, le plus précocement possible.

Outre ces visites par l'apiculteur, des outils de monitoring sont en cours de développement, tels que le dispositif Ecobee (Odox *et al.* 2014) ou le suivi des essaimages (Bencsik *et al.* 2011) afin d'améliorer la connaissance des variables de la dynamique des populations d'abeilles en conditions naturelles.

### 2.2.4.1 Données de production

La colonie d'abeilles en bonne santé accumule des réserves en prélevant divers nectars et pollens dans son environnement afin de les stocker sous forme de miel et de pain d'abeille. Il en résulte une augmentation significative du poids de la ruche. La différence de poids de la ruche entre deux pesées, effectuées dans les mêmes conditions, peut donc être un critère intéressant d'évaluation de la santé, d'autant que le poids total des abeilles reste globalement constant sur une période courte. Les données spécifiques de production (mesure du poids des hausses, quantité de pollen prélevé dans les trappes à pollen) peuvent ainsi être des paramètres utiles. La surface de pain d'abeille stocké dans les alvéoles autour du nid à couvain, indispensable à l'élevage, est également une donnée intéressante. De même, la colonie en bonne santé est capable de produire de grandes quantités de cire afin d'étendre les constructions sur lesquelles elle pourra stocker ses réserves. Cette production - et son évolution dans le temps - sont parfois utilisées dans le monitoring des colonies suivies expérimentalement (Mattila et Seeley 2007).

Afin d'objectiver et de suivre les récoltes de la colonie, la pesée de la ruche est couramment utilisée. Elle peut être réalisée de façon simple, continue et automatisée par l'utilisation d'une balance placée sous la ruche et directement reliée à des systèmes informatiques. Buchmann et Thoenes (1990) ont été les premiers à proposer l'utilisation de balances électroniques de haute précision pour le suivi des colonies d'abeilles. Cet outil est aujourd'hui commercialisé pour les apiculteurs qui souhaitent suivre le poids de leur ruche à distance. Cette mesure peut également indiquer une brusque variation de la population d'abeilles telle qu'un essaimage ou une mortalité massive (sachant par exemple qu'un kilogramme d'abeilles correspond environ à 10 000 individus).

Enfin, le poids de la ruche, mesuré précisément et en continu peut être suffisamment informatif pour permettre d'évaluer l'activité de la colonie au sens large à des fins scientifiques et comme un outil de décision en apiculture (Meikle *et al.* 2008).

#### 2.2.4.2 Suivi de la population

Le taux de ponte de la reine est crucial pour la survie de la colonie comme le taux de mortalité. Couplé à des modèles mathématiques de dynamique de populations, ce taux permet de prévoir l'évolution populationnelle de la colonie (Schmickl et Crailsheim 2007). Le suivi de la population totale d'abeilles peut être réalisé en multipliant les comptages selon les méthodes précédemment décrites ou par l'information délivrée par des balances automatiques. De même, le ratio quotidien abeilles nées/abeilles mortes serait un paramètre utile pour appréhender si la population de la colonie décline ou progresse : son calcul nécessite de connaître le nombre d'abeilles émergentes et le nombre d'abeilles mortes par unité de temps.

L'essaimage, phénomène naturel, représente une baisse brutale et conséquente de la population coloniale qui nuit à la productivité de la ruche. Il ne faut pas confondre cet effondrement du nombre d'abeilles avec un affaiblissement anormal d'une colonie. Le dépistage précoce de l'essaimage est possible par l'enregistrement en continu des sons émis par la colonie. En effet, outre une augmentation de la température au sein de la ruche, certains auteurs (Ferrari *et al.* 2008) ont mis en évidence, à l'approche de l'essaimage, une augmentation continue en amplitude et en fréquence des sons émis par les abeilles. Le programme européen « Swarmonitor » (projet FP7-SME-2012-2) devrait permettre de développer ces techniques non invasives de suivi des populations, en cas d'essaimages ou d'altérations de la santé.

Toutefois, la courbe de population n'est pas un indicateur suffisant pour mesurer la bonne santé d'une colonie car elle n'indique pas, par exemple, comment sont réparties les tâches entre ouvrières et la rotation des activités des abeilles : le déclin d'une colonie n'est pas forcément la conséquence d'une mortalité d'abeilles les plus âgées, donc des butineuses. Même si les butineuses sont les plus exposées aux facteurs de stress extérieurs, l'impact de ces facteurs sur des abeilles d'intérieur peut provoquer un déséquilibre des populations selon les tâches à accomplir. La réversion des tâches (butineuses redevenant abeilles d'intérieur) ou leur accélération (abeilles d'intérieur devenant rapidement butineuses) constitue donc un déséquilibre qui requiert un effort particulier (organisation et énergie) pour maintenir l'état de bon équilibre de la colonie. Cette redistribution n'est pas mesurée par la simple courbe de suivi de la population.

Deux observatoires de ruchers ont été mis en place depuis plus de 7 ans par des scientifiques afin de comprendre l'évolution des colonies en fonction du contexte paysager, climatique, toxicologique ou parasitaire. Le premier, Ecobee, est animé par le CNRS de Chizé (CEBC) et l'INRA (Unité Entomologie Le Magneraud et UR 406 Avignon). Il permet notamment l'étude écologique des relations entre les ressources disponibles et le développement des colonies (Odox *et al.* 2014; Requier *et al.* Sous presse). Le second s'intéresse aux facteurs favorisant ou pénalisant la miellée de lavande et est animé par l'UMT PrADE (unité INRA Biostatistique et Processus Spatiaux et ADAP<sup>9</sup> ; Decourtye, communication personnelle).

#### 2.2.4.3 Suivi de la température du couvain

Pour un développement normal, la température du nid à couvain doit idéalement être maintenue entre 32 °C et 36 °C avec une moyenne à 34,5 °C (Kronenberg et Heller 1982). La lutte contre le chaud ou contre le froid autour du couvain est vitale pour la survie de la colonie : des abeilles en bonne santé et en quantité suffisante doivent être capables de maintenir cette température moyenne. Cette thermorégulation est essentiellement permise par l'action des ouvrières (ventilation et apport d'eau contre le chaud et thermogénèse contre le froid). Ainsi, la température autour du couvain et le suivi de cette donnée pourraient être utilisés comme paramètres de la santé de la colonie. Quelques techniques expérimentales permettent d'évaluer et de suivre cette température. Auparavant, des thermocouples étaient utilisés. Plus récemment, Becher et Moritz (2009) ont utilisé des capteurs (« thermistors ») placés au centre d'une colonie et reliés à un ordinateur pour suivre l'évolution de la température du nid pendant trois jours. Les thermomètres à infrarouge sont parfois utilisés pour mesurer la température au sein des colonies, notamment dans les études relatives à la physiologie de la thermogénèse par les abeilles, en particulier au sein des grappes hivernales

<sup>9</sup> Association pour le développement de l'apiculture provençale

(Stabentheiner *et al.* 2003; Stabentheiner et Schmaranzer 1987). Néanmoins, ces méthodes restent expérimentales et ne sont pas utilisées au quotidien à cause de leur coût.

#### 2.2.4.4 Modèles mathématiques

Le développement physiologique d'une colonie d'abeilles et la dynamique de sa population sont assez bien connus et dépendent de multiples facteurs intrinsèques (âge de la reine, sous-espèce, *etc.*) et extrinsèques (climat, région, saison, ressources alimentaires, *etc.*). Ce développement est modélisable et des équations mathématiques permettent aujourd'hui de projeter l'évolution d'une colonie en fonction de certains paramètres de départ. La question des modèles mathématiques est abordée dans le paragraphe 5.4.2.

### 2.2.5 Outils manquants

Une majorité des outils et méthodes proposés dans les paragraphes précédents ne sont pas utilisables en routine par les apiculteurs : soit il s'agit de technologies coûteuses, soit elles sont plutôt adaptées à un usage scientifique, soit elles sont invasives. Aujourd'hui, seules les évaluations reposant sur des observations ou sur des balances sont envisageables au quotidien. Des outils supplémentaires sont donc attendus afin d'améliorer l'appréciation de la santé des colonies.

#### 2.2.5.1 Outils diagnostiques

Le recueil des signes cliniques et lésionnels des colonies repose aujourd'hui uniquement sur des observations fortement dépendantes de l'expérience et des connaissances des techniciens sanitaires apicoles et des vétérinaires cliniciens. A l'instar des autres espèces, le vétérinaire clinicien pourrait affiner son diagnostic présumptif s'il disposait d'outils de mesure simples et novateurs en termes de sémiologie lors de l'examen clinique. Ces outils devraient être pratiques et utilisables sur le terrain. De même, l'accès aux examens complémentaires, et en particulier à des tests rapides, est encore trop restreint en apiculture. Il existe des tests rapides pouvant être réalisés directement au rucher pour aider au diagnostic des loques<sup>10</sup>, mais il manque un atlas de pathologie de l'abeille, en particulier concernant les examens microscopiques des tissus (histologie). Enfin, les données épidémiologiques (précieuses comme aide au diagnostic et dans la gestion du risque) dont dispose la filière apicole sont encore ponctuelles, partielles et récentes : les efforts consentis depuis deux ans (programme européen Epilobee) ont permis de mieux connaître la prévalence et l'incidence des maladies et troubles des abeilles en France mais seule une veille continue peut permettre d'apporter une information pérenne. Les autres filières animales disposent de moyens de veille qui ont fait leur preuve depuis plusieurs décennies et ces modèles pourraient être appliqués à la filière apicole.

#### 2.2.5.2 Estimation des mortalités

Les comptages de disparition de butineuses ne sont, à ce jour, pas possibles en routine. D'autre part, les trappes à abeilles mortes ne suffisent pas à elles seules à mesurer les mortalités d'abeilles au sein des colonies. De nouveaux outils de mesure de la mortalité, utilisables au quotidien, sont donc nécessaires : outre la précision dans la mesure, ils doivent permettre de mesurer précocement les mortalités afin d'aider l'apiculteur à déclencher l'alerte au plus tôt, notamment en cas d'intoxication où le délai entre l'exposition et la recherche du toxique doit être courte du fait du métabolisme ou de la dégradation rapide des toxiques. Une détection précoce implique nécessairement un suivi à distance avec déclenchement d'alertes. Les outils permettant une détection précoce de baisses brutales de population ne sont pas disponibles en routine (balances, compteurs d'entrée – sortie des butineuses) et les moyens disponibles sont souvent trop onéreux pour être accessibles à tous et/ou concerner un grand nombre de colonies.

<sup>10</sup> Actuellement, en pathologie apicole, seuls deux tests par immunochromatographie (ELISA) sont disponibles pour les loques américaine et européenne

### 2.2.5.3 Estimation de la répartition des classes d'âge

La connaissance de la répartition des tâches au sein de la population permettrait de mieux appréhender les phénomènes de mortalités et d'affaiblissement. Les comptages des envols ne permettent pas de connaître de façon précise la part de la population affectée au butinage. En effet, une part significative d'abeilles qui entrent et sortent ne sont pas des butineuses (Van der Steen *et al.* 2012). De la même manière, les différentes classes d'âges sont régulièrement réparties entre les cadres d'une ruche (Van der Steen *et al.* 2012), ce qui rend difficile l'appréciation de la pyramide des âges au sein d'une colonie.

### 2.2.5.4 Données prédictives pour estimer le devenir d'une colonie

Les modèles mathématiques permettent des projections et simulations de dynamique de population en fonction de situations possibles. Toutefois, certains paramètres biologiques ne peuvent pas encore être intégrés à ces modèles. Pourtant, la prédiction de l'évolution d'une colonie serait précieuse dans la gestion de ses colonies par l'apiculteur (gestion des non valeurs, gestion du cheptel de renouvellement, amélioration de la productivité) et l'on sait aujourd'hui que certains bio marqueurs constituent des facteurs prédictifs de la santé des colonies (Dainat *et al.* 2012b). Une meilleure connaissance de ces facteurs prédictifs, regroupés par exemple sous forme de bilans de santé des colonies, permettrait donc de mieux prévenir certains risques d'effondrement.

## 2.3 Propositions d'indicateurs de la santé des abeilles / colonies d'abeilles

### 2.3.1 Indicateurs utilisables par l'apiculteur

Parmi les différents indicateurs de la santé cités dans les paragraphes précédents, l'apiculteur peut suivre la bonne évolution de ses colonies en s'appuyant, par exemple, sur les outils suivants :

- observation de l'activité sur la planche d'envol ;
- observation des cadres de couvain et des abeilles afin d'estimer la force de la colonie (première impression à l'ouverture de la ruche, nombre d'inter-cadres occupées, surface de couvain ouvert et operculé, *etc.*) ;
- observation de la reine et de la qualité de sa ponte ;
- production de la cire (la cire récemment produite apparaît blanchâtre), suivi des entrées de pollen, de nectar et de miellat ;
- balances permettant la pesée des ruches (obtention de données de production et de données de population) ;
- suivi à distance de ce poids, associé à des données climatiques du site du rucher.

Quelques outils supplémentaires sont en cours de développement :

- suivi à distance de l'activité à la planche d'envol par des systèmes vidéo ;
- monitoring des vibrations et sons émis par la colonie pour prévoir l'essaimage ;
- « thermoboutons » pour suivre la température à l'intérieur de la ruche.

Certaines informations, actuellement incomplètes ou indisponibles, permettraient d'améliorer l'appréciation par l'apiculteur du développement de ses colonies : on pourrait citer l'absence de valeur de références, disponibles localement. La définition d'une colonie au comportement « normal » fait défaut, surtout lorsque, par opposition, le comportement d'une colonie est décrit comme « anormal ». Il faudrait définir des moyennes par région et/ou par sous-espèces utilisées en s'appuyant sur des données anciennes telles que celles issues des travaux de Louveaux *et al.* (1966) afin de les actualiser et de les développer. Il serait également envisageable de placer des colonies d'abeilles dans plusieurs environnements donnés, de les suivre avec des outils de mesure physico-chimiques et biologiques disponibles, d'autocorréler ces paramètres (comparaison d'une colonie par rapport à elle-même) et d'en déduire un état moyen normal en fonction du temps, de l'environnement et de l'interaction temps-environnement, dans une région donnée. Ces états moyens normaux, une fois définis, devront être facilement accessibles à l'image de ceux issus des

fermes de référence dans les autres filières, par exemple). L'utilisation de sites gratuits en ligne (exemple de <http://hivetool.net/> aux Etats-Unis), permettrait ainsi d'aider et d'assister l'apiculteur dans la bonne gestion zootechnique de son rucher.

### 2.3.2 Indicateurs utilisables par le vétérinaire clinicien

Outre les informations précédentes collectées par l'apiculteur et constituant les commémoratifs qui seront pris en compte par le vétérinaire clinicien, les éléments suivants sont utilisables par le vétérinaire clinicien :

- l'examen clinique ;
- quelques tests rapides réalisables « au chevet de la colonie malade » (type test ELISA pour les loques) ;
- quelques examens complémentaires de laboratoire, y compris les recherches de résidus ;
- quelques données épidémiologiques (nombre de colonies atteintes, épizootie, mouvements d'animaux, contexte régional, etc.).

Ces outils sont, comparés aux autres espèces, très limités (cas des examens de laboratoire et des tests rapides) ou parcellaires (cas des données épidémiologiques). D'autres outils, utilisables « au chevet de la colonie malade » devraient être développés afin de faire progresser l'examen sémiologique et améliorer les orientations diagnostiques sur le terrain. La définition de constantes physiologiques permettrait également d'aider le vétérinaire clinicien dans sa démarche diagnostique ou dans le développement d'outils de bonne santé tels que les bilans de santé.

### 2.3.3 Indicateurs utilisables par le chercheur

Les outils d'évaluation de la santé des abeilles/colonies d'abeilles disponibles pour le scientifique sont nombreux. Des méthodes standardisées pour la recherche apicole, s'appuyant sur les outils actuellement disponibles et consolidés, ont récemment été recensés par le groupe Coloss dans le *Journal of Apicultural Research* (Beebook, 2013<sup>11</sup>). Les chercheurs ont ainsi accès aux outils suivants :

- à l'échelle individuelle (abeille seule) : tests de comportement, poids des émergentes, radioentomologie, examen anatomopathologique, biomarqueurs individuels, etc. ;
- à l'échelle de la colonie : balances de haute précision, différents compteurs d'abeilles, suivi de la température du couvain par thermocapteurs, suivi des butineuses identifiées par radiofréquence (technologie RFID) ou par caméra, etc. ;
- à l'échelle d'un rucher : addition des moyens précédents aux données paysagères (exemple d'Ecobee) ;
- modèles mathématiques.

<sup>11</sup> <http://www.coloss.org/beebook>

## 2.4 Conclusions / recommandations

Définir l'état de santé des colonies d'abeilles, pour mieux déterminer leur état « normal » ou « anormal » et mieux caractériser les troubles d'une colonie, apparaît à l'heure actuelle comme une nécessité. L'évaluation de la santé d'une colonie d'abeilles repose sur l'estimation de plusieurs critères : taille de la population, niveaux de ponte, d'activité de la ruche, de mortalité quotidienne normale des abeilles et d'agents infectieux et parasitaires. Elle s'appuie sur un examen clinique associé, le cas échéant, à des examens complémentaires. Plusieurs outils sont disponibles pour ces estimations, à un moment donné et/ou dans le cadre d'un suivi de la dynamique d'une colonie.

Le groupe de travail a recensé plusieurs outils manquants, en soulignant l'intérêt de distinguer, les outils utilisables par les apiculteurs et ceux destinés au diagnostic, voire à la recherche. Des recherches devraient ainsi être encouragées pour :

- établir des constantes physiologiques chez les abeilles et colonies d'abeilles ;
- améliorer et développer des dispositifs d'évaluation du taux de mortalité et de disparition des ouvrières, en particulier des butineuses ;
- développer des outils visant à mesurer l'équilibre des différentes castes et classes d'âge dans les colonies ;
- développer des outils diagnostiques de référence, validés et harmonisés, utilisables à plusieurs niveaux (sur le terrain pour l'évaluation des colonies comme en laboratoire pour les analyses). Ces outils de référence permettront notamment de garantir la qualité, la représentativité et la comparabilité des résultats ;
- disposer d'un atlas de pathologie des abeilles ;
- développer des modèles mathématiques pour comprendre les effets potentiels des perturbateurs de la santé des colonies, et comme alerte sur la santé des colonies ;
- disposer de données de référence (état moyen d'une colonie) dans un environnement et une région donnés.

## 3 Facteurs de stress

En préambule, il convient de rappeler que l'autosaisine porte uniquement sur les dangers présents en France métropolitaine. Par conséquent, les dangers biologiques exotiques (e.g. *Aethina tumida*, apparu récemment en Italie, et *Tropilaelaps spp.*) et les substances non utilisées en France à l'heure actuelle ne sont pas abordés.

### 3.1 Données bibliographiques

En biologie, on entend par stress l'ensemble des réponses d'un organisme à des facteurs qui menacent son intégrité. Dans le cadre des co-expositions des abeilles aux facteurs de stress, un certain nombre de facteurs ont été recensés dans la bibliographie et sont décrits ci-dessous : il s'agit de facteurs biologiques, chimiques, alimentaires, physiques, de facteurs liés aux pratiques apicoles ou aux conditions climatiques.

Il convient de souligner que la présentation des facteurs de stress dans ce chapitre ne résulte pas d'une hiérarchisation, que ce soit entre les types de facteurs ou au sein de chacun de ces groupes.

#### 3.1.1 Facteurs biologiques

##### 3.1.1.1 Introduction

Par analogie avec les maladies infectieuses et parasitaires des vertébrés, la colonie sera traitée comme un individu-hôte (superorganisme). Les différents compartiments (classes d'âge mais aussi rayons) peuvent être parasités (ou contaminés) par des agents infectieux et d'autres organismes. Les réserves prélevées par l'homme (miel, pollen...) ainsi que les jeunes reines en élevage, sont assimilables à la « production » de la colonie.

Plusieurs dangers biologiques (bactéries, virus, champignons, protozoaires, parasites, prédateurs) ont été reconnus comme capables de causer des entités cliniques définies, au travers de mécanismes pathogéniques ayant un impact sur tel ou tel compartiment de la colonie, ou sur la production (Evans et Schwarz 2011; Genersch 2010). En effet, dans certaines entités pathologiques bien connues, dénommées « maladies infectieuses ou parasitaires », les conséquences dommageables pour l'organisme hôte sont directement attribuables à l'action spoliatrice de l'organisme biologique « pathogène ». L'organisme « pathogène » est, biologiquement parlant, toujours un agent infectieux (ou parasitaire) qui vit aux dépens de son hôte. Souvent, l'intensité des troubles va de pair avec l'abondance de cet agent infectieux. Les dommages vont du détournement de certaines voies métaboliques à des lésions tissulaires aboutissant parfois à la destruction cellulaire. La mort ou l'affaiblissement des individus entraîne des baisses de production et peut conduire au déclin de la colonie entière.

En partant du principe que l'unité épidémiologique pour la mesure d'un état de maladie est la colonie, l'incrimination d'un agent biologique comme facteur causal se fait donc par détection et quantification de celui-ci dans la colonie malade et en prenant en compte, pour certains, les signes cliniques induits qui peuvent être caractéristiques. Le degré d'infection par un agent infectieux peut être variable d'un individu à l'autre dans la colonie, d'où l'importance de faire un échantillonnage représentatif de plusieurs individus dans la colonie (dans le compartiment d'intérêt) pour faire une évaluation quantitative de l'infection (Rivière *et al.* 2010). Il existe souvent, au sein d'une même classe d'agents infectieux, des variants génétiques plus ou moins virulents, qui peuvent être caractérisés par des marqueurs génétiques.

Dans les paragraphes descriptifs suivants, les agents reconnus comme potentiellement pathogènes sont présentés avec leurs mécanismes pathogéniques. Les études expérimentales se sont souvent intéressées à l'effet de chaque agent sur les abeilles individuelles ; les effets sur la colonie peuvent être plus complexes et progressifs. Certains agents peuvent en effet être à l'origine d'un

déséquilibre des classes d'âge conduisant à un affaiblissement de la colonie. De plus, les effets sur la colonie pourront être différents selon le type de castes affecté (reine, mâles, ouvrières).

Cependant, on observe une grande proportion de colonies asymptomatiques qui sont porteuses d'agents infectieux ou parasitaires connus pour être susceptibles de provoquer des troubles de la santé de l'abeille (Chauzat *et al.* 2010). L'infection et l'infestation sont des phénomènes dynamiques qui reposent sur l'exposition à la contamination (dose infectante), la résistance de l'hôte et le stade d'évolution de l'infection mais aussi l'action d'autres facteurs favorisants. Dans des colonies à l'équilibre, plusieurs types d'agents infectieux peuvent être présents simultanément, en même temps qu'une flore commensale, qui comprend des bactéries, des protozoaires, des champignons et des virus non pathogènes voire bénéfiques pour la colonie (Cornman *et al.* 2012b). Au sens large, la microflore du pain d'abeilles par exemple peut également être considérée comme faisant partie de la microflore de la colonie. Les nouvelles techniques de séquençage à haut-débit donnent accès depuis peu de temps à la composition de cette microflore (Runckel *et al.* 2011).

Le dernier paragraphe, concernant le portage asymptomatique, passera en revue les études montrant le portage de différents agents potentiellement pathogènes dans des colonies sans signes cliniques.

### 3.1.1.2 Présentation des dangers biologiques d'intérêt dans le cadre des co-expositions et interactions, en France métropolitaine

#### 3.1.1.2.1 Bactéries

Parmi les bactéries pathogènes de l'abeille, deux espèces principales peuvent entraîner des mortalités des larves, *Paenibacillus larvae* et *Melissococcus plutonius*, respectivement agents de la loque américaine et de la loque européenne (Forsgren 2010; Genersch 2010).

#### **Historique de la découverte**

Les loques, maladies contagieuses qui affectent le couvain, sont des entités pathologiques connues depuis le XVIII<sup>ème</sup> siècle, mais ce n'est qu'au début du XX<sup>ème</sup> siècle que l'on distingue la loque européenne de la loque américaine, avec des agents infectieux causaux distincts - revue dans (Forsgren 2010).

##### 3.1.1.2.1.1 Loque américaine

- **Agent infectieux**

*Paenibacillus larvae*

En 2006, Genersch *et al.* ont démontré que les deux sous-espèces *P. larvae* subsp. *larvae* et *P. larvae* subsp. *pulvifaciens* ne correspondaient qu'à une seule espèce nommée *Paenibacillus larvae* sur la base de critères biochimiques, génétiques et de virulence (Genersch 2010; Genersch *et al.* 2006a).

- **Maladie**

Loque américaine / American foulbrood / AFB

- **Evolution de la répartition géographique, actualité**

La distribution de *P. larvae* est mondiale. Quatre clusters génétiques sont connus (typage moléculaire par ERIC-PCR), dont deux génotypes de virulence élevée, ERIC I et ERIC II (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) qui co-circulent en Europe (Morrissey *et al.* 2014; Peters *et al.* 2006; Rusenova *et al.* 2013). La virulence des ERIC types III et IV est moins connue.

- **Description morphologique et moléculaire**

*Paenibacillus larvae* est une bactérie Gram positive, produisant des spores. Ces spores, extrêmement résistantes, constituent le mode de dissémination et de contamination de la bactérie. *P. larvae* a été assigné par génotypage de l'ARNr16S au genre *Paenibacillus*, distinct du genre *Bacillus*. Le génome de *P. larvae* a été complètement séquencé (Chan *et al.* 2011; Qin *et al.* 2006). Dans une étude de génomique comparative, Djukic *et al.* (2014) montrent que les deux génotypes ont la capacité de sécréter de nombreuses toxines et collagénases, et sont caractérisés par une



grande plasticité génomique (présence de transposases, intégrases, recombinases) favorisant l'acquisition d'éléments de virulence par transfert horizontal. Les deux génotypes diffèrent assez fortement entre eux sur le plan génomique, ce qui se reflète dans leur virulence. Il arrive que les deux génotypes soient observés simultanément dans une même colonie (Rusenova *et al.* 2013).

Il n'y a pas d'îlots de pathogénicité connus chez *P. larvae*, mais l'adaptation à l'hôte (et donc la virulence) est liée à la présence d'un cluster génétique de grande taille codant pour des polyketides/peptide-synthétases non-ribosomales (« PK/NRPS gene clusters »). Ces enzymes permettent la synthèse de molécules antimicrobiennes (antibiotiques, antiparasitaires et antifongiques) grâce auxquelles la bactérie détruit ses compétiteurs et la flore commensale de la larve (Genersch 2010; Yue *et al.* 2008). En particulier, un tripeptide non-ribosomal antibactérien a récemment été identifié (Garcia-Gonzalez *et al.* 2014a; Genersch 2010; Yue *et al.* 2008). Garcia-Gonzalez *et al.* (2014b) ont également caractérisé une protéine impliquée dans la dégradation de la chitine de la membrane péritrophique au cours de l'infection des larves. D'autres facteurs de virulence incluant notamment des toxines et d'autres métabolites sécrétés ont également été mis en évidence (Djukic *et al.* 2014; Fünfhaus *et al.* 2013; Krska *et al.* 2015; Schild *et al.* 2014).

- **Manifestations cliniques, pouvoir infectieux/pouvoir pathogène**

*Paenibacillus larvae* infecte les larves durant les premiers jours après l'éclosion. Les bactéries prolifèrent dans le tube digestif, avant d'envahir l'hémocoèle et de détruire la larve par la libération de protéines dégradant la chitine. Cliniquement, cela se manifeste par un contenu des alvéoles brun filant, puis desséché en écailles (Garcia-Gonzalez *et al.* 2014b; Yue *et al.* 2008). Une partie seulement des alvéoles sont atteintes sur un cadre de couvain. Les adultes ne présentent pas de signes cliniques. Les spores sont extrêmement résistantes dans l'environnement de la ruche (alvéoles, cire) et véhiculées par les abeilles nourrices ainsi que lors de l'évacuation des larves mortes ou du nettoyage des alvéoles. Les génotypes ERIC-I et ERIC-II qui co-circulent en Europe, diffèrent par la durée nécessaire à l'infection systémique d'une larve, ce qui conduit à la mort de la larve avant ou après operculation du couvain et modifie donc l'accessibilité pour le nettoyage. Ceci a des conséquences sur les manifestations cliniques. Ainsi, la virulence à l'échelle de la colonie est inversement proportionnelle à la rapidité d'invasion de la larve par la bactérie (Rauch *et al.* 2009). Le génotype d'infection lente (ERIC I) est responsable de taux de mortalité plus importants à l'échelle de la colonie et d'une production de spores plus élevée, du fait d'une élimination plus tardive et moins efficace des larves malades par les ouvrières.

Le comportement hygiénique des ouvrières, à support génétique, est une composante essentielle de la réponse d'une colonie à cette maladie.

L'essaimage a un effet curatif sur la maladie, en écartant les adultes de l'environnement contaminé, d'où l'intérêt des méthodes de transvasement (« shook swarm method ») (Fries *et al.* 2006; Pernal *et al.* 2008).

- **Situations de co-infections/co-exposition à d'autres facteurs de stress**

Pour cette maladie, le comportement hygiénique des ouvrières est déterminant pour les conséquences de l'infection à l'échelle de la colonie. Ce comportement repose sur des facteurs génétiques et peut être altéré par des dangers chimiques - perturbation de l'olfaction par exemple (Kadala *et al.* 2014). De plus, des interactions sont possibles au niveau du microbiote de la larve, favorisant la prolifération de la bactérie ou l'envahissement de l'hémocoèle par fragilisation intestinale. de Smet *et al.* (2014) ont montré que la teneur en sucres des liquides intestinaux et de l'hémocoèle chez la larve avait des effets régulateurs sur l'expression de ces différents gènes, et de la croissance de *P. larvae* en général. On peut donc penser que la composition du régime alimentaire des larves joue également dans la dynamique de l'infection.

- **Détection**

L'infection se manifeste par un couvain en mosaïque, avec des opercules affaissés et percés et des larves brunes filantes. Le diagnostic peut se faire par le « test de l'allumette ». Ce test consiste à introduire une allumette dans l'alvéole supposée infectée. En retirant l'allumette, il apparaît un filament brun visqueux si la larve est infectée. L'aspect très visqueux est caractéristique de la loque américaine. Cependant, le diagnostic doit être confirmé par un test de laboratoire. Les alvéoles de

larves malades contiennent *P. larvae* en grande quantité. Le Manuel terrestre de l'OIE (OIE 2014) liste les méthodes bactériologiques et moléculaires de référence pour la détection et l'identification, notamment un jeu d'amorces pour la détection spécifique du gène codant pour le fragment 16S de l'ARN ribosomal. Dans la Revue Scientifique et Technique de l'OIE, Rivière *et al.* (2013) recommandent la généralisation de méthodes de PCR quantitative, de façon à disposer d'une information de la charge infectante, plus sensible et plus facile à mettre en œuvre que le comptage de spores. La charge infectante est très hétérogène au sein d'un rucher infecté et à l'intérieur d'une colonie. Il est nécessaire dans un cadre diagnostique de faire des prélèvements répartis sur plusieurs colonies (Forsgren et Laugen 2013; Lindström 2008; Rauch *et al.* 2009).

Il n'existe à l'heure actuelle pas de méthode de génotypage sub-spécifique normalisée, ni de base de données internationale. Cependant, les méthodes de sous-typage reposant sur les profils de PCR sur des séquences répétées telles que ERIC, REP et BOX paraissent les meilleurs candidats pour caractériser des sous-types géographiques corrélés avec la virulence (Genersch 2010; Rusenova *et al.* 2013).

- **Traitement, contrôle et méthodes de prévention**

La méthode de choix pour l'élimination des colonies cliniquement malades est la destruction de la ruche par le feu. Seules les spores sont capables d'initier la maladie, elles sont extrêmement résistantes aux conditions d'environnement, à la chaleur et aux agents chimiques.

Les méthodes de transvasement (« shook swarm method ») sont efficaces mais seulement pour les colonies infectées non cliniquement malades, dont la charge en spores sur les adultes est faible (20 CFU vs 6 000 CFU chez des adultes provenant d'une colonie malade) (Pernal *et al.* 2008; Rauch *et al.* 2009). Dans le cas des colonies malades ces méthodes sont insuffisantes.

Bien que le traitement antibiotique soit interdit en France, *P. larvae* est sensible à l'oxytétracycline et au sulfathiazole, mais il apparaît des souches résistantes, en lien avec un plasmide mobilisable pMA67 (gène de résistance *tetL* (Ammor *et al.* 2008)), susceptible d'être hébergé par d'autres bactéries du couvain telles que *Paenibacillus alvei*. Les antibiotiques ne sont pas actifs sur les spores et leur usage en apiculture est interdit dans l'Union européenne (cf. paragraphe 3.1.2.4.1).

- **Réglementation de la maladie**

La loque américaine est classée comme danger sanitaire de première catégorie (arrêté ministériel du 29 juillet 2013). Elle est sur la liste des maladies notifiables de l'OIE (OIE 2015). Dans la réglementation européenne elle est sur la liste A des maladies notifiables de la directive 92/65/CEE du Conseil du 13 juillet 1992 et, au sein de l'Union européenne, les échanges d'animaux vivants sont soumis à certification sanitaire (règlement (UE) n° 206/2010).

### 3.1.1.2.1.2 Loque européenne

- **Agent infectieux**

*Melissococcus plutonius* est une bactérie Gram positive, ne formant pas de spores.

- **Maladie**

Loque européenne / European Foulbrood / EFB

- **Evolution de la répartition géographique, actualité**

La loque européenne a une répartition mondiale, excepté en Nouvelle-Zélande. Une recrudescence de cas cliniques sévères est observée en Europe depuis les années 90, en particulier en Suisse (Roetschi *et al.* 2008) et en Grande-Bretagne (Haynes *et al.* 2013).

- **Description morphologique et moléculaire**

La bactérie *M. plutonius* est la seule espèce du genre *Melissococcus*, apparenté aux *Enterococci*. Elle est assez pléiomorphe<sup>12</sup> à l'examen direct (Gram positive, ne formant pas de spores). Sur le plan génétique, l'espèce est remarquablement homogène partout dans le monde. Il a été cependant possible récemment de distinguer des génotypes locaux par une approche MLST (multi-locus

<sup>12</sup> Susceptible de prendre différentes formes

sequence typing) (Haynes *et al.* 2013). Plus récemment, cette approche a permis de distinguer des variants géographiques liés à des cas plus ou moins sévères (Budge *et al.* 2014). Cependant, dans cette récente étude les variables concernant d'autres facteurs de stress n'ont pas été mesurées.

- **Manifestations cliniques, pouvoir infectieux/pouvoir pathogène**

*M. plutonius* infecte l'intestin des larves, l'infection est souvent létale en 4-5 jours, avant l'operculation du couvain.

La maladie se manifeste par un couvain non operculé en mosaïque, dont une partie des larves ont été tuées. Celles-ci meurent déplacées dans l'alvéole, et présentent une coloration jaune, puis marron et enfin gris noirâtre. Les larves étant sensibles à l'infection quel que soit leur âge, le couvain operculé peut également être atteint, avec un aspect ressemblant à la loque américaine. Cependant, les larves peuvent survivre si elles ont été infectées tardivement. Les adultes qui émergent sont alors plus petits et porteurs de l'infection, propageant la bactérie par leurs déjections dans la ruche (Forsgren 2010). Le génome complet de la souche-type a été séquencé (Okumura *et al.* 2011), donnant des pistes sur les mécanismes de virulence, les gènes pouvant être utilisés pour un diagnostic plus spécifique et les gènes support pour le typage de variants. La souche séquencée héberge notamment des séquences CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) conférant une résistance à l'infection par des phages.

Ainsi, le génome de *M. plutonius* apparaît beaucoup moins plastique que celui de *P. larvae*, mais la vaste distribution mondiale de cette bactérie témoigne de son caractère généraliste de parasite des abeilles.

- **Situations de co-infections/co-exposition à d'autres facteurs de stress**

Le pouvoir pathogène direct de *M. plutonius* a pu être corrélé expérimentalement à la dose infectante, cependant on trouve fréquemment cette bactérie en co-infection avec d'autres agents infectieux opportunistes tels que *Achromobacter euridice*, *Enterococcus faecalis*, *Brevibacillus laterosporus*, ou *Paenibacillus alvei*, dont le rôle dans les mécanismes de pathogénicité reste mal connu. Ces saprophytes sont souvent plus abondants dans les alvéoles malades, lors du diagnostic, que *M. plutonius* proprement dit.

- **Détection**

Les larves malades sont de couleur jaune-marron et sont non filantes, contrairement à celles atteintes de la loque américaine. *M. plutonius* est la plus abondante dans les alvéoles contenant des larves malades, mais peut être indétectable dans les alvéoles voisines. Elle peut également être difficile à détecter en fin d'évolution de l'infection, lorsque d'autres microorganismes ont proliféré (cf. ci-dessus). Dans une colonie malade, les ouvrières du corps de ruche sont généralement porteuses de la bactérie, détectable et quantifiable par des approches de PCR quantitative (Rivière *et al.* 2013; Roetschi *et al.* 2008). Les méthodes de détection bactériologiques et moléculaires de référence sont listées dans le Manuel terrestre de l'OIE (OIE 2014).

- **Traitement, contrôle et méthodes de prévention**

La méthode de transvasement « shook swarm method » peut être utilisée, mais en Grande-Bretagne, où la maladie est à déclaration obligatoire, les colonies fortement atteintes sont détruites (Budge *et al.* 2014). Cependant, une étude a montré que la destruction systématique pratiquée en Suisse ne permettait pas d'enrayer les cas cliniques. Ceci est probablement dû à la persistance de l'infection dans les colonies voisines, particulièrement en situation de forte densité spatiale de ruchers (Roetschi *et al.* 2008). La transmission par du miel contaminé importé est possible et peut expliquer l'apparition de variants génétiques nouveaux émergeant localement. Bien que *M. plutonius* soit sensible à l'oxytétracycline, le traitement antibiotique (interdit dans l'Union européenne en pathologie apicole, cf. paragraphe 3.1.2.4.1) est insuffisant en cas d'infection sévère de la colonie. Contrairement à *P. larvae*, il n'y a pas de résistance connue aux tétracyclines dans cette espèce.

- **Réglementation de la maladie**

La loque européenne ne figure pas parmi les dangers de première et deuxième catégorie de l'arrêté du 29 juillet 2013. Elle figure sur la liste B des maladies pouvant faire l'objet de programmes

nationaux dans la réglementation européenne (directive CEE/92/65 du Conseil du 13 juillet 1992) et fait partie des maladies notifiables à l'OIE (OIE 2015).

### 3.1.1.2.2 Virus

Jusqu'en 2011, 19 virus avaient été décrits chez l'abeille (Chen et Siede 2007; Evans et Schwarz 2011). La plupart sont des petits virus à ARN simple brin positif qui ont été classés comme virus apparentés à la famille des *Picornaviridae*. Plus récemment, Runckel *et al.* (2011), dans une étude basée sur l'analyse temporelle du microbiome de l'abeille, ont identifié quatre autres virus à ARN pouvant infecter *Apis mellifera*. Enfin, Li *et al.* (2014a) ont suggéré qu'un virus pathogène de plante (tobacco ringspot virus - TRSV) pourrait se répliquer chez l'abeille domestique.

Parmi les principaux virus qui seront décrits ci-dessous, on retrouve le virus des ailes déformées – DWV (Lanzi *et al.* 2006) -, le virus de la cellule noire de la reine – BQCV (Leat *et al.* 2000) -, le virus de la paralysie chronique – CBPV (Olivier *et al.* 2008a) -, le virus du couvain sacciforme – SBV (Ghosh *et al.* 1999) - et le complexe AKI qui regroupe 3 virus, le virus de la paralysie aiguë – ABPV (Govan *et al.* 2000) -, le virus du Cachemire – KBV (de Miranda *et al.* 2004) - et le variant israélien du virus de la paralysie aiguë – IAPV (Maori *et al.* 2007a).

Beaucoup d'infections virales restent asymptomatiques, certaines peuvent être la cause de maladies du couvain ou des abeilles adultes associées à des malformations, des paralysies aboutissant parfois à un affaiblissement et/ou à la mortalité des colonies (Chen et Siede 2007; Olivier et Ribière 2006). Il est important de signaler que l'apparition de l'acarien parasite *Varroa destructor*, de par sa capacité à transmettre et/ou à provoquer l'activation de la réplication de certains virus, semble avoir modifié l'équilibre entre virus et abeilles (de Miranda et Genersch 2010; Mondet *et al.* 2014; Nazzi *et al.* 2012; Ryabov *et al.* 2014; Tentcheva *et al.* 2004).

#### 3.1.1.2.2.1 Le virus des ailes déformées

- **Agent infectieux**

Virus des ailes déformées, Deformed Wing Virus, DWV

- **Historique de la découverte :**

Le DWV a été isolé au début des années 1980 à partir d'abeilles symptomatiques du Japon et décrit initialement comme correspondant à la souche japonaise de l'Egypt Bee Virus (EBV) (Bailey et Ball 1991; Ball 1989; Bowen-Walker *et al.* 1999). La transmission du DWV est fortement favorisée par l'acarien parasite *Varroa destructor*, mais pas obligatoire (Ball et Allen 1988).

- **Evolution de la répartition géographique, actualité**

La répartition de ce virus est aujourd'hui mondiale (Allen et Ball 1996; Ellis et Munn 2005). Le DWV infecte non seulement *Apis mellifera*, mais on le trouve aussi chez l'abeille asiatique *Apis cerana* F. (Allen et Ball 1996), l'abeille naine *Apis florea* F. (Allen et Ball 1996; Ellis et Munn 2005), l'abeille géante *Apis dorsata* F. dans le sud de l'Inde (Desai *et al.* 2012) et chez le bourdon *Bombus terrestris* (Furst *et al.* 2014; Genersch *et al.* 2006b). Le DWV est présent aujourd'hui dans la majorité des ruchers français. Des récentes analyses ont montré que les souches de DWV peuvent présenter des niveaux de virulence différents (Ryabov *et al.* 2014).

- **Description morphologique et moléculaire**

Le DWV appartient au genre des *Iflavirus*. Ce virus, à structure icosaédrique de petite taille (30 nm), est composé d'un génome ARN simple brin positif de 10 140 nucléotides, codant pour 3 protéines majeures de structure VP1 (44 kDa), VP2 (32 kDa) et VP3 (28 kDa) (Lanzi *et al.* 2006).

- **Manifestations cliniques, pouvoir infectieux/pouvoir pathogène**

Le DWV est transmis horizontalement (par excrétion dans les fèces, cannibalisme et transmission orale) (de Miranda et Genersch 2010), mais aussi verticalement puisqu'il a été retrouvé dans du sperme de mâles et chez les reines (de Miranda et Fries 2008; Fievet *et al.* 2006; Yañez *et al.* 2012; Yue *et al.* 2006; Yue *et al.* 2007). Il persiste à tous les stades de développement de l'abeille domestique (adultes, nymphes, larves dans une moindre mesure, et œufs) (Bailey et Ball 1991;

Chen *et al.* 2006; Lanzi *et al.* 2006; Yue *et al.* 2006), les pupes étant globalement moins infectées que les abeilles adultes (Tentcheva *et al.* 2004).

Les infections déclarées à DWV avec des manifestations cliniques (déformations alaires, abdomen malformé, raccourci, *etc.*) sont étroitement associées avec la transmission vectorielle par *Varroa destructor* (transmission par injection du virus aux pupes). La présence de signes cliniques de DWV a pu également être observée en l'absence de *Varroa* (Forsgren *et al.* 2012; Shutler *et al.* 2014). Bien qu'un consensus existe dans la littérature quant à la transmission du DWV aux pupes par les acariens parasites comme prérequis au développement des ailes déformées (Ball et Allen 1988; Bowen-Walker *et al.* 1999; Shen *et al.* 2005b; Yue et Genersch 2005), les mécanismes exacts conduisant à ces malformations restent inconnus (de Miranda et Genersch 2010).

Une plus grande prévalence du DWV a été mesurée dans des abeilles collectées en automne par rapport aux abeilles de printemps ou d'été. Cette augmentation au cours de l'année pourrait être corrélée à l'augmentation du taux d'infestation des ruchers par *Varroa* jusqu'à l'administration de traitements anti-*Varroa* de fin d'été/début d'automne. Les nymphes parasitées par *Varroa* portent des charges virales beaucoup plus élevées que les nymphes non parasitées (Shen *et al.* 2005b). Le DWV est ainsi impliqué comme une des causes de pertes de colonies au cours de l'hiver (Dainat et Neumann 2013; Highfield *et al.* 2009).

La présence du DWV est décrite, chez les abeilles adultes symptomatiques issues de colonies fortement infestées par *Varroa destructor*, comme souvent associée à une déformation alaire : ailes vestigiales et froissées, abdomen gonflé, paralysie et, chez les abeilles asymptomatiques, par une mort prématurée (au stade nymphal) (Dainat *et al.* 2012a) et une diminution des performances de la colonie (Bowen-Walker *et al.* 1999). Cependant, malgré un titre viral 10 à 100 fois plus important chez les abeilles à ailes déformées que chez les abeilles dépourvues de symptômes (Tentcheva *et al.* 2004), le processus conduisant à la déformation de l'aile est toujours inconnu, et les abeilles sans symptômes apparents peuvent aussi être porteuses de forts titres de DWV. Ces résultats confirment ceux obtenus par Bowen-Walker *et al.* (1999) qui avaient conclu que le nombre de particules virales présentes par abeille était déterminant pour la déformation alaire à l'émergence. Les reines peuvent aussi être porteuses du DWV et symptomatiques, mais ces dernières sont probablement éliminées précocement par leurs demi-sœurs compte tenu de leur difformité, et donc de leur incapacité à assurer la descendance de la colonie (Williams *et al.* 2009). Le DWV se multiplie lentement durant les stades immatures de l'abeille, et bien que tuant rarement la nymphe, il raccourcit la longévité du stade adulte. Le virus se concentre dans la tête et l'abdomen des abeilles adultes, il a aussi été retrouvé en moindre concentration dans le thorax et les ailes d'individus infectés, mais jamais dans les pattes (Lanzi *et al.* 2006). Chez les individus reproducteurs, le DWV a été localisé par hybridation *in situ*, dans le cytoplasme des cellules du tissu adipeux de reines et en moindre mesure, par PCR quantitative, dans les ovaires, la tête et le tractus digestif. Chez les mâles, le DWV est présent dans le tractus digestif ainsi que dans l'ensemble du tractus reproducteur/génital (Fievet *et al.* 2006). Le virus se réplique dans l'abeille, mais des dosages exceptionnellement élevés de DWV dans des *Varroa* laissent supposer que le virus pourrait aussi se répliquer dans l'acarien vecteur de façon très efficace afin d'assurer sa dispersion (Bowen-Walker *et al.* 1999; Shen *et al.* 2005b). Cependant, les expérimentations d'immunolocalisation du DWV chez *Varroa destructor*, qui ont montré une présence de ce virus dans la lumière du tube digestif, n'ont pas permis de confirmer la thèse de l'acarien parasite comme siège de réplication virale (Santillán-Galicia *et al.* 2008). L'hypothèse d'une activation ou induction de la réplication du DWV dans l'abeille par *Varroa* a aussi été proposée, notamment pouvant être consécutive à une immunosuppression induite par le parasitisme (Shen *et al.* 2005b). Cette immunosuppression augmenterait la sensibilité des abeilles à des agents infectieux « opportunistes » tels que le DWV (Nazzi *et al.* 2012; Yang et Cox-Foster 2005).

- **Situation de co-infections/co-exposition à d'autres facteurs de stress**

Parmi des nymphes naturellement parasitées par *Varroa* (n = 46), Shen *et al.* (2005b) ont montré que 70 % d'entre elles étaient co-infectées par le DWV et le KBV. Par contre, cette co-infection n'est pas obligatoire puisque près de 22 % des nymphes n'étaient porteuses que d'un des deux virus. Cette étude a aussi mis en évidence un effet synergique du DWV avec le parasitisme par *Varroa*

*destructor*. Aucune action synergique entre *Nosema ceranae* et le DWV n'a par contre été observée (Martin *et al.* 2013). Il y aurait plutôt une compétition entre les deux concernant leur développement dans l'intestin (Doublet *et al.* 2015). Il a été montré récemment des effets négatifs de l'exposition à un néonicotinoïde (la clothianidine) sur l'immunité antivirale qui a entraîné la réplication du DWV dans des abeilles porteuses du virus (Di Prisco *et al.* 2013).

- **Détection**

Le virus DWV est un des principaux virus des abeilles susceptibles de causer des dégâts visibles sur l'hôte infecté. On peut ainsi suspecter sa présence dans une colonie grâce à l'observation d'abeilles adultes dont les ailes sont déformées, anormalement courtes ou froissées. Cependant, le DWV étant également retrouvé au sein de colonies asymptomatiques, cette simple observation ne suffit pas à établir formellement l'absence du virus, qui doit être validée à l'aide de tests plus spécifiques.

Les méthodes les plus pointues permettant aujourd'hui de déterminer la présence du DWV font appel à des détections à l'aide d'anticorps (ELISA) ou des approches moléculaires par RT-PCR (Tentcheva *et al.* 2004; Yue et Genersch 2005) ou RT-PCR quantitative (Chen *et al.* 2005; Dainat *et al.* 2011).

- **Traitement, contrôle et méthodes de prévention**

Comme pour l'ensemble des virus des abeilles, il n'existe à ce jour aucun traitement contre le DWV. Des stratégies visent à utiliser des traitements à partir d'ARNs interférents (RNAi). Une telle stratégie a été mise au point contre le virus IAPV (Maori *et al.* 2009).

En termes de pratiques apicoles, *Varroa* étant un vecteur du DWV maintenant reconnu, le traitement attentif des colonies contre le parasite est fortement recommandé, afin notamment de limiter la dispersion du virus et l'augmentation des charges virales par son intermédiaire (Locke *et al.* 2012).

Enfin la transmission verticale du DWV, *via* les mâles mais à plus forte raison, les reines (dans la mesure où elles sont les seules à revenir à la ruche après le vol nuptial et à représenter un risque potentiel de contamination pour la colonie), amène à souligner la possibilité de tester la présence de virus dans les échantillons de sperme utilisés en insémination artificielle (de Miranda et Fries 2008).

- **Réglementation de la maladie**

Aucune

### 3.1.1.2.2.2 Le virus de la cellule noire de la reine

- **Agent infectieux**

Virus de la cellule noire de la reine, virus de la cellule royale noire, virus de la cellule royale, Black Queen Cell Virus, BQCV

- **Historique de la découverte**

Le BQCV a été décrit pour la première fois en 1974 par Bailey et Woods chez des larves et pupes de reines d'*Apis mellifera*. Son nom provient de la coloration sombre que prennent certaines zones des parois des cellules royales contenant des pupes infectées (Bailey et Woods 1977; Benjeddou *et al.* 2002). Ce virus à ARN, classé initialement dans le groupe des virus « Picorna-like », a été reclassé par l'ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses) en 2002 et appartient depuis au genre des *Cripavirus* de la famille des *Dicistroviridae* (Mayo 2002).

- **Evolution de la répartition géographique, actualité**

Le virus est présent dans le monde entier (Allen et Ball 1996). Il a été retrouvé dans des échantillons d'abeilles provenant des continents européen, africain, asiatique, américain ainsi que d'Australie. La séquence complète du génome d'une souche d'Afrique du Sud a été obtenue (Leat *et al.* 2000). La phylogénie générée à partir des séquences de virus BQCV, récoltés sur des abeilles provenant du monde entier, montre un fort degré de conservation du génome des isolats des différentes provenances géographiques, en particulier entre les séquences codant pour les

protéines de structure. La région la plus variable correspond à la séquence codant pour une protéine non-structurale dont le rôle n'a pas encore été élucidé (Reddy *et al.* 2013a).

Le virus BQCV a aussi été retrouvé chez le bourdon *Bombus huntii* (Peng *et al.* 2011) ce qui met en évidence un spectre d'hôtes du virus BQCV potentiellement large, en termes d'espèces pollinisatrices.

- **Description morphologique et moléculaire**

Les particules virales isométriques de BQCV mesurent 30 nm de diamètre. Elles contiennent un ARN simple brin dont la séquence a été évaluée à 8550 pb. Le séquençage d'une souche d'Afrique du Sud (Leat *et al.* 2000) a mis en évidence 2 cadres de lecture ouverts (ORF). Le premier, en 5', code pour une protéine de type réplicase et le deuxième, en 3', code pour une polyprotéine de capsid. Les masses moléculaires des protéines matures sont respectivement de 34, 32, 29 et 6 kDa.

- **Manifestations cliniques, pouvoir infectieux/pouvoir pathogène**

Les ouvrières comme les larves et les pupes d'*Apis mellifera* peuvent être porteuses de BQCV, mais sont asymptomatiques. Les ouvrières transmettraient le virus aux larves et plus particulièrement aux larves de reines en apportant la gelée royale puis la bouillie larvaire au couvain. En revanche, le BQCV n'a jamais été détecté chez le parasite *Varroa destructor* (Gauthier *et al.* 2007; Tentcheva *et al.* 2004), ce qui exclurait l'hypothèse d'une transmission *via* l'acarien.

A ce jour, le mécanisme pathogène n'a pas été décrit et demeure inconnu. Le virus injecté dans la puce s'y multiplie, mais, ne se propage pas entre abeilles adultes engagées. Par contre, il se multiplierait chez l'abeille adulte lorsqu'il est ingéré avec des spores de la microsporidie *Nosema apis* (Bailey *et al.* 1983).

Le virus est rencontré dans de nombreux ruchers et de nombreuses colonies asymptomatiques analysées (Mouret *et al.* 2013; Tentcheva *et al.* 2004) (Provost, communication personnelle). Le virus a été détecté dans la majorité des échantillons d'abeilles adultes et dans près d'un quart des pupes. La charge virale des abeilles adultes présente un pic d'infection au printemps et au début de l'été (comme *Nosema apis*) puis diminue légèrement à l'automne (Tentcheva *et al.* 2004) à l'inverse de la pression parasitaire due à *Varroa destructor* ce qui corroborerait l'hypothèse citée plus haut de non transmission du BQCV par le parasite.

L'implication du virus BQCV dans la mortalité des abeilles est encore mal connue, et n'induirait que des effets limités sur la santé des ouvrières comme des faux-bourdons, indépendamment du niveau d'infection (Retschnig *et al.* 2014b). Le BQCV a été décrit comme étant à la cause la plus commune de la mort des reines en Australie (Anderson 1993), ces dernières étant retrouvées mortes au stade pré-pupal ou pupal dans la cellule royale. De plus, des symptômes décrits comme étant liés à l'infection par BQCV se caractériseraient par une hypertrophie de l'abdomen et des mouvements saccadés (Higes *et al.* 2007a).

- **Situation de co-infections/co-expositions à d'autres facteurs de stress**

Plusieurs auteurs font état de fréquentes co-infections par le virus BQCV et la microsporidie *Nosema apis* (Allen et Ball 1996; Bailey *et al.* 1983), le BQCV pouvant être impliqué dans la mort des abeilles co-infectées par ce parasite. Higes *et al.* (2007a) font l'hypothèse que la co-infection par ces 2 agents infectieux pourrait peser sur l'évolution clinique en augmentant le pouvoir pathogène *Nosema*. Ces co-infections ont été confirmées par Dainat *et al.* (2012b) et Mouret *et al.* (2013). Des interactions synergiques ont été plus récemment documentées entre le BQCV et l'espèce *Nosema ceranae* (Doublet *et al.* 2014).

- **Détection**

A ce jour, la technique de transcription inverse (RT) puis PCR quantitative (RT-qPCR) est la plus fiable et pertinente (Gauthier *et al.* 2007), elle a supplanté la PCR classique qui ne permet de faire qu'un diagnostic de type « présence/absence ». Depuis quelques années, la PCR classique permet aussi, grâce à la technique Multiplex, de détecter plusieurs agents infectieux en une seule réaction (Grabensteiner *et al.* 2007; Squazza *et al.* 2013; Topley *et al.* 2005).

- **Thérapie, contrôle et méthodes de prévention**

Aucune méthode de thérapie n'est disponible à ce jour. Seule la désinfection rigoureuse du matériel est préconisée afin d'éviter les contaminations.

- **Réglementation sur la maladie**

Aucune

### 3.1.1.2.2.3 Le virus de la paralysie chronique

- **Agent infectieux**

Virus de la paralysie chronique, Chronic Bee Paralysis Virus, CBPV

- **Maladie**

Maladie noire, paralysie chronique de l'abeille,

- **Historique de la découverte**

Le CBPV, agent étiologique d'une maladie infectieuse et contagieuse des abeilles adultes, a été isolé et caractérisé par Bailey *et al.* en 1963 (Bailey *et al.* 1963). C'est, avec l'ABPV, l'un des deux premiers virus des abeilles à avoir été isolés. N'ayant pu être assigné à une famille virale existante, il ferait partie d'une nouvelle famille de virus (Morimoto *et al.* 2012).

- **Evolution de la répartition géographique, actualité**

Le virus CBPV est retrouvé partout dans le monde (Morimoto *et al.* 2012) et peut être détecté tout au long de l'année, la plupart du temps chez des abeilles asymptomatiques (Bailey 1967; Bailey *et al.* 1963). Les symptômes, associés à de la mortalité devant les ruches, sont plus fréquemment observés au cours du printemps et de l'été (Bailey 1967; Ribière *et al.* 2002). Les reines peuvent également être infectées au contact d'ouvrières symptomatiques (Amiri *et al.* 2014). Le CBPV infecte également l'abeille asiatique *Apis cerana* (Ai *et al.* 2012; Choe *et al.* 2012).

- **Description morphologique et moléculaire**

La particule virale du CBPV est de petite taille (30 à 60 nm), de forme anisométrique (Bailey *et al.* 1968). Il s'agit d'un virus à ARN simple brin fragmenté à polarité positive (Overton *et al.* 1982). Son génome, comprenant 2 ARN majoritaires (ARN1 de 3674 nucléotides et ARN2 de 2305 nucléotides), a été séquencé (Olivier *et al.* 2008a). L'analyse de ces séquences indique la présence de 7 cadres de lecture (ORF), 3 pour l'ARN 1 et 4 pour l'ARN 2.

- **Manifestations cliniques, pouvoir infectieux/pouvoir pathogène**

Connue par les apiculteurs sous le nom de maladie noire (Faucon 1992), la paralysie chronique se manifeste par la présence d'abeilles tremblantes, d'affaiblissements de colonies et de diminutions de production (Ball et Bailey 1997) et peut parfois entraîner des pertes de colonies (Kulinčević et Rothenbuhler 1975). Cette infection virale peut être à l'origine de deux types de syndromes appelés syndrome de Type 1 et syndrome de Type 2 (Bailey et Ball 1991) qui peuvent être présents au sein d'une même colonie. Dans le cas du syndrome de Type 1 décrit en Angleterre, des tremblements des ailes et du corps sont observés. Les abeilles sont incapables de voler et rampent sur le sol ou les tiges des plantes. Les abeilles meurent quelques jours après l'apparition des symptômes (Ribière *et al.* 2010). Le syndrome de Type 2, initialement, préférentiellement décrit en Europe continentale, se caractérise par une perte de poils, donnant au corps des abeilles un aspect noir et brillant. Ces abeilles sont parfois rejetées de la colonie et de nombreux cadavres sont retrouvés à l'entrée de la ruche (Ribière *et al.* 2010).

Chez les abeilles symptomatiques, des quantités importantes de virus sont retrouvées dans différentes régions du cerveau (Blanchard *et al.* 2007; Olivier *et al.* 2008b).

La transmission du CBPV se fait essentiellement par contact (Bailey *et al.* 1983; Ribière *et al.* 2007). La transmission serait favorisée lors d'épisode de claustration en saison apicole par l'augmentation des contacts entre abeilles saines et infectées. Toutes les castes peuvent être infectées, ouvrières, mâles et reine (Blanchard *et al.* 2007; Chen *et al.* 2005; Chen *et al.* 2006; Tentcheva *et al.* 2004).

Les abeilles peuvent être infectées expérimentalement par voie orale, par voie topique ou par injection directe (Bailey 1965; Rinderer et Rothenbuhler 1975) mais avec des efficacités nettement



supérieures par injection. Les symptômes apparaissent 5 à 6 jours après l'infection expérimentale (Chevin *et al.* 2012). Cependant, Toplak *et al.* (2013) indiquent que la réplication du virus CBPV serait plus efficace lorsque les abeilles sont infectées par voie orale.

Une étude suggère que les fourmis pourraient aussi être des réservoirs du virus mais leur rôle éventuel dans la transmission n'a pas été démontré. De plus, la transmission pourrait se faire également par l'intermédiaire de *Varroa* (Celle *et al.* 2008).

- **Situation de co-infections/co-exposition à d'autres facteurs de stress**

Il a été noté, en conditions expérimentales, une réplication du CBPV plus importante associée à une mortalité plus rapide des abeilles co-infectées par la microsporidie *Nosema ceranae* (Toplak *et al.* 2013).

- **Détection**

Les symptômes (tremblements et présence d'abeilles rampantes devant la ruche) peuvent être confondus avec ceux d'autres maladies et/ou résultant d'une intoxication chimique d'où la nécessité de disposer d'outils de diagnostic fiables et validés permettant l'interprétation des résultats, en particulier des outils de quantification de ce virus largement présent dans les colonies d'abeilles, avec et sans signes cliniques associés.

Un premier test de RT-PCR a été développé notamment pour révéler les infections inapparentes car de nombreuses colonies sont porteuses du virus sans aucun symptôme (Ribièrre *et al.* 2002). L'obtention de séquences complètes du génome du CBPV (Olivier *et al.* 2008a) a permis de mettre au point une nouvelle méthode de RT-PCR utile pour détecter les différents isolats du virus (Blanchard *et al.* 2007; Blanchard *et al.* 2009). Une approche de RT-PCR en temps réel (RT-qPCR) basée sur la technologie TaqMan a également été développée pour mesurer la charge du CBPV (Blanchard *et al.* 2007; Celle *et al.* 2008).

Afin de proposer ce test comme méthode de référence, il a été caractérisé au travers d'une étude intra-laboratoire au cours de laquelle la fiabilité et la répétabilité des résultats et la performance du test ont été confirmées. Le test qPCR seul et toute la méthode de quantification (de l'extraction de l'ARN d'échantillon à analyser) ont été validés selon la norme ISO / CEI 17025 et la récente norme U47-600 XP délivrée par l'Institut de normalisation français (AFNOR). Les performances de la méthode d'analyse de quantification du CBPV par RT-qPCR ont été validées et la limite de détection fixée. Enfin ce protocole de quantification du CBPV par RT-qPCR a été approuvé par le Comité français d'accréditation (COFRAC) (Blanchard *et al.* 2012).

Au-delà de  $10^{10}$  copies du génome viral par abeille, la paralysie chronique est considérée comme déclarée (Blanchard *et al.* 2012; Ribièrre *et al.* 2010). Le virus peut être détecté dans tous les stades de développement depuis les œufs jusqu'aux abeilles adultes (Blanchard *et al.* 2007) mais la maladie ne se manifeste que chez les adultes (Ribièrre *et al.* 2010).

Le diagnostic de la paralysie chronique est ainsi basé sur la mesure des charges virales couplée aux symptômes cliniques relevés sur le terrain.

- **Traitement, contrôle et méthodes de prévention**

Aucun traitement n'est disponible à ce jour.

- **Réglementation sur la maladie**

Aucune

#### 3.1.1.2.2.4 Le virus du couvain sacciforme

- **Agent infectieux**

Virus du couvain sacciforme, virus du couvain en forme de sac, Sacbrood Virus, SBV

- **Maladie**

Couvain sacciforme, couvain en forme de sac

- **Historique de la découverte**

C'est en 1917 que l'étiologie virale du couvain sacciforme a été démontrée (White 1917). Le virus SBV, agent de cette maladie, a été décrit en 1964 (Bailey *et al.* 1964). C'est le premier virus des

abeilles dont le génome a été entièrement séquencé (Ghosh *et al.* 1999). Le couvain sacciforme tire son nom de l'aspect des larves mortes, un petit sac rempli de liquide.

- **Evolution de la répartition géographique, actualité**

Chez *Apis mellifera*, le SBV est retrouvé sur tous les continents (Allen et Ball 1996). Il n'a en général pas de conséquence majeure sur la survie des colonies, même s'il peut parfois affecter le développement du couvain et être à l'origine de pertes de colonies. Chez *Apis cerana*, ce virus est une cause importante de mortalité des colonies en Asie (Liu *et al.* 2010).

- **Description morphologique et moléculaire**

Le SBV est un virus à ARN simple brin à polarité positive. Les particules virales ont une taille de 28 nm (Bailey 1968). Comme le DWV, il appartient au genre des *Iflavirus*, un groupe de virus apparenté aux Picornavirus (King *et al.* 2011; Lanzi *et al.* 2006). Le génome complet a été séquencé et comprend 8 832 nucléotides (Ghosh *et al.* 1999) avec un seul ORF codant une polyprotéine de 2 858 acides aminés. D'autres souches du SBV isolées au Vietnam ou en Corée ont été séquencées plus récemment (Choe *et al.* 2012; Nguyen et Le 2013).

- **Manifestations cliniques, pouvoir infectieux/pouvoir pathogène**

C'est une maladie contagieuse du couvain. Au début de l'infection, la larve prend une couleur jaune pâle puis elle apparaît comme un sac rempli de liquide. A un stade avancé, la maladie se manifeste par un couvain irrégulier, en «mosaïque», les opercules sont affaissés. Les larves mortes deviennent noirâtres et, à la différence de la loque américaine, peuvent être facilement retirées de l'alvéole. Le SBV est également retrouvé chez l'abeille adulte surtout en présence de *Varroa* (Tentcheva *et al.* 2004). Il entraîne une diminution de leur espérance de vie. Le virus s'accumule dans les glandes hypopharyngiennes des ouvrières, dans les adipocytes, les cellules musculaires et les cellules trachéales des larves (Lee et Furgala 1967).

La fréquence de l'infection est plus élevée au printemps et en été (Chen et Siede 2007).

Des analyses réalisées en France sur des colonies d'abeilles apparemment saines montrent que le SBV est présent dans 86 % des échantillons d'abeilles adultes, 80 % des échantillons de nymphes et 45 % des échantillons de *Varroa destructor* (Tentcheva *et al.* 2004). Ceci suggère un rôle de *Varroa* dans la transmission du SBV.

- **Situation de co-infections/co-exposition à d'autres facteurs de stress**

Comme précédemment indiqué, la présence du virus est souvent associée à une infestation des colonies par *Varroa*.

- **Détection**

Des méthodes de RT-PCR quantitative (RT-qPCR) ont été mises au point pour la détection et la quantification du SBV (Chantawannakul *et al.* 2006; Evison *et al.* 2012; Gauthier *et al.* 2007; Kukielka et Sánchez-Vizcaíno 2009; Locke *et al.* 2012; Yoo *et al.* 2012). Plus récemment, Blanchard *et al.* (2014b) ont développé une approche de RT-qPCR basée sur la technologie TaqMan, permettant de quantifier le virus dans les larves, les pupes et les adultes. Ils ont défini un seuil de  $10^{10}$  copies du génome viral par abeille à partir duquel des signes cliniques sont observés. Afin de proposer ce test comme méthode de référence, cette technique a été validée selon la norme AFNOR U47-600 où la fiabilité et la répétabilité des résultats et les performances de l'essai ont été testées et validées.

- **Traitement, contrôle et méthodes de prévention**

Comme pour les autres virus des abeilles, il n'existe actuellement pas de traitement antiviral en apiculture. De bonnes conditions d'hygiène et une bonne miellée peuvent permettre aux colonies de résister à cette infection virale. Des travaux de recherche indiquent que l'utilisation d'ARN interférents (RNAi) pourrait permettre de lutter contre le CSBV (Chinese Sacbrood Bee Virus) (Liu *et al.* 2010).

- **Réglementation sur la maladie**

Aucune

### 3.1.1.2.2.5 Le complexe AKI (ABPV, KBV, IAPV)

Le complexe AKI regroupe trois virus étroitement apparentés, de la famille des *Dicistroviridae*, qui sont souvent difficiles à différencier : le virus de la paralysie aiguë (ABPV), le virus du Cachemire (KBV) et le virus israélien de la paralysie aiguë (IAPV) plus récemment décrit (de Miranda *et al.* 2010). Ces virus ont une répartition mondiale, sont souvent responsables d'infections asymptomatiques mais peuvent aussi être impliqués dans des pertes de colonies en particulier lorsqu'ils sont associés au parasite *Varroa destructor*. Leur prévalence est plus importante chez les abeilles adultes mais ils peuvent être retrouvés chez les larves et les nymphes. Leur virulence est élevée lorsqu'ils sont inoculés de manière expérimentale. En effet, 100 particules virales injectées dans l'hémolymphe sont suffisantes pour provoquer la mort des abeilles alors que par voie orale il faut environ  $10^{11}$  particules pour entraîner la mort (Bailey et Ball 1991; Bailey *et al.* 1963; Bailey et Woods 1977; Maori *et al.* 2007a; Nordström 2000; Ribière *et al.* 2008).

#### 3.1.1.2.2.5.1 Le virus de la paralysie aiguë

- **Agent infectieux**

Virus de la paralysie aiguë, Acute Bee Paralysis Virus, ABPV

- **Historique de la découverte**

Le virus ABPV a été identifié en 1963 en Angleterre (Bailey *et al.* 1963), au cours de travaux qui portaient sur le virus CBPV, en inoculant à des nymphes des extraits d'abeilles malades souffrant de paralysie chronique.

- **Evolution de la répartition géographique, actualité**

Sa distribution est mondiale, c'est le virus le plus commun du complexe AKI en Europe (Baker et Schroeder 2008; Blanchard *et al.* 2008; Gauthier *et al.* 2007; Siede et Buchler 2006; Tentcheva *et al.* 2004) et en Amérique du Sud (Antúnez *et al.* 2006; Weinstein-Teixeira *et al.* 2008). La transmission de ce virus est fortement favorisée par l'acarien parasite *Varroa destructor*.

L'hôte original est probablement *Apis mellifera*. Des essais d'infections ont également montré que ce virus pouvait se répliquer chez différentes espèces de bourdons (Allen et Ball 1996; Bailey et Gibbs 1964; Ribière *et al.* 2008).

- **Description morphologique et moléculaire**

L'ABPV est un virus à ARN simple brin à polarité positive de la famille des *Dicistroviridae* (genre *Cripavirus*). Les particules virales ont un diamètre d'environ 30 nm. Le génome complet d'un isolat du Royaume-Uni (~9,5 kb) a été séquencé (Govan *et al.* 2000). Comme l'ensemble des virus de la famille des *Dicistroviridae*, le génome comprend deux cadres de lecture (ORF) séparés par un espace intergénique. L'ORF en 5' code des protéines non structurales (hélicase, protéase et polymérase ARN-dépendante) impliquées notamment dans la réplication. L'ORF en 3', plus court, code les protéines de la capsid (de Miranda *et al.* 2004; Govan *et al.* 2000; Maori *et al.* 2007a). D'autres isolats provenant de différentes origines géographiques ont été également séquencés (Bakonyi *et al.* 2002b).

- **Manifestations cliniques, pouvoir infectieux/pouvoir pathogène**

L'ABPV est capable de se multiplier chez l'abeille adulte et dans le couvain, sa prévalence augmente au cours de la saison apicole avec un pic à la fin de l'été (Bailey et Ball 1991; Bailey *et al.* 1981; Ball et Allen 1988; Gauthier *et al.* 2007; Siede et Buchler 2006; Tentcheva *et al.* 2004). Comme de nombreux autres agents infectieux, l'ABPV peut être détecté dans des colonies sans aucun signe clinique. Lors d'infections expérimentales, les abeilles sont traînantes, tremblantes et sont incapables de voler (Bailey *et al.* 1963; Ribière *et al.* 2008). Dans certains cas, des symptômes de paralysie précoce ont été rapportés. Les ailes des jeunes abeilles peuvent être asymétriques ou écartées. Un couvain en forme de mosaïque et une importante mortalité aux stades larvaire ou nymphal ont été parfois constatés pouvant aboutir à un déclin de la population.

Le virus a été retrouvé en grandes quantités dans le cerveau et les glandes hypopharyngiennes chez les adultes (Bailey et Milne 1969) et on peut aussi le détecter dans les fèces (Ribière *et al.* 2008). Les voies de transmission du virus ABPV sont les mêmes que celles des 2 autres virus du

complexe AKI : transmission horizontale, de manière orofécale ou vectorielle par le parasite *Varroa*, et transmission verticale par voie transovarienne (Beebook, 2013<sup>13</sup>). Les virus du complexe AKI ont en effet été mis en évidence dans les ovaires, sur les œufs et dans la semence des mâles (Francis *et al.* 2013a; Yue *et al.* 2006).

- **Situation de co-infections/co-exposition à d'autres facteurs de stress**

Le rôle du virus ABPV dans l'effondrement de colonies d'abeilles est suspecté depuis l'apparition de *Varroa*. Des corrélations entre le taux important de ce virus (et des deux autres virus du complexe AKI), l'infestation par *Varroa* et les mortalités hivernales ont en effet été mises en évidence (Francis *et al.* 2013b; Genersch *et al.* 2010). *Varroa* joue essentiellement un rôle de vecteur mécanique (Di Prisco *et al.* 2011). De plus, son rôle immunosuppresseur entraîne souvent une augmentation de la réplication virale.

- **Détection**

Le virus ABPV est fréquemment retrouvé à des titres faibles dans des colonies saines et asymptomatiques. De plus, le diagnostic clinique est difficile car les symptômes, lorsqu'ils existent, ne sont pas toujours spécifiques. Il y a donc nécessité d'un diagnostic de laboratoire, les méthodes les plus performantes étant des méthodes de biologie moléculaire par RT-PCR ou RT-qPCR qui permettent de différencier les trois virus du complexe AKI. Ainsi, plusieurs approches de RT-PCR conventionnelles (Bakonyi *et al.* 2002a; Benjeddou *et al.* 2001; Gauthier *et al.* 2007; Grabensteiner *et al.* 2007; Tentcheva *et al.* 2004) et de RT-qPCR en utilisant du SYBR-Green (Kukielka et Sánchez-Vizcaíno 2009; Siede *et al.* 2008) ou une sonde TaqMan (Chantawannakul *et al.* 2006; Jamnikar Ciglencečki et Toplak 2012) ont été mises au point pour détecter le virus ABPV. La méthode de RT-qPCR développée par Jamnikar Ciglencečki et Toplak en 2012 est 230 fois plus sensible que les méthodes de RT-PCR conventionnelles et permet de détecter différents variants du virus ABPV. Une validation de ces méthodes selon les normes applicables paraît indispensable.

- **Traitement, contrôle et méthodes de prévention**

Il n'existe aucun traitement contre le virus ABPV. Des travaux de recherche montrent que des approches RNAi (petits ARN interférents) pourraient être envisagées. *Varroa* étant un vecteur des virus du complexe AKI, il est important de poursuivre la lutte contre cet acarien pour limiter la dispersion de ces virus.

- **Réglementation sur la maladie**

Aucune

### 3.1.1.2.2.5.2 Le virus du Cachemire

- **Agent infectieux**

Virus du Cachemire, Kashmir Bee Virus, KBV

- **Historique de la découverte**

Le virus KBV a été identifié lors d'infections expérimentales chez *Apis mellifera* en 1974 à partir d'extraits d'abeilles asiatiques *Apis cerana* en provenance de la vallée du Cachemire (Bailey *et al.* 1976; Bailey *et al.* 1979). C'est le virus qui semble le plus virulent en laboratoire, mais on le trouve aussi dans des colonies apparemment saines.

- **Evolution de la répartition géographique, actualité**

Le KBV est retrouvé chez *Apis cerana* et *Apis mellifera* dans différentes régions du monde (Allen et Ball 1995; Allen et Ball 1996; Ball et Bailey 1997; Choe *et al.* 2012), sa prévalence est plus élevée en Amérique du Nord (Cox-Foster *et al.* 2007; Hung *et al.* 2000; Hung *et al.* 1996) et en Nouvelle-Zélande (de Miranda *et al.* 2010; Todd *et al.* 2007). Il a également été mis en évidence chez des bourdons de Nouvelle-Zélande et des guêpes d'Australie (Anderson 1991). Le KBV est particulièrement virulent chez l'abeille en présence de l'acarien *Varroa destructor*, pouvant entraîner une mortalité très rapide du couvain et de l'adulte, sans symptômes particuliers.

<sup>13</sup> <http://www.coloss.org/beebook/II/virus/table-2>

- **Description morphologique et moléculaire**

Le KBV est un virus à ARN simple brin à polarité positive du genre *Cripavirus* appartenant à la famille des *Dicistroviridae* (Liljas *et al.* 2002). L'étude de profils de protéines de capsides et des analyses sérologiques montrent que ce virus est plus variable que le virus ABPV (Allen et Ball 1995; Bailey *et al.* 1979). Son génome a été complètement séquencé et présente environ 70 % d'identité avec celui du virus ABPV (de Miranda *et al.* 2004). Des génotypes de différentes origines géographiques ont également été séquencés (Reddy *et al.* 2014).

- **Maladie, manifestations cliniques, pouvoir infectieux/pouvoir pathogène**

L'infection par le virus KBV fait partie des infections virales les plus fréquentes chez l'abeille domestique. Elle touche tous les stades de développement du couvain et se retrouve chez les abeilles adultes. Aucun symptôme ne définit clairement l'infection, qui est même parfois inapparente. Lorsqu'il est inoculé expérimentalement, KBV est le plus virulent des virus de l'abeille (Chen et Siede 2007). Il est en effet létal pour les adultes et les larves après injection ou par voie orale à fortes doses (Bailey *et al.* 1963; Nordström 2000). Le virus est capable d'infecter plusieurs tissus des abeilles.

Le KBV peut être détecté dans *Varroa* (Shen *et al.* 2005b). Des acariens issus de colonies infectées par le KBV sont capables de transmettre le virus à des nymphes issues de colonies saines avec une efficacité de transmission de 70 % (Chen *et al.* 2004). Comme pour d'autres virus, l'infestation par *Varroa* provoque une activation de la réplication de KBV. Il peut ainsi être à l'origine de pertes de colonies en association avec *Varroa* (Hung *et al.* 1996; Ribière *et al.* 2008; Todd *et al.* 2007). Il existe donc plusieurs voies de transmission de KBV : transmission vectorielle par *Varroa*, transmission par voie orale et transmission verticale (détection des virus à la surface des œufs, (Chen *et al.* 2006)).

La prévalence de KBV augmente au cours de la saison avec un pic plus important observé en automne (Gauthier *et al.* 2007; Tentcheva *et al.* 2004).

- **Situation de co-infections/co-exposition à d'autres facteurs de stress**

A l'état latent dans la ruche, l'infection se développe lorsque le virus KBV est associé à *Varroa destructor*, au champignon parasite *Nosema apis* ou à certains facteurs environnementaux.

- **Détection**

Le premier diagnostic moléculaire de KBV par RT-PCR a été mis en place par Stoltz *et al.* (1995) et utilisé pour étudier la prévalence de ce virus dans différents pays (Blanchard *et al.* 2014a; Blanchard *et al.* 2008; Evans 2001; Siede *et al.* 2005; Tentcheva *et al.* 2004). Cependant, les amorces développées par Stoltz *et al.* (1995) n'étaient pas spécifiques du virus KBV et amplifiaient aussi le virus IAPV (Blanchard *et al.* 2008; de Miranda *et al.* 2010). Plus récemment un test plus spécifique par RT-PCR a été développé par Blanchard *et al.* (2012). Des approches par RT-qPCR ont également été mises au point (Antunez *et al.* 2012; Ward *et al.* 2007).

- **Traitement, contrôle et méthodes de prévention**

Aucun traitement n'est utilisé pour lutter contre KBV. Comme pour d'autres virus, des approches utilisant de petits ARN interférents pourraient être envisagées.

- **Réglementation sur la maladie**

Aucune

### 3.1.1.2.2.5.3 Le virus israélien de la paralysie aiguë

- **Agent infectieux**

Virus israélien de la paralysie aiguë, Israeli Acute Paralysis Virus, IAPV

- **Historique de la découverte**

Le virus IAPV a été détecté plus récemment, en 2002 en Israël (Maori *et al.* 2007a; Maori *et al.* 2007b). De la même manière que pour les virus ABPV et KBV, sa découverte a été faite à la suite d'infections expérimentales.

- **Evolution de la répartition géographique, actualité**

Initialement découvert en Israël, le virus IAPV a ensuite été identifié dans différents pays du monde, y compris en France en 2008 (Blanchard *et al.* 2008; Cox-Foster *et al.* 2007). Il est dominant au Moyen-Orient et en Australie (Maori *et al.* 2007a; Palacios *et al.* 2008). *Varroa* est vecteur de ce virus (Di Prisco *et al.* 2011).

Une étude métagénomique réalisée aux Etats-Unis a suggéré que la présence de ce virus pouvait être corrélée au syndrome d'effondrement des colonies (CCD) (Cox-Foster *et al.* 2007). Le seul hôte connu pour IAPV est *Apis mellifera* (Chen et Evans 2007; Maori *et al.* 2007a; Maori *et al.* 2007b). Cependant, une étude expérimentale indique que le virus IAPV, comme le virus KBV, peut infecter *Bombus terrestris* (Meeus *et al.* 2014).

- **Description morphologique et moléculaire**

L'IAPV est un nouveau virus de la famille des *Dicistroviridae*, étroitement apparenté aux virus ABPV et KBV (Maori *et al.* 2007a). Il s'agit d'un virus à ARN simple brin de 9487 nucléotides à polarité positive. Le génome de l'IAPV présente le même type d'organisation que les deux autres virus du complexe AKI. Plusieurs souches isolées en Corée du sud ont également été séquencées (Reddy *et al.* 2013b). Il existe une importante variabilité génétique entre les souches d'IAPV (Chen *et al.* 2014).

- **Manifestations cliniques, pouvoir infectieux/pouvoir pathogène**

Le virus IAPV est capable d'infecter tous les stades de développement (œufs, larves, nymphes, adultes) et les différentes castes d'*Apis mellifera*. Il cause une infection systémique chez les abeilles. Le virus est en effet détecté dans l'hémolymphe, le cerveau, le corps gras, les glandes salivaires, les glandes hypopharyngiennes, l'intestin, les cellules musculaires..., les titres les plus élevés étant observés dans l'intestin (Chen *et al.* 2014). Des approches par hybridation *in situ* montrent que le virus IAPV peut se retrouver dans les œufs, l'intestin, les ovaires et la spermathèque de reines infectées (Chen *et al.* 2014).

Comme pour les deux autres virus du complexe AKI, la transmission de ce virus peut se faire de manière horizontale et/ou verticale, et *Varroa* joue un rôle de vecteur.

Des études récentes portant sur la réponse des abeilles à cette infection virale indiquent que le virus IAPV modifie l'activité transcriptionnelle de gènes impliqués dans différentes fonctions cellulaires fondamentales telles que la machinerie de synthèse des ribosomes (Boncristiani *et al.* 2013) ou l'activité mitochondriale (Chen *et al.* 2014). Ces derniers auteurs montrent aussi que l'infection virale déclenche des voies de réponse immunitaire des abeilles adultes. L'IAPV pourrait donc jouer un rôle important dans l'affaiblissement de colonies d'abeilles en lien avec le syndrome d'effondrement des colonies (Hou *et al.* 2014).

- **Situation de co-infections/co-exposition à d'autres facteurs de stress**

L'acarien *Varroa destructor* joue un rôle de vecteur dans la transmission de l'IAPV (Di Prisco *et al.* 2011). De plus, ce parasite induit une inhibition de la réponse immunitaire des abeilles et active la réplication du virus IAPV.

- **Détection**

Le virus IAPV peut être détecté par RT-PCR (Blanchard *et al.* 2008; Cox-Foster *et al.* 2007) ou par des méthodes de PCR Multiplex (Carletto *et al.* 2010).

- **Traitement, contrôle et méthodes de prévention**

Les travaux de Maori et Hunter, menés sur des colonies en plein champ, ont montré que l'utilisation d'ARN double brin permettait de contrôler l'infection par l'IAPV dans les colonies d'abeilles (Hunter *et al.* 2010; Maori *et al.* 2009). Cet ARN a été ajouté, dans la réglementation relative aux LMR dans les aliments d'origine animale, à la liste des substances pharmacologiquement actives avec la mention « aucune LMR requise » pour le miel<sup>14</sup>.

<sup>14</sup> Règlement d'exécution (UE) N° 489/2013 de la Commission du 27 mai 2013 modifiant l'annexe du règlement (UE) N° 37/2010 relatif aux substances pharmacologiquement actives et à leur classification en ce qui concerne les limites maximales de résidus dans les aliments d'origine animale, concernant la substance acide ribonucléique double brin homologue à l'acide ribonucléique viral qui code pour une partie de la protéine d'enveloppe et une partie de la région intergénique du virus israélien de la paralysie aiguë

Le parasite *Varroa destructor* jouant un rôle de vecteur, la lutte contre cet acarien reste la mesure de prophylaxie à maintenir pour contrôler cette infection virale.

- **Réglementation sur la maladie**

Aucune

### 3.1.1.2.2.5.4 Conclusion sur les virus du complexe AKI

En France, deux études menées en 2002 (Tentcheva *et al.* 2004) et en 2009 (Mouret *et al.* 2013) ont permis d'analyser la prévalence des virus du complexe AKI. L'étude de Tentcheva *et al.* (2004) a porté sur 360 colonies asymptomatiques provenant de 36 ruchers répartis sur le territoire français. 23 % des ruchers étaient porteurs du virus ABPV, la prévalence du virus IAPV était de 6 %. Les travaux de Mouret *et al.* (2013) ont été menés sur 90 colonies sans symptôme venant de 18 ruchers situés dans l'ouest de la France. Des abeilles de 5 ruches de chaque rucher ont été analysées à quatre périodes de l'année. C'est le virus KBV qui était le plus prévalent (75 % des ruchers), puis IAPV (65 % des ruchers) et ABPV (14 % des ruchers).

Certaines études suggèrent que les virus du complexe AKI pourraient jouer un rôle dans l'effondrement de colonies. Il faut cependant rester prudent sur les causes des mortalités observées car le nombre d'études est faible et la présence de ces virus dans des colonies mortes ne permet pas d'en déduire que ce sont ces agents qui en sont responsables. *Varroa* joue un rôle majeur en tant que vecteur mécanique et par son rôle immunosuppresseur qui favorise/active la prolifération de ces virus. Ceci est également vrai pour les autres virus de l'abeille et de nombreux autres agents infectieux.

#### 3.1.1.2.3 Champignons

Plusieurs dangers biologiques classés parmi les champignons sont responsables de pathologies chez les abeilles. Parmi les plus fréquents, on retrouve les microsporidies parasites de l'intestin *Nosema apis* et *Nosema ceranae*, responsables de nosémoses, et *Ascospaera apis* agent de l'ascosphérose.

##### 3.1.1.2.3.1 *Nosema apis*/ *Nosema ceranae*

- **Agent infectieux**

*Nosema apis* / *Nosema ceranae*

- **Maladie**

La nosérose est une maladie de l'abeille adulte qui affecte le tube digestif et peut provoquer des diarrhées aiguës et dans certains cas entraîner une mortalité des colonies atteintes. Deux espèces de *Nosema* sont retrouvées chez l'abeille domestique : *Nosema apis* et *Nosema ceranae*. Les *Nosema* font partie des microsporidies, un groupe d'eucaryotes unicellulaires parasites intracellulaires obligatoires.

- **Historique de la découverte**

*Nosema apis* est connue pour infecter l'abeille européenne *A. mellifera* depuis plus d'un siècle (Zander 1909). En 2005, des échantillonnages réalisés en Espagne et à Taiwan ont montré qu'*A. mellifera* pouvait être infectée par une seconde espèce, *Nosema ceranae* (Higes *et al.* 2006; Huang *et al.* 2007). Des études ultérieures ont suggéré que *N. ceranae* était présente chez *A. mellifera* depuis au moins 1998 en Europe (Paxton *et al.* 2007), 1995 aux États-Unis (Chen *et al.* 2008), et même 1990 en Uruguay (Invernizzi *et al.* 2009). *N. ceranae* a initialement été décrite en Chine chez l'abeille asiatique *Apis cerana* (Fries *et al.* 1996). *N. ceranae* aurait récemment effectué un saut d'espèce de l'abeille asiatique vers l'abeille européenne (Botias *et al.* 2012a).

Les abeilles adultes se contaminent en ingérant des spores (cire, pollen, nectar ou eau souillés de déjections d'abeilles contaminées). La propagation de l'infection peut se faire au sein d'une même colonie (échanges entre abeilles, activités de nettoyage, trophallaxie, *etc.*) et entre colonies (dérive, pillage, transhumance, *etc.*).

- **Evolution de la répartition géographique, actualité**

Les échanges commerciaux ont pu rapidement accroître la distribution géographique de *N. ceranae*

au sein des colonies d'*A. mellifera*. En effet, cette espèce est désormais très répandue dans le monde (Klee *et al.* 2007). En plus de sa large distribution géographique, *N. ceranae* semble aujourd'hui présenter une prévalence bien plus élevée que celle de *N. apis* au sein des colonies (Botias *et al.* 2012c; Chaimanee *et al.* 2010; Chen *et al.* 2009; Stevanovic *et al.* 2010). Un remplacement de *N. apis* par *N. ceranae* chez *A. mellifera* a d'ailleurs été suggéré (Botias *et al.* 2012a; Chen *et al.* 2012; Martinez *et al.* 2012). Toutefois, dans certains pays comme l'Allemagne (Gisder *et al.* 2010) ou la Suède (Forsgren et Fries 2013), les deux espèces sont encore fréquemment retrouvées, *N. apis* présentant des prévalences plus élevées que *N. ceranae*. Le fait que les spores de *N. ceranae* soient plus sensibles à de faibles températures (Fenoy *et al.* 2009; Fries 2010) et que leur germination (processus nécessaire à l'infection des cellules de l'hôte) soit significativement diminuée après traitement à 4 °C (Gisder *et al.* 2010) pourrait entraver le pouvoir infectieux et la propagation de cette espèce dans les régions climatiques caractérisées par des hivers plus froids. Hormis ces exceptions, l'espèce *N. ceranae* semble dominer en terme de prévalence dans les nombreuses régions aux climats plus chauds (Fries 2010; Higes *et al.* 2010; Higes *et al.* 2013). *N. ceranae* est également capable d'infecter d'autres espèces d'abeilles telles que *A. cerana*, *A. florea*, *A. dorsata* et *A. koschevnikovi* (Botias *et al.* 2012a; Chaimanee *et al.* 2013; Suwannapong *et al.* 2010) et certaines espèces de bourdons comme *Bombus atratus*, *Bombus morio*, *Bombus bellicosus* et *Bombus terrestris* (Graystock *et al.* 2013; Plischuk *et al.* 2009).

- **Description morphologique et moléculaire**

Les *Nosema* sont des eucaryotes unicellulaires, parasites intracellulaires obligatoires apparentés aux champignons formant des spores résistantes de petite taille (quelques  $\mu\text{m}$ ) qui peuvent persister dans l'environnement pendant de très longs mois. Ces agents pathogènes font partie des microsporidies, groupe qui comprend environ 1500 espèces parasitant l'ensemble des organismes du règne animal, y compris l'Homme (Vavra et Lukes 2013). Les spores microsporidiennes infectant l'abeille mellifère sont ovales, celles de *N. apis* ( $6 \times 3 \mu\text{m}$ ) étant légèrement plus grandes que celles de *N. ceranae* ( $4,4 \times 2,2 \mu\text{m}$ ) (Chen *et al.* 2009; Fries *et al.* 1996).

La spore est entourée d'une membrane et d'une paroi extracellulaire rigide très épaisse composée de deux parties : l'exospore, matrice glycoprotéique et fibreuse dense, et l'endospore, matrice principalement composée de chitine et de protéines. L'intérieur de la spore renferme le sporoplasme qui correspond au matériel infectieux (Keeling et Fast 2002). Chez *N. apis* et *N. ceranae*, le sporoplasme possède deux noyaux étroitement associés en diplocaryon (Chen *et al.* 2009; Fries *et al.* 1996). Le sporoplasme renferme également un tube polaire ou filament polaire enroulé, structure impliquée dans le processus d'invasion des cellules de l'épithélium intestinal (Vavra et Lukes 2013). Le processus d'invasion débute en effet par une phase de germination au cours de laquelle la spore microsporidienne dévagine son tube polaire ce qui permet le transfert du sporoplasme jusqu'au cytoplasme d'une cellule hôte. Les génomes complets de *N. ceranae* (Cornman *et al.* 2009) et *N. apis* (Chen *et al.* 2013) sont désormais connus. Actuellement aucune corrélation entre variants génétiques et virulence n'a été établie ; des différences de susceptibilité à *Nosema* selon les colonies ont par contre été rapportées (Fontbonne *et al.* 2013).

- **Manifestations cliniques, pouvoir infectieux/pouvoir pathogène**

La nosérose est une maladie, de gravité variable en fonction de conditions plus ou moins favorables à la multiplication et à la dissémination du parasite. La nosérose se développe en effet surtout lorsque les conditions météorologiques sont défavorables (hiver long et pluvieux), lorsque les colonies sont faibles ou lorsque les reines sont âgées. Si la nosérose n'a pas de signes cliniques caractéristiques, elle peut être responsable de troubles digestifs (traces diarrhéiques retrouvées sur les cadres, le plancher...). On peut observer dans certains cas des abeilles traînantes avec l'abdomen gonflé, des abeilles mortes devant les ruches, des dépopulations.

Le parasite effectue son cycle de développement à l'intérieur des cellules épithéliales de l'intestin moyen (Higes *et al.* 2010). Au sein de ces cellules, différents stades parasitaires peuvent être observés : mérontes, sporontes, sporoblastes et spores. L'observation de spores de *N. ceranae* dans les cellules intestinales de l'abeille 3 jours après infection suggère un développement rapide du parasite, finalisé en seulement 72 h (Higes *et al.* 2007b). L'infection naturelle par *N. ceranae* conduit souvent à la production de plusieurs millions voire plusieurs dizaines de millions de spores au sein d'un même individu (Higes *et al.* 2008; Mulholland *et al.* 2012; Paxton *et al.* 2007; Smart et



Sheppard 2012). Celles-ci sont libérées avec les déjections de l'abeille et peuvent ainsi contaminer la ruche et son environnement.

La présence de *N. ceranae* a également été détectée par PCR dans d'autres tissus des ouvrières : les glandes hypopharyngiennes, mandibulaires et salivaires, les tubes de Malpighi, le corps gras et le sac à venin (Chen *et al.* 2009; Copley et Jabaji 2012). Toutefois, malgré la détection moléculaire du parasite dans différents tissus, des analyses microscopiques n'ont pas permis d'observer de spores ou de stades de développement intracellulaires dans d'autres tissus que le tractus digestif (Huang et Solter 2013).

Les infections naturelles d'*A. mellifera* par *N. ceranae* ont été d'abord détectées dans la caste des ouvrières (Higes *et al.* 2006; Huang *et al.* 2007), et plus récemment chez les mâles (Traver et Fell 2011) et chez les reines (Traver et Fell 2012). La détection de spores dans leurs ovaires suggère une possible transmission verticale du parasite entre individus de générations successives (Traver et Fell 2012).

De nombreuses études portant sur *N. ceranae* ont été réalisées à l'échelle de l'individu en conditions de laboratoire et à l'échelle de colonies en étude de semi-terrain pour identifier les effets de l'infection sur le comportement, la physiologie ou encore la survie de l'abeille. Les conséquences de l'infection sont multiples avec notamment des effets sur l'état nutritionnel et énergétique de l'abeille (Alaux *et al.* 2010a; Aliferis *et al.* 2012; Dussaubat *et al.* 2012; Martin-Hernandez *et al.* 2011; Mayack et Naug 2009; Mayack et Naug 2010; Naug et Gibbs 2009), sur l'activité de butinage (Dussaubat *et al.* 2013; Kralj et Fuchs 2010; Mayack et Naug 2010), sur la production d'hormones et de phéromones chez l'abeille (Alaux *et al.* 2011b; Antúnez *et al.* 2009; Ares *et al.* 2012; Dussaubat *et al.* 2010; Goblirsch *et al.* 2013), sur l'épithélium intestinal de l'abeille (Dussaubat *et al.* 2012) et sur la survie de l'abeille (Chaimanee *et al.* 2013; Forsgren et Fries 2013; Higes *et al.* 2007b; Martin-Hernandez *et al.* 2011).

- **Situation de co-infections/co-exposition à d'autres facteurs de stress**

Des interactions parfois synergiques avec d'autres agents infectieux (Bromenshenk *et al.* 2010; Doublet *et al.* 2015; Hedtke *et al.* 2011; Ravoet *et al.* 2013; Schwarz et Evans 2013; Toplak *et al.* 2013) et avec différentes classes d'insecticides (Alaux *et al.* 2010a; Aufauvre *et al.* 2012; Pettis *et al.* 2012; Retschnig *et al.* 2014a; Vidau *et al.* 2011; Wu *et al.* 2012) ont été démontrées ces dernières années (*cf.* chapitre sur les interactions). Une inhibition de l'expression de gènes de l'immunité par certains insecticides pourrait ainsi accentuer les effets de l'infection par *Nosema ceranae* (Aufauvre *et al.* 2014).

- **Détection**

Il n'y a pas de signe clinique qui soit caractéristique de cette maladie. La nosérose à *N. apis* se manifeste par des troubles digestifs, des traces diarrhéiques peuvent ainsi être observées sur les parois de la ruche ou les cadres. Un examen de l'intestin des abeilles peut être réalisé. L'intestin des abeilles atteintes est généralement de couleur blanche, alors que celui des abeilles saines est brun-rouge. Le diagnostic de certitude se fait au laboratoire, il consiste à mettre en évidence et à réaliser un comptage des spores au microscope. Cependant, la présence des spores n'est pas une preuve absolue que le parasite soit la cause de la pathologie observée sur les colonies ou sur les pertes constatées. De plus, il ne permet pas de différencier *Nosema apis* et *Nosema ceranae*. Seul le diagnostic moléculaire par PCR (sur abeilles adultes) permet de différencier les deux espèces de *Nosema*. Différents marqueurs peuvent être utilisés (Gisder et Genersch 2013; Roudel *et al.* 2013). Des approches de PCR multiplex (Carletto *et al.* 2013; Hamiduzzaman *et al.* 2010) et de PCR quantitative (Bourgeois *et al.* 2012) ont également été mises au point.

- **Traitement, contrôle et méthodes de prévention**

Les moyens de lutte contre *N. ceranae* et *N. apis* sont relativement limités. L'infection des colonies d'abeilles peut être contrôlée par l'utilisation d'une molécule antiparasitaire appelée fumagilline. La fumagilline est un antibiotique originellement produit par *Aspergillus fumigatus*. Cette molécule aurait pour cible l'enzyme méthionine aminopeptidase 2 qui est une protéase ayant pour fonction le clivage de la méthionine en position N-terminale lors de la maturation des protéines (Didier *et al.* 2006). Le traitement par la fumagilline durant l'automne de colonies infectées par *N. ceranae* réduit significativement l'intensité de l'infection (charge parasitaire) lors du printemps suivant (Williams *et*

al. 2008). De plus, le traitement des colonies par la fumagilline réduirait significativement le risque de dépeuplement sans pour autant empêcher les réinfections ultérieures (Higes *et al.* 2008). Ce risque de réinfection ultérieure est un problème sérieux puisque de faibles concentrations de fumagilline, persistant durant plusieurs mois après le traitement, auraient un impact négatif entraînant une hyperprolifération de *N. ceranae* chez les abeilles traitées (Huang *et al.* 2013). De nombreux pays dans le monde utilisent toujours la fumagilline pour contrôler l'infection des colonies par *N. ceranae*. Cependant, le traitement des colonies d'abeilles avec cet antibiotique est interdit dans l'Union européenne à cause de l'absence d'autorisation de mise sur le marché et de l'absence de limite maximale de résidus définie dans le miel (Fries 2010; Higes *et al.* 2010).

De façon alternative, une bonne gestion de l'activité apicole pourrait dans certains cas prévenir l'évolution de la nosérose à travers, par exemple, le remplacement des cadres et des reines de colonies infectées (Higes *et al.* 2010). Ainsi, le remplacement de la reine d'une colonie infectée par une reine plus jeune entraîne une diminution significative du nombre d'abeilles infectées au sein de la colonie permettant sa survie (Botias *et al.* 2012b). Pour diminuer les risques de nosérose, il est également conseillé d'éviter les expositions trop ombragées et les endroits humides, de mettre en hivernage assez tôt, d'éviter le miellat et les nourrissements trop tardifs et de désinfecter régulièrement le matériel.

- **Réglementation sur la maladie**

En France, la nosérose due à *Nosema apis* est un danger sanitaire de première catégorie (AM du 29 juillet 2013). Ce n'est pas le cas pour *N. ceranae*.

### 3.1.1.2.3.2 *Ascosphaera apis*

- **Agent infectieux**

*Ascosphaera apis*

- **Nom scientifique/Noms communs/ nomenclature anglaise/ abréviation**

Ascosphérose/maladie du couvain, couvain plâtré, couvain calcifié ou couvain dur/Chalkbrood disease

- **Historique de la découverte**

La maladie du couvain plâtré a été décrite au début du XX<sup>ème</sup> siècle (Maassen 1913) en Europe. L'agent responsable initialement appelé *Pericystis apis* fut renommé *Ascosphaera apis* par Spiltoir en 1955. La transmission se fait *via* l'ingestion de spores d'*A. apis* par les larves.

- **Evolution de la répartition géographique, actualité**

Cette maladie est désormais observée dans la plupart des pays du monde et son incidence a tendance à augmenter ces dernières années (Kluser et Peduzzi 2007).

Une publication récente indique que les virus DWV, BQCV et IAPV peuvent infecter et se multiplier chez *Ascosphaera apis* (Li *et al.* 2014b). De futures études sont nécessaires afin d'évaluer les effets potentiels des combinaisons virus-champignons sur la santé des abeilles.

Il existe également d'autres espèces du genre *Ascosphaera* qui peuvent parasiter des abeilles solitaires (Wynns *et al.* 2013).

- **Description morphologique et moléculaire**

*Ascosphaera apis* est un champignon appartenant à l'embranchement des ascomycètes (Lumbsch et Huhndorf 2007). La reproduction sexuée de ce champignon résulte de la fusion de deux mycéliums (formes végétatives difficiles à distinguer morphologiquement) de types sexuels différents. Cette fusion donne naissance à des ascques au sein desquels se forment des spores appelées ascospores (taille de 2 à 3 µm). Les ascospores sont les stades infectieux qui vont ensuite germer au niveau de l'intestin des larves pour reformer des mycéliums. Les ascospores peuvent résister plusieurs années dans les larves momifiées (une momie pouvant renfermer entre 10<sup>8</sup> et 10<sup>9</sup> ascospores). Elles persistent également dans le pollen, le miel et la cire qui sont donc des sources importantes de contamination (Flores *et al.* 2005a; Flores *et al.* 2005b). Les spores sont également résistantes dans le milieu extérieur ce qui n'est pas le cas des mycéliums.

Des enzymes impliquées dans la pénétration du champignon à travers la membrane péritrophique ont été identifiées (Theantana et Chantawannakul 2008). Deux souches de type sexuel différents (ARSEF 7405 et 7406) ont été isolées par Murray *et al.* (2005). Ces deux isolats ont été nommés MAT1-1 et MAT1-2 par Aronstein *et al.* (2007).

Le séquençage du génome d'*A. apis* (Qin *et al.* 2006) et des études de transcriptomique (Cornman *et al.* 2012a) ont permis de mettre en évidence de nombreux facteurs de virulence, notamment des gènes codant des chitinases, des protéases et des toxines.

- **Maladie, manifestations cliniques, pouvoir infectieux/pouvoir pathogène**

La maladie est surtout observée au printemps. Elle est propagée par les ascospores qui sont ingérées par les larves. Lorsque les conditions sont favorables, les spores germent dans l'intestin de la larve et forment un filament ou mycélium. Ce dernier va envahir tous les tissus de la larve et la tuer. Les larves infestées sont d'abord molles et de couleur blanc-jaunâtre puis se raffermissent et deviennent de couleur jaune. Le mycélium forme un feutrage blanc ou vert-noir. La larve va ensuite se dessécher et entrer dans un processus de momification ; c'est pour cette raison que l'on parle de « couvain plâtré ».

Si l'infection est fatale pour les larves, elle est rarement responsable de la destruction totale d'une colonie ; cependant elle peut être à l'origine de son affaiblissement et provoquer des baisses de productivité de la colonie.

La consommation d'aliments contaminés (miel, pollen), la trophallaxie et le matériel contaminé permettent la dissémination de la maladie. Le pillage, la dérive, les manipulations apicoles peuvent faciliter la propagation de la maladie entre les colonies.

Chaque caste (ouvrières, mâles et reines) de la colonie peut être touchée, mais seules les larves sont sensibles. Les abeilles adultes bien que résistantes peuvent héberger des spores dans leur intestin et servent de vecteurs (Aronstein et Murray 2010).

Il est également important de signaler que plusieurs souches d'*A. apis* ont été mises en évidence avec des niveaux de virulence différents (Glinski 1982; Lee *et al.* 2013; Vojvodic *et al.* 2011).

Des facteurs biotiques et abiotiques peuvent favoriser le développement du champignon et l'apparition de la maladie. Ainsi, une baisse de température et une humidité importante favorisent la germination des spores et donc la croissance du champignon.

- **Situation de co-infections/co-exposition à d'autres facteurs de stress**

Hedtke *et al.* (2011) ont montré que l'infestation des colonies d'abeilles par *Varroa* en été favorisait l'apparition de cas d'ascosphérose. Un rôle de *Nosema ceranae* dans la susceptibilité des colonies à *Ascosphaera apis* a également été évoqué. L'utilisation d'antibiotiques, la présence de résidus de produits phytosanitaires seraient également des facteurs favorisant (cf. chapitre interactions).

- **Détection**

La présence de larves momifiées blanches ou noires sur la planche d'envol ou au pied de la ruche est une caractéristique spécifique de la maladie. Le diagnostic se fait par recherche des spores sur les larves mortes au microscope.

Etant donné que des spores d'*A. apis* sont souvent présentes dans des colonies asymptomatiques, un diagnostic par PCR est nécessaire. Celui-ci est réalisé à partir de région de l'ADNr et des ITS1 et 2 (Borum et Ulgen 2008; Chorbinski 2004). Une approche par PCR basée sur des séquences répétées (Rep-PCR) a également été utilisée par Reynaldi *et al.* (2003) pour caractériser différents isolats d'*A. apis*. Plus récemment, une approche par PCR multiplex a été développée pour évaluer la prévalence d'*A. apis* et des bactéries responsables des loques américaine et européenne (Garrido-Bailon *et al.* 2013).

- **Traitement, contrôle et méthodes de prévention**

Il n'existe actuellement pas de traitement. La mise en évidence d'*A. apis* doit s'accompagner d'un nettoyage/désinfection de la ruche pour en limiter la propagation. Des stratégies alternatives sont proposées pour contrôler la maladie : sélection de lignées résistantes basée sur le comportement hygiénique (Evans et Spivak 2010; Invernizzi *et al.* 2011), remplacement de reines, amélioration de la gestion sanitaire des ruchers, utilisation de produits naturels à activité antifongique tels que des huiles essentielles (Kloucek *et al.* 2012) ou de microorganismes (ex : *Bacillus subtilis*) capables d'inhiber la croissance d'*A. apis* (Sabaté *et al.* 2009).

Des méthodes de stérilisation peuvent être utilisées pour diminuer la charge des spores d'*A. apis* dans les ruches car elles peuvent persister plusieurs années dans le pollen, la cire ou le miel (Aronstein et Murray 2010).

Il est également important de choisir un lieu ensoleillé pour l'emplacement du rucher, de vérifier la ventilation des ruches, la qualité de l'alimentation qui est apportée dans les colonies, de renouveler les vieux cadres qui peuvent être contaminés par des spores. Dans le cas de forte infection, un transvasement de la colonie peut être envisagé.

- **Réglementation sur la maladie**

Aucune

#### 3.1.1.2.4 Parasites

##### 3.1.1.2.4.1 *Varroa destructor*

- **Parasite**

*Varroa destructor*

- **Maladie**

Varroase, varroatose ou varroose

- **Historique de la découverte**

La première espèce de *Varroa*, *Varroa jacobsoni* Oudemans, a été décrite au début du XXème siècle, en Indonésie, sur des abeilles de l'île de Java de l'espèce *Apis cerana*. Une autre espèce, *Varroa destructor* originaire du Sud-Est Asiatique (Anderson et Trueman 2000), s'est rapidement développée sur son nouvel hôte *Apis mellifera* et est aujourd'hui considérée comme la menace la plus importante pour les abeilles mellifères et une des causes majeures de leur déclin (Le Conte et al. 2010).

- **Evolution de la répartition géographique, actualité**

Le phénomène d'adaptation de l'acarien à *Apis mellifera* s'est opéré vraisemblablement au cours des années soixante, à la suite de l'augmentation progressive des populations d'*A. mellifera*, en Asie, dans un but d'amélioration de la productivité des colonies d'abeilles asiatiques et à partir d'un nombre très limité de *Varroa* (Solignac et al. 2005). Le transport d'essaims infestés, d'une part, et les échanges entre apiculteurs, d'autre part, ont entraîné la dissémination de cet agent pathogène à travers le monde. Aujourd'hui, la varroose touche l'ensemble de la planète à l'exception de l'Australie. En France, la première observation de colonies d'abeilles infestées par *Varroa* a été faite en 1982 (Colin et al. 1983).

- **Description morphologique et moléculaire**

*Varroa destructor* est un acarien parasite de l'abeille adulte ainsi que des larves et des nymphes. Il est retrouvé chez les ouvrières, les mâles et rarement chez les reines. La présence de couvain est nécessaire pour son développement. Il présente un dimorphisme sexuel facilement observable à l'âge adulte. Les femelles sont de couleur brune et mesurent de 1 à 1,8 mm de long sur 1,5 à 2 mm de large. Les mâles sont blanc jaunâtres et mesurent 0,8 mm de diamètre. Seule la femelle, en perforant les téguments de l'abeille, se nourrit de l'hémolymphe. De forme aplatie, *Varroa* possède huit pattes très courtes et très puissantes lui permettant de s'accrocher aux abeilles.

Le génome de ce parasite a été partiellement séquencé (Cornman et al. 2010).

- **Maladie, manifestations cliniques, pouvoir infectieux/pouvoir pathogène**

Le cycle de développement de cet ectoparasite se déroule essentiellement dans le couvain et dure environ huit jours. Les femelles adultes envahissent les alvéoles de couvain quelques heures avant leur operculation par les ouvrières (Beetsma et al. 1999). Environ 60 heures après l'operculation, la femelle acarien pond son premier œuf qui donnera naissance à un mâle, les œufs suivants donneront naissance à des femelles. La durée d'operculation du couvain d'ouvrière d'*A. mellifera* permet la production d'environ deux femelles *Varroa* matures et celle du couvain mâle la production de trois à cinq femelles matures (Martin 1998; Rosenkranz et al. 2010). Le mâle féconde les femelles à l'intérieur de l'alvéole operculée. Le parasite se nourrit de l'hémolymphe des stades

immatures et des adultes. L'infestation par *V. destructor* est extrêmement dommageable aux colonies d'abeilles domestiques (Bailey et Ball 1991). Les principaux effets délétères sont causés par les femelles reproductrices qui, en se nourrissant de l'hémolymphe, affaiblissent les larves, les nymphes et les ouvrières, ce qui se répercute sur la colonie toute entière (Kanbar et Engels 2003). Cet acarien est également vecteur d'autres agents infectieux, notamment de nombreux virus. Il peut être lui-même infecté par un virus spécifique (VDV1) mais non connu pour être pathogène des abeilles (Ongus *et al.* 2004; Zhang *et al.* 2007), sachant que des recombinants entre le VDV1 et le DWV existent (Moore *et al.* 2011). Une grande partie des signes cliniques observés au sein des colonies semble être liée aux infections transmises, plus qu'à l'infestation elle-même (Ball 1985; Gliński et Jarosz 1995). Par ailleurs, Benoit *et al.* (2004) ont mis en évidence la capacité de *V. destructor* à véhiculer des microorganismes tels qu'*Aspergillus* sp. et *Penicillium* sp. dans les colonies d'abeilles domestiques. L'acarien est aussi considéré comme un vecteur potentiel de la maladie du couvain pétrifié et/ou de la maladie du couvain plâtré (Benoit *et al.* 2004; Liu 1996).

Les conséquences de l'infestation sont, notamment :

- une réduction en poids et en volume de l'hémolymphe (Romaniuk et Wawrzyniak 1991; Yang et Cox-Foster 2007) ;
- un sous-développement des glandes hypopharyngiennes (De Jong *et al.* 1982) ;
- une diminution de la longévité (Amdam *et al.* 2004a; Ellis et Delaplane 2009; Kovac et Crailsheim 1988) ;
- une activité de butinage précoce des ouvrières dans leur cycle de vie (Janmaat et Winston 2000b) ;
- une altération de l'ontogenèse et de l'expression des glycoprotéines des spermatozoïdes (Martí *et al.* 1996).

En outre, il a été démontré une action immunosuppressive de l'infestation par ce parasite sur les abeilles émergentes (Yang et Cox-Foster 2007; Yang et Cox-Foster 2005). Des effets, liés à la synergie ou l'association avec d'autres agents pathogènes (autres acariens, bactéries, virus et champignons), peuvent également apparaître potentiellement en lien avec cette immunosuppression (Gregory *et al.* 2005; Yang et Cox-Foster 2005).

De manière générale, pour un rucher fortement infesté, un important taux de mortalité hivernale (Amdam *et al.* 2004a) est constaté ainsi que la perte de nombreuses colonies (Caron *et al.* 2005; Faucon *et al.* 2002; Morse et Goncalves 1979; Oldroyd 2007; Wenning 2001). Aux États-Unis, une part importante des mortalités de colonies serait la conséquence de l'action de l'acarien *Varroa destructor* en association avec des attaques virales (Johnson 2007).

Les femelles *Varroa* vont pouvoir être disséminées dans la ruche et les ruches avoisinantes en s'accrochant aux ouvrières et aux mâles.

- **Situation de co-infections/co-exposition**

Les colonies infestées par *Varroa* sont souvent co-infectées par d'autres agents infectieux (autres acariens, bactéries, virus et champignons), en particulier certains virus tels que le DWV, le KBV, l'ABPV ou le SBV, connus pour, ou supposés être transmis aux abeilles par cet acarien. De plus, l'action immunosuppressive de *Varroa* amplifie le développement de ces virus et leurs effets (Gregory *et al.* 2005; Yang et Cox-Foster 2005). Ainsi, des taux plus importants de virus sont retrouvés dans les colonies fortement infestées par *Varroa*.

- **Traitement, contrôle et méthodes de prévention**

Plusieurs méthodes de lutte sont utilisées mais il est actuellement impossible d'éradiquer totalement cet ectoparasite. L'objectif est de diminuer le taux d'infestation par *Varroa destructor* à un niveau « supportable » pour la colonie. Il existe trois types d'acaricides pour lutter contre *Varroa* (cf. paragraphe 3.1.2.5) : les molécules organiques de synthèse (*tau*-fluvalinate, amitraze ou coumaphos), les produits naturels à base de thymol et les acides organiques (acide formique, acide oxalique). L'usage du coumaphos n'est pas autorisé en apiculture en France. Une autre approche de lutte anti-*Varroa* vise à sélectionner des colonies résistantes à ce parasite (Rinderer *et al.* 2014).

- **Réglementation**

C'est un danger sanitaire de deuxième catégorie (arrêté ministériel du 29 juillet 2013) en France et une maladie inscrite sur la liste OIE et sur la liste B des maladies pouvant faire l'objet d'une surveillance au niveau Européen (directive CEE/92/65 du Conseil du 13 juillet 1992 Annexe B).

### 3.1.1.2.4.2 *Acarapis woodi*

- **Parasite**

*Acarapis woodi*

- **Maladie**

Acariose des trachées ou acarapidose

- **Historique de la découverte**

L'acariose des trachées a été associée à la « Maladie de l'île de Wight » (Rennie 1921), une maladie des abeilles s'accompagnant de pertes extrêmement élevées apparue en 1904 sur l'île de Wight (Royaume-Uni). En 1906, environ 90 % des colonies d'abeilles de l'île en auraient été atteintes et en 1918, les pertes de colonies dans l'ensemble des îles britanniques ont été estimées à 90 % (Borchert 1970; Sammataro *et al.* 2000). Bailey (1961) signale que les conditions de récoltes et de climat défavorables, ainsi que les pratiques apicoles désastreuses liées à la situation d'instabilité et d'insécurité de la première guerre mondiale ont favorisé le développement de cette acariose. Toutefois, selon Bailey, cette maladie ne serait pas uniquement liée à l'acarien des trachées. D'après l'analyse des données sanitaires apicoles obtenues sur l'île de Wight, de nombreuses autres maladies auraient contribué à cette situation, avec, parfois, des signes cliniques analogues. En effet, les signes cliniques décrits pour cette maladie sont aussi très proches de ceux décrits pour la paralysie chronique, maladie d'origine virale (Ball et Bailey 1997; Ribière *et al.* 2008). La maladie de l'île de Wight serait donc mortelle, de nature infectieuse et provoquée par différentes causes, dont *A. woodi* fait partie (Borchert 1970; Wilson *et al.* 1997).

- **Evolution de la répartition géographique, actualité**

La distribution géographique d'*A. woodi* est mondiale, à l'exception de l'Océanie (Wilson *et al.* 1997). A l'instar de la varroose, l'acariose est dommageable à l'apiculture.

Depuis sa première identification aux États-Unis, en 1984, *A. woodi* a été responsable de la perte de dizaines de milliers de colonies et d'un préjudice estimé à plusieurs millions de dollars (Delfinado-Baker 1984). En 1989, un échantillonnage d'abeilles auprès de 55 apiculteurs a permis de mettre en évidence, d'une part, la présence de *A. woodi* dans 50 % des échantillons et, d'autre part, une relation significative entre l'impact de cet acarien et la mortalité hivernale (Frazier *et al.* 1994). Sa présence est actuellement hypothétique dans les ruchers en France et les traitements acaricides réalisés contre *Varroa* ont fait baisser sa prévalence dans les colonies d'abeilles.

- **Description morphologique et moléculaire**

*Acarapis woodi* est un acarien parasite spécifique de l'abeille domestique qui vit et se reproduit au niveau de l'appareil respiratoire, principalement dans la première paire de trachées thoraciques. Il est capable de parasiter les 3 castes d'abeilles adultes (reine, ouvrières et mâles). De couleur brune, il mesure environ 150 µm et est donc invisible à l'œil nu. Il possède un appareil buccal muni de mandibules fines et pointues lui permettant de perforer la paroi trachéale pour se nourrir de l'hémolymphe.

- **Maladie, Manifestations cliniques, pouvoir infectieux/pouvoir pathogène**

L'acariose est une maladie de l'abeille adulte. Elle se traduit cliniquement par une nécrose de la trachée qui prend un aspect noir caractéristique de l'infestation. L'acarien envahit une partie du système respiratoire (notamment, la première paire de trachées). Il perce la paroi des trachées d'*A. mellifera* pour se nourrir de son hémolymphe, entravant parfois sévèrement la respiration de l'hôte. Alors que tous les stades de développement (cycle de développement d'environ quatorze jours) d'*A. woodi* se déroulent à l'intérieur des voies respiratoires, les femelles reproductrices quittent la trachée pour parasiter une nouvelle abeille adulte (Morgenthaler 1933). *A. woodi* ne survit que quelques heures à l'extérieur des trachées, une transmission par contact direct entre les

abeilles adultes est donc nécessaire (Pettis *et al.* 2007), et tout confinement prolongé des individus de la colonie, notamment, lors de conditions climatiques défavorables, est propice à la transmission de l'agent pathogène.

Les signes cliniques, sur les abeilles adultes, dépendent du nombre de parasites présents dans les trachées et sont le plus souvent attribués aux dommages mécaniques et aux perturbations physiologiques liés à l'obstruction de la première paire de trachées.

Les symptômes de l'infestation de la colonie n'apparaissent que lorsque le nombre de parasites dépasse un seuil critique et arrive à obstruer les trachées respiratoires des abeilles, généralement, au début du printemps. Ceux-ci se traduisent par :

- ✓ des abeilles paralysées ou/et incapables de voler (Faucon 1992; McMullan et Brown 2006) ;
- ✓ un raccourcissement de la durée de vie des abeilles (Bailey et Ball 1991; De Guzman *et al.* 2005; Gary et Page 1989) ;
- ✓ une mortalité d'adultes (au printemps) supérieure à la mortalité naturelle (Bailey et Ball 1991; Otis et Scott-Dupree 1992; Root 1990) ;
- ✓ une forte mortalité hivernale en particulier dans les régions tempérées (Bailey 1958; De Guzman *et al.* 2005; Phibbs 1996) ;
- ✓ une diminution de la production de couvain et de miel (Eischen *et al.* 1989; Eischen 1987; McMullan et Brown 2006).

Outre son action spoliatrice et traumatique, *A. woodi* serait également susceptible de transmettre des virus à l'abeille domestique (notamment le virus de la paralysie aiguë de l'abeille - ABPV) (Shimanuki *et al.* 1994).

Certains signes cliniques observés lors du syndrome de l'effondrement des colonies (CCD) aux États-Unis semblent très proches de ceux de la « Maladie de l'île de Wight » (vanEngelsdorp *et al.* 2007), mais le CDD n'a pas été corrélé avec cette parasitose.

- **Situation de co-infections/co-exposition à d'autres facteurs de stress**

Lors de la piqûre, l'acarien pourrait inoculer certains agents infectieux, en particulier des virus.

- **Détection**

L'acariose ne peut être détectée qu'en laboratoire. La détection d'*Acarapis woodi* se fait par observation au microscope des trachées après dissection. Un test immunologique par ELISA a été développé (Grant *et al.* 1993). Des approches de PCR ont plus récemment été mises au point (Cepero *et al.* 2015; Kojima *et al.* 2011).

- **Thérapie, contrôle et méthodes de prévention**

Des produits naturels à base d'acide formique, de menthol ou de thymol ou des produits de synthèse (amitrazé en fumigation) peuvent être utilisés pour lutter contre l'acariose des trachées (Underwood et Currie 2004). Les traitements acaricides pour lutter contre *Varroa destructor* ont également eu pour conséquence une diminution de la prévalence d'*Acarapis woodi* et donc de cette acariose.

- **Réglementation**

Cette maladie est inscrite sur la liste de l'OIE (OIE 2015), et sur la liste B des maladies pouvant faire l'objet d'une surveillance au niveau Européen (directive CEE/92/65 du Conseil du 13 juillet 1992).

### 3.1.1.2.4.3 *Crithidia mellificae*

*Crithidia mellificae* est un protozoaire flagellé du genre *Trypanosoma*, parasite de l'abeille mellifère ayant été décrit pour la première fois en 1967 en Australie (Langridge et McGhee 1967). Il présente cependant une large distribution puisque depuis il a été identifié un peu partout à travers le monde (États-Unis, Europe et Asie). Quarante ans après sa découverte et avec l'émergence de nouveaux outils moléculaires de détection, des études ont rapporté une corrélation significative entre la présence de *Crithidia mellificae* et la perte de colonies aux États-Unis et en Belgique (Cornman *et al.* 2012b; Ravoet *et al.* 2013). Par exemple, les charges en *C. mellificae* étaient 6,15 fois plus élevées dans les colonies atteintes de CCD que dans les colonies non atteintes dans l'étude menée aux États-Unis. Par contre, aucun lien entre l'apparition de CCD et la prévalence du parasite n'a été observé (Cornman *et al.* 2012b). En Belgique, une prévalence légèrement supérieure du parasite a

été observée dans les colonies mortes au cours de l'hiver (81,3 %) par rapport aux colonies survivantes (71,3 %) (Ravoet *et al.* 2013). De plus, les abeilles étaient souvent co-infectées par *C. mellifica* et *Nosema ceranae* (Ravoet *et al.* 2013; Runckel *et al.* 2011). Le pouvoir pathogène de *C. mellifica* n'est pas encore bien connu, mais une étude en laboratoire a identifié la réponse immunitaire de l'abeille à ce parasite (Schwarz et Evans 2013). En France, ce parasite n'est pas recherché actuellement et la maladie n'est pas réglementée.

#### 3.1.1.2.5 Prédateurs : frelon asiatique

- **Agent biologique**

*Vespa velutina* Lepelletier 1836/ Frelon asiatique, Frelon à pattes jaunes / Yellow-legged hornet/pas d'abréviation

- **Historique de la découverte**

Espèce introduite en France, signalée pour la première fois en 2004 dans le Lot-et-Garonne (Haxaire *et al.* 2006).

- **Evolution de la répartition géographique, actualité**

Son aire de répartition d'origine va de l'Afghanistan à l'Est de la Chine, l'Indochine et l'Indonésie (Villemant *et al.* 2011). Depuis sa première observation en 2004 dans le Sud de la France, il a colonisé progressivement la majorité du territoire français et le Nord de l'Espagne. La répartition actuelle est suivie par des campagnes de signalement sur l'ensemble du territoire, coordonnées par le MNHN (site web de l'INPN<sup>15</sup> pour la situation mise à jour). Une vingtaine d'autres espèces de frelons exotiques sont susceptibles d'être importées accidentellement en Europe et de s'implanter (revue dans Beggs *et al.* (2011)). Comme pour toutes les espèces potentiellement invasives, la réussite locale effective d'un taxon est imprévisible. Elle dépend de ses caractéristiques propres comme des capacités d'accueil des écosystèmes d'arrivée.

- **Description morphologique et moléculaire**

De taille inférieure au Frelon d'Europe (*Vespa crabro*), il possède une coloration différente (dominante noire, orange et liseré jaune sur l'abdomen, face orange, extrémité des pattes jaunes) (Rome et Villemant 2011).

- **Troubles observés**

Prédateur des colonies, il s'attaque aux butineuses à proximité de la planche d'envol, puis au couvain si la configuration de la ruche le permet.

L'effet sur les colonies d'abeilles est direct, lié à la prédation, et indirect, lié à la menace sur les butineuses par des frelons en vol stationnaire à proximité de la ruche ou des ressources (Arca *et al.* 2014; Monceau *et al.* 2013). La menace peut ainsi avoir un effet disproportionné sur le butinage. Des essais expérimentaux sur les abeilles *Apis cerana* ont montré que les abeilles restreignent le butinage de 55 à 79 % sur des ressources où les prédateurs sont présents (Tan *et al.* 2013).

Les colonies de *Vespa velutina* ne survivent pas à l'hiver. Les femelles fondatrices quittent la colonie en fin d'été, sont fécondées, survivent seules à l'hiver dans des anfractuosités. Elles élèvent un petit nombre d'ouvrières qui construisent ensuite un nid de plusieurs milliers d'individus. Celui-ci est bien souvent difficile à détecter en saison, car masqué par les frondaisons<sup>16</sup>.

- **Détection**

Les critères de diagnose des ouvrières et des nids sont publiés par le Museum national d'histoire naturelle - MNHN<sup>17</sup>.

Il n'existe pas de mention de *Vespa velutina* pour l'instant à l'OIE, mais comme cet organisme n'est pas susceptible d'être véhiculé par des animaux vivants ou des produits d'origine animale, il n'y a pas de raison de mettre en place des dispositifs de certification sanitaire comme pour *Tropilaelaps* par exemple.

<sup>15</sup> Inventaire national du patrimoine naturel

<sup>16</sup> Feuillages d'un arbre

<sup>17</sup> [http://inpn.mnhn.fr/docs/Vespa\\_velutina/Fiches\\_Identification\\_Vespa\\_velutina\\_MNHN.pdf](http://inpn.mnhn.fr/docs/Vespa_velutina/Fiches_Identification_Vespa_velutina_MNHN.pdf)



La progression de l'espèce sur le territoire français est suivie par un réseau d'observateurs volontaires.

- **Mesures de lutte et de prévention**

Du fait de la difficulté de détecter les femelles fondatrices, les méthodes de lutte ne peuvent viser que les prédateurs à proximité de la ruche (mais le piégeage sélectif est encore peu efficace). La destruction d'un nid pendant la saison, lorsqu'il est accessible, résout ponctuellement les attaques, jusqu'à une nouvelle installation (Beggs *et al.* 2011).

- **Réglementation sur la maladie**

Le frelon asiatique est classé danger sanitaire de 2<sup>ème</sup> catégorie dans l'arrêté ministériel du 29 juillet 2013. Son introduction est interdite sur le territoire national (il est absent dans les Départements et Territoires d'Outre-mer) (arrêté du 22 janvier 2013 interdisant sur le territoire national l'introduction de spécimens du frelon à pattes jaunes *Vespa velutina*).

### 3.1.1.3 Portage asymptomatique

Lorsqu'une colonie présente des signes cliniques donnés, le diagnostic étiologique repose sur l'identification et la quantification de l'agent causal dans la colonie et dans son environnement (rucher, autres sources de contamination). Le diagnostic va aussi tenter de faire la différence entre des contaminants saprophytes et les agents très virulents (par exemple entre *Paenibacillus alvei*, saprophyte, et *Paenibacillus larvae*, l'agent de la loque américaine). Aujourd'hui, ceci se fait fréquemment par détection et quantification moléculaire (techniques de biologie moléculaire). L'interprétation d'un résultat d'analyse de laboratoire nécessite donc une bonne connaissance du « paysage microbiologique et parasitaire » dans lequel vit la colonie.

Chez les abeilles, la plupart des agents infectieux sont peu ou pas virulents. Ils persistent à bas bruit dans certains ruchers sans provoquer de troubles, mais ils peuvent peser sur les performances zootechniques (Evans et Schwarz 2011). On peut souhaiter déterminer l'état sanitaire d'une colonie, de façon à choisir les meilleures techniques apicoles visant à réduire ce portage, le cas échéant. Dans ce cas, il est intéressant de comparer les associations d'agents infectieux, qui se potentialisent parfois, avec les indicateurs de la force de la colonie, qui sont le reflet des impacts subcliniques.

Si un état infectieux à bas bruit peut être bien supporté par la colonie, un cofacteur (toxique, météorologique, *etc.*) peut rompre cet équilibre et entraîner l'apparition de symptômes et de la mortalité. Par conséquent, il faut connaître la situation normale pour évaluer le risque entraîné par une perturbation.

Les études de prévalence disponibles actuellement sur les agents infectieux de l'abeille reflètent la diversité de contextes dans lesquels on cherche à connaître le portage asymptomatique. Les objectifs poursuivis par les différentes équipes sont eux-mêmes très diversifiés. Ce paragraphe propose une synthèse de ces études de prévalence afin de répondre à différentes questions sur :

- les agents infectieux détectés dans les colonies asymptomatiques, leurs associations éventuelles et le statut du rucher dans lequel ils sont identifiés ;
- les charges infectieuses trouvées à un moment donné ;
- la fréquence de détection d'agents infectieux. En raison du cycle de vie des colonies, la saison doit être prise en compte ;
- les variations géographiques ;
- l'éventuel caractère prédictif d'un risque ultérieur en cas de présence d'agents infectieux dans les colonies à un instant t et, dans l'affirmative, le mécanisme probable.

Dans le **Tableau 2** sont compilées les informations issues d'études (présentées dans le **Tableau 3**) sur les agents infectieux des colonies asymptomatiques en Europe. Certaines de ces études combinent plusieurs des questions ci-dessus.

VanEngelsdorp *et al.* ont passé en revue les critères de qualité méthodologique pour les études épidémiologiques en santé de l'abeille (vanEngelsdorp *et al.* 2013a). Il faut être vigilant sur le terme de prévalence, utilisé indifféremment par les auteurs pour l'infection asymptomatique (prévalence de l'infection) et la survenue de troubles (prévalence de cas de maladie, avec une définition précise du cas). Dans le **Tableau 3**, le taux de prévalence de l'agent infectieux (AI) observé dans la population

de colonies ou de ruchers sans symptômes ( $P_{asy\_AI}$ ) permet, ou non, selon le type d'étude, une généralisation pour toute la zone d'étude. Les limites méthodologiques de chaque étude seront détaillées ci-dessous.

Les informations issues de ces études permettent de proposer des recommandations en termes d'échantillonnage pour quatre types d'enjeux :

- le diagnostic étiologique de troubles,
- le dépistage des agents épizootiques et la qualification de zones indemnes,
- la gestion zootechnique de l'état infectieux,
- la standardisation des essais d'évaluation des produits phytopharmaceutiques avant et après homologation.

#### 3.1.1.3.1 *Agents infectieux et parasitaires trouvés dans les colonies asymptomatiques. Statut du rucher. Agents associés*

Le **Tableau 2** (2a et 2b) recense la majorité des agents infectieux et parasitaires connus pour circuler actuellement en Europe, et détectés dans les études listées dans le **Tableau 3**. Seules des études européennes récentes (échantillonnage postérieur à 2002) ont été passées en revue.

Tableau 2 : Agents infectieux et parasitaires circulant en Europe

Tableau 2a : Agents bactériens et parasitaires circulant en Europe

	<i>Varroa</i>	<i>Paenibacillus larvae</i>	<i>Melissococcus plutonius</i>	<i>Nosema apis</i>	<i>Nosema ceranae</i>	<i>Crithidia mellificae</i>
<b>Fréquence dans les ruchers (N) (référence)</b>	35-50 % (/24) (B)	99 % (/18) (A) 23-40 % (/24) (B) 70 % (/27) (J)	76 % (/18) (A) 18-29 % (/24) (B) 14 % (/7) (H)	29 % (/18) (A) 13 - 80 % (/24) (B) 33 % (/9) (K) 8-15 % (/456) (M)	99 % (/18) (A) <i>Nosema</i> spp. 13-80 % (/24) (B) <i>N. ceranae</i> 88 % (/9) (K) 40 % (/456) (M)	
<b>Fréquence dans les colonies (In) (référence)</b>	15-24 % (/120) (B) 51,16 - 62,12 % (/1931) (P)	66 % (/90) (A) 7-11 % (/120) (B) 82 % (/73) (J) non-détecté (/1073) (P)	26 % (/90) (A) 3-8 % (/120) (B) 4 % (/7) (H) non-détecté (/1073) (P)	5 % (/90) (A) 3-60 % (/120) (B) 5-15 % (/220) plus élevé au printemps qu'en automne (G) 8 % <i>N. apis</i> (/61) (K) 5,4-18,9 % (/2278) (P) 8-15 % (/456) (M) 10,2 % PCR (/363) (Q)	71 % (/90) (A) <i>Nosema</i> spp. 3-60 % (/120) (B) 65 % <i>N. ceranae</i> (/61) (K) 3,02 - 14,46 % (/2278) (P) 50 % (/456) (M) 92,6 % PCR (/363) (Q)	70,5 % (/363) (Q)
<b>Abondance (unité de mesure/échantillon) (référence)</b>	2-20 (individus/jour*colonie) (C) 1 à 112 (individus/100 abeilles d'une colonie) (P) 0-500 individus/semaine (Q)	10 <sup>3</sup> - 10 <sup>8</sup> (copies de gène/abeille) (A) 6.10 <sup>4</sup> spores/100 abeilles (J)	1 - 10 <sup>6</sup> (copies de gène/abeille) (A)	10 <sup>-1</sup> -1 (copies de gène/abeille) (A) <i>Nosema</i> spp. cf. ci-contre (B) 24 10 <sup>3</sup> - 16 10 <sup>6</sup> spores/abeille (K) 10 <sup>5</sup> -10 <sup>9</sup> spores/abeille (Q)	10 <sup>-2</sup> - 10 <sup>5</sup> (copies de gène/abeille) (A) 2. 10 <sup>4</sup> - 2. 10 <sup>7</sup> (spores/abeille) (B) différences significatives selon saison (RT-PCR abondance relative) (C) 24 10 <sup>3</sup> - 16 10 <sup>6</sup> spores/abeille (K) 10 <sup>5</sup> -10 <sup>9</sup> spores/abeille (Q)	
<b>Cooccurrence</b>	DWV, ABPV, SBV (P)	<i>M. plutonius</i> (B)	<i>P. larvae</i> (B)	<i>N. ceranae</i> (K) (P) 8,8 % de co-infection avec <i>N. ceranae</i> (/363) (Q) BQCV (L)	<i>N. apis</i> (K) (P) 8,8 % de coinfection avec <i>N. apis</i> (/363) (Q) ALPV, VdMLV (Q)	

A : (Mouret *et al.* 2013) ; B : (Chauzat *et al.* 2010) ; C : (Dainat *et al.* 2012b) ; D : (Antunez *et al.* 2012) ; E : (Baker et Schroeder 2008) ; F : (Tentcheva *et al.* 2004) ; G : (Gisder *et al.* 2010) ; H : (Forsgren *et al.* 2005) ; I : (Gauthier *et al.* 2007) (mêmes échantillons que F, mais charges virales) ; J : (Lindström et Fries 2005) ; K : (Chauzat *et al.* 2007), détail *Nosema apis* et *N. ceranae* de Chauzat *et al.* (2010) ; L : (Berényi *et al.* 2006) ; M : (Martín-Hernández *et al.* 2012) ; O : Beenet 2011-2013 ; P : (Hedtke *et al.* 2011) ; Q : (Ravoet *et al.* 2013) ; R : (Genersch *et al.* 2010) ; S : (Belloy *et al.* 2007)

Tableau 2b : Agents viraux circulant en Europe

	DWV	ABPV	KBV	IAPV	CBPV	BQCV	SBV	VdV1
<b>Fréquence dans les ruchers (N) (référence)</b>	96 % (A) 100 % (/23) (E) 97% (/36) dans adultes, 94 % dans pupes (F)	14 % (/18) (A) 4,3 % (/23) (E) 58 % (/36) dans adultes, 23 % dans pupes (F)	75 % (/18) (A) 17% (/36) dans adultes, 6 % pupes (F)	65 % (/18) (A)	90 % (/18) (A) 28 % (/36) dans adultes, 0% dans pupes (F)	83 % (/18) (A) 86 % (/36) dans adultes, 23 % dans pupes (F)	85 % (/18) (A) 86 % (/36) dans adultes, 80 % dans pupes (F)	94 % (/18) (A)
<b>Fréquence dans les colonies (n) (référence)</b>	84 % (/90) (A) 56 – 100 % (/456) (C) 6-19 % (D) 97 % (/69) (E) 97 % (/360) sauf Ouessant (F) 26,29 % (/445) (P)	4 % (/90) (A) 1% (/456) (D) 29 % (/69)(E) 5,39 % (/445) (P)	42 % (/90) (A) 0% (/69) (E)	24 % (/90) (A)	54 % (/90) (A) 0 % (/69) €	52 % (/90) (A) 10 % (C) 1,4 % (/69) (E) 2 - 75 % selon saison (F)	56 % (/90) (A) 1 % (C) 1,4 % (/69) (E) 67 % (/360) (F) 0,9 % (/445) (P)	56 % (/90) (A)
<b>Abondance (unité de mesure/échantillon) (référence)</b>	1-10 <sup>8</sup> (copies de gène/abeille) (A) 10 <sup>3</sup> -10 <sup>6</sup> (copies de gène/abeille) (C) 10 <sup>5</sup> – 10 <sup>10</sup> copies/abeilles (I)	10 <sup>2</sup> – 10 <sup>6</sup> (copies de gène/abeille) (A) 10 <sup>5</sup> -10 <sup>8</sup> (copies de gène/abeille) (I)	10 <sup>4</sup> – 10 <sup>8</sup> (copies de gène/abeille) (A) 10 <sup>5</sup> -10 <sup>10</sup> (copies de gène/abeille) (I)	10 <sup>2</sup> – 10 <sup>8</sup> (copies de gène/abeille) (A) 13-25 % (C)	10 <sup>-3</sup> – 10 <sup>8</sup> (copies de gène/abeille) (A) Abondance relative selon saisons (B) ; 10 <sup>5</sup> -10 <sup>10</sup> copies de gène/abeille (I)	1 – 10 <sup>8</sup> (copies de gène/abeille) (A) 10 <sup>5</sup> -10 <sup>8</sup> copies de gène/abeille (I)	10 <sup>-1</sup> -10 <sup>7</sup> (copies de gène/abeille) (A) 10 <sup>5</sup> -10 <sup>10</sup> copies de gène par abeille (I)	10 <sup>2</sup> – 10 <sup>8</sup> (copies de gène/abeille) (A)
<b>Co-infection avec</b>	BQCV, IAPV (D) autres virus (L) BQCV KBV SBV (M) ABPV, SBV (P)	autres virus (L) DWV, SBV (P)	autres virus (L)		autres virus (L)	DWV, IAPV ( C ) LSV (Q)	DWV (P)	

Tableau 3 : Etudes de prévalence des agents infectieux et parasitaires en Europe

\* même jeu d'échantillons

\*\* même jeu d'échantillons ou sous-échantillon d'un même dispositif

\*\*\* même jeu d'échantillons

MH = mortalité hivernale

MS = mortalité en saison

Asy = présence de l'infection sans symptômes

Inf = présence de l'infection avec ou sans symptômes

Asyq = quantification de la charge infectieuse sans symptômes

LA = loque américaine ; LE = loque européenne ; Na = *Nosema apis* ; Nc = *Nosema ceranae*

Régions biogéographiques : Atl = atlantique ; C = continental ; Med = méditerranéen ; Alp = alpine ; Bor = boréale

Se Sp VPP VPn : sensibilité, spécificité, Valeur Prédictive Positive, Valeur Prédictive Négative

Etude	Région	Cas	Agents	Conception du protocole	Type	Durée	Variables associées	Statistique	Incertitude	Nombre de ruchers	Nombre de colonies	Echantillons	Variables de force des colonies
A	France Ouest (Atl)	MH, Asyq	LA, LE, Na, Nc, 8 Virus	Observationnel	Cohorte	04/2009-03/2010	MH = f (Asy ; Asyq)	Prévalence Asy ; univarié paramétrique	Non	18	90	Abeilles cadre	Notation Liebefeld
B *	France entière (Atl, C, Alp, Med)	MH, MS, LA, LE, Acarapisose, couvain plâtré	LA, LE, <i>Nosema</i> sp, <i>Varroa</i> , <i>Acarapis</i>	Observationnel	Cohorte	03/2002-10/2005	MH = f (inf année précédente) Nb d'abeilles = f (inf, pratiques)	Odds Ratio ; modèle linéaire mixte	Non	24	120	Abeilles cadres + couvain	taille populations adultes et couvain
C	Suisse, Berne (C)	MH, Asyq, Quantification immunité	<i>Varroa</i> , 8 Virus, Na, Nc	Expérimental	Cohorte	08/2007-02/2008	MH = f ( <i>Varroa</i> , virus, <i>Nosema</i> , saison, Immuq)	t-tests bilatéraux, Kruskal-Wallis, analyse de survie, modèles linéaires mixtes	sans objet	1	29	Abeilles cadre	Liebefeld
D ***	Espagne (Med, Alp, Atl)	Asy	6 virus	Observationnel	Transversale	03/2006-11/2007	Prévalence virus = f (saison, autre virus)	Chi2	Non	456	456	Abeilles cadre	Non
E	Angleterre sud ouest (Atl)	Asy	6 virus	Observationnel	Transversale	09-10/2006	Historique de <i>Varroa</i>	non	non	23	69	Abeilles cadres	non
F *	France entière (Atl, C, Alp, Med)	Asy, Infection de <i>Varroa</i>	6 Virus, <i>Varroa</i>	Observationnel	Cohorte	03/2002-10/2002	Prévalence virus/ <i>Varroa</i> = f (Prévalence virus adultes saison précédente)	Chi2	Non	36	360	Adultes, pupes, (3 saisons) <i>varroa</i> (automne)	Non

G **	Allemagne nord est (C)	MH, Asy	Na, Nc	Observationnel	Cohorte	03/2005-04/2009	Prévalence <i>Nosema</i> = f (saison) ; MH=f ( <i>Nosema</i> )	-	Non	22	220	Adultes fond de ruche (printemps), adultes cadre	Non
H	Suisse (C, Alp)	LE clinique, AsyLE	LE	Observationnel	Comparaison entre colonies avec ou sans symptômes, même lieu	NA, en saison	infLE	Chi2	Non	12	92	larves malades et saines d'un même couvain	Non
I *	France entière (Atl, C, Alp, Med)	Asyq	Virus	Observationnel	Variabilité saisonnière des charges virales	03/2002-10/2002	saison, stade	Mann-Whitney, ANOVA par rangs	? range	36	360	Adultes, pupes, (3 saisons)	Non
J	Suède centre (Bor)	LA clinique, AsyLA	LA	Observationnel	Comparaison entre colonies avec ou sans symptômes même lieu	NA, en saison	InfLA ; Se Sp VPP VPN ; couvain vs. Hausse	Test de Wilcoxon	Non	59	459	Adultes de couvain, de hausse	Non
K *	France entière (Atl, C, Alp, Med)	Asy	Na, Nc	Observationnel	Subtypage et co-infections	03/2002-10/2005	(proportion Na/Nc)/pos gold standard Nsp	Aggregation/exclusion co-infection	Non	9	61	Adultes cadre	Non
L	Autriche (C, Alp)	Affaiblissement, mortalité, maladie noire, Asy Asyq	<i>N. spp.</i> , <i>Malpighamoeba</i> , <i>Acarapis</i> , <i>Varroa</i> , Virus, Virusq	Observationnel	Comparaison entre colonies avec ou sans symptômes même lieu	01/2003-01/2004	géographie, associations AI	Non	Non	NA	90 malades, 15 saines des mêmes ruchers, 26 malades de pays voisins	ouvrières mortes	Non
M ***	Espagne (Med, Alp, Atl)	InfNosema	<i>N. apis</i> , <i>N. ceranae</i>	Observationnel	Cohorte	03/2006-11/2007	région bioclimatique, saison, année	Taux de Prévalence estimé Chi2	Oui pour le Tx P	456 étude transversale dont 30 étude longitudinale	456 étude transversale dont 30 étude longitudinale	abeilles cadre + butineuses	Non
O	Italie (C, Alp, Med)	InfNc, InfDWVq, InfABPVq, InfCBPVq, Infvarq	Nc, <i>Varroa</i> , DWV, ABPV, BQCV	Observationnel	Cohorte	01/2011-12/2013	région (province)	Non	Non	23			

P **	Allemagne NE (C)	MH, MS, Couvain plâtré clinique	<i>Ascosphe</i> apis, <i>Varroa</i> , Na, Nc, Virus	Observationnel	Cohorte	10/2004-05/2010	saison, année, IVarroa, Inc, INa	prevcol(AI), modèle logistique CB=f(Inf_var_saison, inf_nosema_saison, année_propriétaire)	Oui	22	120	Adultescadre, larves	Non utilisés
Q	Belgique (Atl)	MH, Asy	<i>Varroa</i> , Nc, Na, <i>Crithidia</i> , Virus	Observationnel	Transversale	07/2011	Non	MH= modèle linéaire mixte prévalence Asy ; Chi2 association entre AI	oui	170	363	abeilles de planche d'envol	non
R **	Allemagne entière (Atl, C, Alp)	MH, Asy, Quotient affaiblissement hivernal	<i>Varroa</i> , N. spp., 5 virus, LA	Observationnel	Cohorte	10/2004-05/2008	taille population, exposition cultures intensives, résidus pesticides	Kruskall-Wallis		112-123	596-1924 (selon les AI)	Adultes cadre, pain d'abeilles	Oui Nb de cadres d'abeilles couverts
S	Suisse (C, Alp)	AsyLE	LE	Observationnel	« Cas-Témoins »	NA	présence de LE clinique dans la région, distance à une colonie malade de LE	Chi2	Sans objet	13	80	Adultes de cadre + adultes de planche d'envol	non

Le spectre des agents infectieux visés par les études est très variable selon l'objectif. Peu d'entre elles sont à proprement parler des études observationnelles de prévalence ponctuelle ou de suivi pluriannuel (« cross-sectional studies » ou « cohort monitoring ») (Antunez *et al.* 2012; Gisder *et al.* 2010; Hedtke *et al.* 2011; Martín-Hernández *et al.* 2012; Mouret *et al.* 2013; Ravoet *et al.* 2013)<sup>18</sup>. Ont été incluses une étude expérimentale (Dainat *et al.*, 2012) et des observations ponctuelles dans une zone (Berényi *et al.* 2006; Forsgren *et al.* 2005; Lindström et Fries 2005), car elles apportaient une information sur le portage dans les colonies asymptomatiques au voisinage de colonies malades.

Dans les colonies asymptomatiques ont été détectés :

- *Varroa destructor*, acarien identifiable facilement, sans confusion possible, mais avec des méthodes de détection plus ou moins sensibles ;
- les agents de la loque européenne et de la loque américaine, souvent détectés lorsque des méthodes moléculaires sont utilisées, mais difficilement détectables avec les méthodes microbiologiques de référence de l'OIE. Celles-ci ont pour objectif de mettre en évidence les spores ou les bactéries en culture pure. Elles sont peu sensibles en l'absence de signes cliniques (larves filantes ou écailleuses) (Forsgren *et al.* 2005; Lindström et Fries 2005). Par exemple, dans les études de cohortes allemandes (Genersch *et al.* 2010; Hedtke *et al.* 2011), aucun des deux agents n'a été détecté avec les méthodes du manuel de Standards de l'OIE pendant cinq ans ;
- *Nosema ceranae* et *Nosema apis* : la méthode du comptage de spores donne une indication quantitative mais ne permet pas de distinguer ces deux espèces. Il existe une méthode PCR spécifique pour chaque espèce ;
- les virus DWV, ABPV, IAPV, KBV, SBV, CBPV, BQCV, VdV1 et d'autres récemment découverts. Certains de ces virus sont génétiquement proches, par exemple au sein du complexe AKI (ABPV + IAPV + KBV) (de Miranda *et al.* 2010). Les méthodes PCR utilisées doivent permettre de discriminer les espèces pour que les chiffres de prévalence soient fiables (Gauthier *et al.* 2007). Certaines méthodes PCR donnent des résultats de charge virale quantitatifs, d'autres ne permettent que de mesurer la présence ou l'absence du virus (cf. paragraphe 3.1.1.2.2). Il est à noter que la plupart de ces virus ont un fort pouvoir évolutif, et que des génotypes émergents (Maori *et al.* 2007a) peuvent ne plus être détectables s'ils ont évolué. On trouve fréquemment plusieurs virus simultanément dans un même rucher, une colonie, voire un individu.

Ravoet *et al.* (2013) trouvent de nombreuses coinfections, toutes classes d'agents infectieux confondues, mais des associations significatives seulement entre *Nosema ceranae* et *Varroa destructor*, ainsi que *Crithidia mellificae*. *C. mellificae* est un trypanosome connu depuis assez longtemps, mais peu incriminé dans des épisodes pathologiques jusqu'à présent.

### 3.1.1.3.2 Fréquence dans les ruchers et les colonies. Aspects saisonniers et géographiques

L'unité épidémiologique pour les études de prévalence peut être le rucher (groupe) ou la colonie.

Dans plusieurs études, la dépendance entre colonies et ruchers n'est pas indiquée, c'est-à-dire que les résultats publiés pour les colonies ne sont pas conditionnés au statut d'infection du rucher, ou à l'inverse il manque le taux de colonies infectées par rucher (par exemple Genersch *et al.* (2010)). On ne dispose donc pas de l'information d'agrégation des colonies positives, ce qui engendre un fort risque de biais statistique pour la prévalence à l'échelle des colonies.

Parmi les 17 publications analysées, seul le dispositif espagnol d'échantillonnage (utilisé pour des études de prévalence de virus et de *Nosema spp.*) présente un tirage au sort des unités épidémiologiques, nécessaire pour une inférence sur le taux de prévalence asymptomatique réel (avec un intervalle de confiance) (Antunez *et al.* 2012; Martín-Hernández *et al.* 2012). Dans cette dernière étude, une corrélation a pu être montrée entre les prévalences de *Nosema ceranae*,

<sup>18</sup> Et Rete Rurale Nazionale <http://www.reterurale.it/flex/cm/pages/ServeBLOB.php/L/IT/IDPagina/1092>



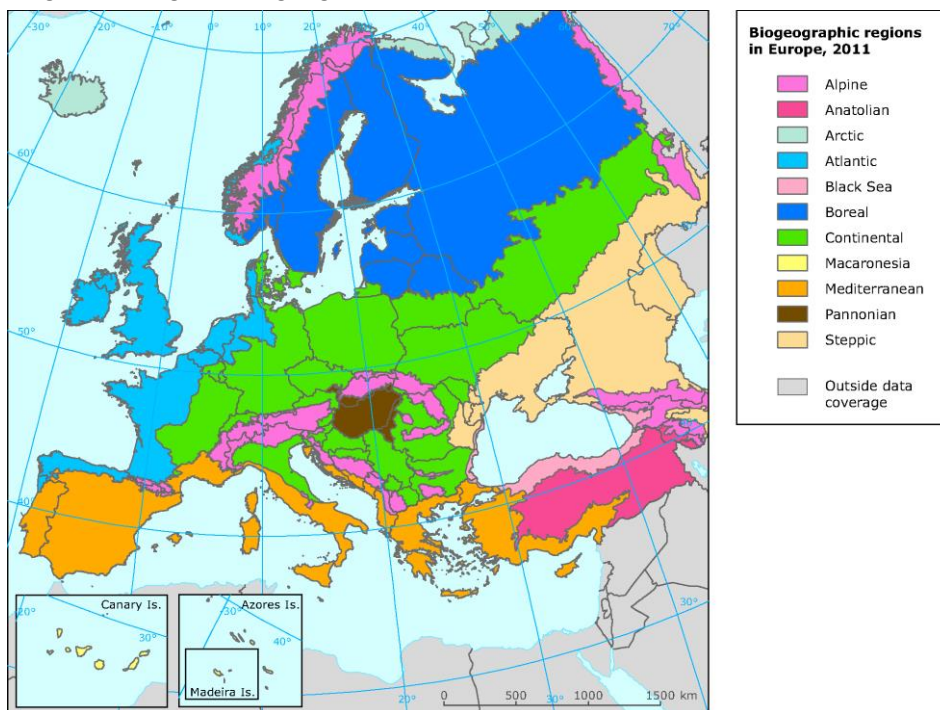
*Nosema apis* et les variables « unité bioclimatique », « saison » et « année ». Les résultats laissent à penser que *Nosema apis* est plus fréquemment présent en climat plus froid et contrasté l'hiver. Sa prévalence est saisonnière (avec un pic au printemps), contrairement à *Nosema ceranae* qui est présent toute l'année. Ceci est cohérent avec les connaissances sur la biologie de cet agent infectieux et avec le suivi pluriannuel dans le nord-est de l'Allemagne, sur une cohorte de colonies non randomisée (Gisder *et al.* 2010). Cependant, en Espagne, une seule colonie par rucher a été analysée, ce qui engendre un risque d'erreur par défaut, c'est-à-dire une sous-estimation du taux de détection des ruchers atteints. Ceci pourrait également expliquer en partie la faible prévalence du DWV en Espagne par rapport aux autres pays européens où ce virus est pratiquement omniprésent. L'information sur la présence concomitante de *Varroa* n'est pas disponible, alors qu'il est connu que *Varroa* non seulement facilite la transmission du DWV, mais lui sert d'hôte et amplifie sa dynamique de population. On remarque que dans l'étude du nord-est de l'Allemagne, où la prévalence de DWV est inférieure à 30 %, il existe une bonne observance des traitements acaricides à l'automne et un taux d'infestation par *Varroa* relativement faible (Hedtke *et al.* 2011).

La variable « région géographique » reflète à la fois les caractéristiques bioclimatiques de la zone et la structure socioéconomique, notamment la densité de ruchers et les usages agricoles. Ainsi, il est attendu que les prévalences varient selon le contexte bioclimatique et les ressources.

Les dispositifs de suivi pluriannuels allemand et italien sont des cohortes stratifiées représentatives de la diversité géographique et démographique apicole de chaque pays (Genersch *et al.* 2010)<sup>19</sup>.

Dans le **Tableau 3**, la région administrative de chaque étude est assortie de la région biogéographique définie pour le continent européen (**Figure 2**) (source : <http://www.eea.europa.eu/data-and-maps/data/biogeographical-regions-europe-1> consulté le 20/02/2015), ce qui permet d'associer à chaque étude, le contexte bioclimatique correspondant. L'étude espagnole montre qu'une discrimination biogéographique plus fine peut être nécessaire, avec des sous-classes, ou des variables d'altitude et de contraste saisonnier (Martín-Hernández *et al.* 2012).

**Figure 2 : Régions biogéographiques transfrontalières dans l'Union Européenne**



<sup>19</sup> Et Rete Rurale Nazionale <http://www.reterurale.it/flex/cm/pages/ServeBLOB.php/L/IT/IDPagina/1092>

**En conclusion**, ces études n'éclairent que partiellement la connaissance du « paysage infectieux et parasitaire normal » des colonies d'abeilles dans les différents pays européens. Les chiffres pour un même agent infectieux ne sont pas comparables, en raison d'une grande disparité des protocoles et de variables associées manquantes. Le projet Epilobee, mené dans 17 pays de l'Union européenne, a permis néanmoins une standardisation des méthodes et des variables associées. Son objectif premier est d'estimer la prévalence de mortalités en prenant en compte le facteur saison et l'historique d'infection de l'année précédente. Il ne prend pas en compte l'exposition aux pesticides, cependant son caractère randomisé assure *a minima* une représentativité de l'exposition à des facteurs autres que biologiques. Pour cette étude, il conviendra d'être vigilant dans l'interprétation des résultats des variables géographiques par rapport à d'éventuels effets confondants entre le contexte bioclimatique et les pratiques agricoles.

Il est important de souligner la nécessité de validation des outils d'identification, de détection et de quantification des agents biologiques pouvant impacter la santé des colonies selon les normes en vigueur (ISO, AFNOR), ainsi que la nécessité d'harmonisation des méthodes selon les référentiels en vigueur (exemple : OIE). La validation et l'harmonisation des diagnostics permettent de conduire la surveillance avec des outils adaptés, dont la sensibilité, la spécificité et la reproductibilité ainsi que les limites de détection et de quantification sont connues et dont l'utilisation est harmonisée entre les laboratoires de références afin de conduire des études avec des résultats comparables.

#### 3.1.1.3.3 Aspects quantitatifs de charge infectieuse ou parasitaire en absence de signes cliniques

Les études les plus récentes cherchent, au-delà de la détection des agents infectieux, à quantifier la charge infectieuse et ses variations temporelles.

Différentes techniques d'analyse permettent d'obtenir des données quantitatives de charge infectieuse ou parasitaire. Il est pourtant difficile de comparer les valeurs quantitatives d'une étude à l'autre, en raison de nombreuses différences dans les seuils de détection ou le type d'échantillon utilisé :

- le dénombrement direct : pour *Varroa*, Chauzat *et al.* (2010), Hedtke *et al.* (2011) et Genersch *et al.* (2010) dénombrent les acariens phorétiques<sup>20</sup>, *i.e.* attachés au corps d'abeilles adultes, en ramenant éventuellement leur nombre à 100. Dainat *et al.* (2012b) et Ravoet *et al.* (2013) comptent des *Varroa* tombés au fond de la ruche, avec ou sans traitement acaricide, de façon journalière ou hebdomadaire ;
- le comptage de spores : pour les organismes formant des spores, *i.e.* *P. larvae*, *N. ceranae* et *N. apis*, le dénombrement de ces spores se fait selon les méthodes éprouvées de l'OIE. Pour les *Nosema*, la méthode ne permet pas de discriminer *N. ceranae* et *N. apis*, les résultats sont donc indiqués comme *Nosema* spp. (Rivière *et al.* 2013). Il est à noter que l'étude de Berényi *et al.* (2006) mentionne *N. apis* dans ses résultats obtenus par cette méthode, alors qu'il n'y a pas eu de sous-typage ultérieur ;
- PCR quantitative : pour tous les organismes, la PCR quantitative, qRT-PCR ou qPCR est possible si on dispose d'un marqueur génétique spécifique. Elle est mise en œuvre dans les études de Mouret *et al.* (2013), Dainat *et al.* (2012b), Gauthier *et al.* (2007), Berényi *et al.* (2006) pour les virus (pas de sous-typage de *Nosema* par méthode moléculaire) et Beenet 2011-2013 sur les virus, les *Nosema*, *P. larvae* et *M. plutonius*. Le seuil de détection est normalement plus bas que celui de la PCR directe et que le dénombrement de spores pour *Nosema*. Cependant, parfois la qPCR n'est réalisée que sur les prélèvements qui étaient positifs au dénombrement de spores (Gisder *et al.* 2010). La sensibilité de la méthode (nombre d'échantillons porteurs détectés positifs) est dans ce cas limitée par celle du dénombrement de spores, car les échantillons faiblement infectés ne sont pas soumis à l'analyse par la méthode la plus sensible.

<sup>20</sup> *Varroa* fixé sur une abeille adulte

En l'absence d'harmonisation des techniques et méthodes de détection et de quantification, les données de qPCR ne sont pas comparables d'une étude à l'autre, même quand une calibration interne de la méthode a été mise en œuvre. Celle-ci ne permet en effet que la comparabilité de résultats au sein d'un même protocole, car de nombreux paramètres internes au laboratoire jouent sur la sensibilité de la détection. Ce point peut être résolu par la mise en place de méthodes harmonisées au travers d'essais inter laboratoires – EIL- (de validation, EILV et d'aptitude, EILA). Actuellement, cette harmonisation n'en est qu'à ses débuts avec la nomination en 2011 du Laboratoire de Référence de l'Union européenne pour la santé de l'abeille dont l'une des missions principales est le développement, la validation et l'harmonisation de diagnostics utilisés au sein des laboratoires nationaux de référence (LNR) notamment. Cependant, au sein d'une même étude, ces outils permettent d'observer en particulier les variations saisonnières des charges infectieuses ou la prédominance d'un agent sur l'autre en cas de coinfection. Dans le cas du DWV, Dainat *et al.* (2012b) mettent ainsi en évidence une dynamique saisonnière croissante du printemps à l'automne, qui fait suite à un pic dans la population de *Varroa* en été. Ceci est lié au fait que la transmission de ce virus est facilitée par *Varroa*, vecteur et hôte compétent pour le DWV (de Miranda et Genersch 2010; Sumpter et Martin 2004). Ces derniers auteurs ont étudié par modélisation la dynamique saisonnière comparée entre le DWV, qui se multiplie chez le vecteur *Varroa*, et l'ABPV, transmis par *Varroa* mais qui ne s'y multiplie pas. Le différentiel quantitatif trouvé par Gauthier *et al.* (2007) pour ces deux virus et leurs variations saisonnières sont cohérents avec ce modèle de dynamique.

Parmi les virus, les charges virales rapportées, qui vont de  $10$  à  $10^{12}$  copies par abeille, sont à prendre comme un ordre de grandeur et une mesure relative, au sein d'une même étude. Le virus DWV est rapporté comme le plus abondant dans toutes les études, pour les raisons avancées ci-dessus. Il est à noter que Francis *et al.* (2013a) rapportent sur des reines des niveaux similaires de titres viraux pour le DWV et les virus du complexe AKI.

En Italie, il existe un monitoring mis en œuvre de façon représentative sur tout le territoire. Ce suivi de colonies d'abeilles a été initié en 2009 par le projet Apenet auquel a succédé, en 2011, Beenet<sup>21</sup>. Il vise à étudier les interactions entre abeilles et environnement et à suivre les mortalités et pertes de colonies en Italie. En 2012, il a concerné 303 ruchers (97 en 2011) répartis sur l'ensemble du territoire détenant environ 3 000 colonies. Chaque unité de monitoring inclut cinq ruchers de 10 ruches chacun, suivis par un référent apicole. Durant l'année, quatre visites sont effectuées dans les ruchers : (1) en fin d'hiver, (2) au printemps-été, (3) en fin d'été-début d'automne et (4) avant hivernage. Chaque visite comprend l'examen des paramètres suivants : santé de la colonie, alimentation, nombre d'abeilles et de couvain, âge de la reine, climat, le contexte paysager. Au cours des 1<sup>ère</sup> et 3<sup>ème</sup> visites, des échantillons de pain d'abeilles et des abeilles vivantes sont prélevés et font l'objet de recherche de pesticides, d'agents infectieux (*Nosema*, virus et, lors de la troisième visite, *Varroa*), et d'analyses nutritionnelles (protéines brutes dans le pain d'abeille). Ces données sont ensuite collectées et analysées. Ce suivi donne des résultats cohérents avec les données sur *Varroa* et le DWV, au printemps et à l'automne.

On peut illustrer la difficulté de comparer les résultats de dénombrement entre les études par l'agent de la loque européenne, *M. plutonius* (cf. paragraphe 3.1.1.2.1.2). Cet agent est très difficile à détecter par des méthodes bactériologiques classiques, même sur des colonies malades, car il est abondant chez les larves malades essentiellement, et ce de façon passagère (Forsgren *et al.* 2010). Le portage asymptomatique à l'échelle de la colonie a été démontré par Forsgren *et al.* (2005) avec une méthode de PCR semi-nichée<sup>22</sup> non quantitative, sur des échantillons de larves. Cet auteur a trouvé trois colonies asymptomatiques positives avec cette méthode parmi 72 (4%), avec un seuil de détection estimé à 100 bactéries/mL dans les larves et dans le miel. Il est à noter que les colonies en question appartenaient toutes à un rucher ayant connu des cas

<sup>21</sup> <http://www.reterurale.it/flex/cm/pages/ServeBLOB.php/L/IT/IDPagina/1092>

<sup>22</sup> La PCR semi-nichée est une variante de PCR où le produit issu de la première PCR est amplifié à l'aide d'un couple d'amorces dont l'une s'hybride à une partie interne de l'ADN, l'autre étant l'une des deux amorces utilisées au cours de la première PCR

cliniques de loque européenne. Sur des colonies asymptomatiques, hors contexte de cas cliniques, Mouret *et al.* (2013) détectent par qPCR une gamme de concentration allant de 0 à  $10^6$  copies par abeille, dans 26 % de 90 colonies, réparties dans 76 % des 18 ruchers asymptomatiques suivis. Bien qu'il s'agisse de deux régions biogéographiques différentes (Suède vs France), il est probable que la plus forte prévalence observée ici soit due à une meilleure sensibilité de la méthode de qPCR, mise en œuvre sur des abeilles de cadre. Celles-ci, particulièrement celles qui nettoient le couvain, sont susceptibles d'être contaminées par contact avec des larves dans lesquelles la bactérie est présente. Un échantillon d'ouvrières est donc une sorte de témoin du statut infectieux de la colonie pour *M. plutonius*. En Suisse, Belloy *et al.* (2007) ont comparé la proportion de colonies asymptomatiques positives entre des ruchers de zone d'enzootie et dans des zones où aucun symptôme de loque européenne n'avait été observé. En zone d'enzootie, ils ont trouvé 91 % (10/12) de colonies asymptomatiques porteuses de *M. plutonius* à moins de 10 mètres de colonies avec des signes cliniques, et 31 % (10/32) à une distance supérieure à 500 m. En zone où aucun signe clinique n'avait été observé, aucune colonie positive n'a été détectée (parmi 16 appartenant à 2 ruchers différents). Par conséquent, l'image de répartition donnée par la qPCR est probablement plus juste, bien qu'elle confirme que le portage asymptomatique pour cet agent-là est d'assez faible ampleur.

Au vu de ces connaissances et de la situation de la Suisse et la Grande-Bretagne (Belloy *et al.* 2007; Haynes *et al.* 2013; Roetschi *et al.* 2008), on peut considérer que l'absence de détection de *M. plutonius* pendant cinq ans dans l'étude de monitoring allemande (Genersch *et al.* 2010) est attribuable au manque de sensibilité de la méthode utilisée : détection bactériologique sur abeilles de cadres ou pain d'abeilles.

Au bilan, ces travaux concordent sur le fait que :

- le portage de titres viraux importants est fréquent pour DWV en automne ;
- des charges plus faibles sont détectées pour le virus ABPV au printemps et en été ;
- le portage varie peu en quantité au cours de l'année pour *Nosema ceranae* dans une proportion importante de colonies.

#### 3.1.1.3.4 Caractère prédictif du portage pour des troubles ultérieurs, en particulier la mortalité hivernale

La plupart des études passées en revue ci-dessus avaient pour objectif de mettre en rapport le statut d'infection par un ou des agents infectieux avec la survenue de troubles ultérieurs, surtout la mortalité hivernale (Berényi *et al.* 2006; Chauzat *et al.* 2010; Dainat *et al.* 2012b; Genersch *et al.* 2010; Gisder *et al.* 2010; Hedtke *et al.* 2011; Mouret *et al.* 2013; Ravoet *et al.* 2013). Les dispositifs d'étude et les méthodes statistiques utilisés pour mettre en évidence des corrélations entre portage et mortalités ultérieures sont assez variés, mais reposent bien souvent sur des modèles linéaires. Seuls Mouret *et al.* (2013), Chauzat *et al.* (2010), Dainat *et al.* (2012b) et Genersch *et al.* (2010) ont mesuré des variables de force des colonies, pour mettre en évidence d'éventuels effets subcliniques de ces infections.

Dix de ces études concordent sur l'omniprésence de coinfections (Antunez *et al.* 2012; Berényi *et al.* 2006; Chauzat *et al.* 2010; Chauzat *et al.* 2007; Dainat *et al.* 2012b; Gisder *et al.* 2010; Hedtke *et al.* 2011; Martín-Hernández *et al.* 2012; Mouret *et al.* 2013; Ravoet *et al.* 2013).

Les plus récentes cherchent à mettre en évidence des « interactions » entre agents infectieux dans la survenue de mortalités, *i.e.* des corrélations statistiques plus marquées entre certains agents infectieux (par exemple Ravoet *et al.* (2013)) (ces résultats n'excluent pas des interactions avec des substances chimiques qui seraient présentes dans l'environnement des abeilles testées). Ceci suggère un effet synergique entre agents infectieux. Il faut cependant toujours garder à l'esprit que l'abondance simultanée de deux agents infectieux peut être liée à un facteur confondant commun, en particulier une baisse d'immunité ou des troubles du comportement hygiénique. Ainsi, Dainat *et al.* (2012b) restent très prudents sur le caractère causal de l'infection par DWV ou *Nosema* dans la survenue de troubles, et rapportent uniquement de fortes charges infectieuses.

Des travaux expérimentaux cherchent aujourd'hui à mettre en évidence le ou les mécanismes qui conduisent de ces états de portage à des survies hivernales moindres. vanDooremalen *et al.* (2013) ont montré qu'un fort parasitisme par *Varroa* en été avait un impact sur la durée de vie des abeilles d'hiver.

Aux Etats-Unis, une approche plus intégrée a été utilisée dans des travaux récents, reposant sur le concept d'équilibre microbien de la colonie (Anderson *et al.* 2011). Des études s'intéressent aux interactions entre microorganismes dans leur ensemble au sein de la colonie (Cornman *et al.* 2012b; Evans et Schwarz 2011; Runckel *et al.* 2011). De nouvelles techniques de séquençage à haut-débit sont utilisées dans ces études pour décrire les infections multiples et les abondances relatives des organismes dans le microbiome. Par ces méthodes, les auteurs mettent également en évidence des coinfections, qui semblent être la règle, des variations saisonnières, ainsi que des glissements dans les populations de la flore commensale associés aux troubles cliniques. Ces techniques, bien qu'onéreuses, sont prometteuses car elles combinent des informations quantitatives et populationnelles qui pourront être mises en relation avec des facteurs environnementaux influençant l'état de la colonie. Ces approches ouvrent également la porte à des études mécanistiques sur les interactions, voire sur le dialogue moléculaire qui existe entre les différents compartiments du microbiome, et les abeilles de la colonie. Il s'agit de techniques de pointe non utilisables en routine à l'heure actuelle. Le microbiote intestinal est de mieux en mieux décrit mais les effets de stress (pesticide, malnutrition, pathogènes) sur ce dernier ne sont pas connus.

### 3.1.2 Facteurs chimiques

Les substances chimiques auxquelles peuvent être exposées les colonies d'abeilles sont très diverses et ne peuvent être recensées de manière exhaustive. Certaines de ces molécules peuvent avoir une toxicité chez l'abeille, à des doses élevées, sur un mode généralement aigu, mais également, à des doses sublétales. Dans ce cas, les effets sont plus discrets et difficiles à mettre en évidence. Des méthodes ont été mises au point afin de mettre en évidence ces effets, notamment à faible dose.

Après avoir décrit les principales méthodes de mise en évidence d'effets toxiques au niveau individuel chez les abeilles, des facteurs chimiques seront listés : il s'agit de facteurs d'intérêt au regard des interactions, compte tenu des connaissances actuelles. Il convient de préciser que l'ordre de présentation de ces facteurs chimiques ne résulte pas d'une hiérarchisation en importance ou en impacts.

#### 3.1.2.1 Méthodes de mise en évidence d'effets toxiques au niveau individuel chez les abeilles

##### 3.1.2.1.1 Tests neuronaux et comportementaux

Aucune méthode d'évaluation des effets neuronaux ou comportementaux d'agents chimiques n'étant validée au niveau international, des scientifiques ont cherché à mettre au point de telles méthodes, afin de proposer des tests utilisables en routine et qui pourraient être validés au niveau international.

Un test a, en particulier, fait l'objet de nombreuses publications : **le réflexe d'extension du proboscis** (abrégé en français REP et en anglais PER - Proboscis extension reflex). Le proboscis (ou « trompe » ou « langue ») est un appendice buccal (d'une longueur d'environ 6 mm) qui peut se replier sous la bouche, dans une cavité, et se déployer, en particulier pour récolter le nectar des fleurs. Le proboscis se déploie par réflexe quand un stimulus gustatif (eau ou sucre) touche les antennes (organes sensoriels de la gustation et de l'olfaction). L'utilisation expérimentale de ce réflexe permet d'évaluer d'éventuelles modifications de certaines capacités du système nerveux central de l'abeille, en particulier les capacités :

- de perception gustative des abeilles (par exemple, la perception de l'eau ou d'une solution sucrée) ;

- de discrimination des odeurs ;
- d'apprentissage associatif et de mémorisation, lorsqu'il est associé à un stimulus conditionnel, olfactif ou tactile :
  - i. dans l'apprentissage olfactif, une odeur qui représente le stimulus conditionnel (SC) est dirigée vers les antennes de l'abeille pendant X secondes. Y secondes après le début de la stimulation olfactive, les antennes sont touchées avec une solution sucrée (stimulus inconditionnel, SI) qui induit l'extension du proboscis. Après plusieurs associations des stimulations olfactives et gustatives, l'abeille répond à l'odeur seule par l'extension du proboscis, ce qui constitue la réponse conditionnée ;
  - ii. dans l'apprentissage tactile, un objet est approché d'une des antennes (SC) et l'abeille l'explore pendant quelques secondes ; la stimulation gustative (eau sucrée, SI) est appliquée au niveau du proboscis. Ce protocole permet de dissocier la voie du stimulus inconditionnel de la voie du stimulus conditionnel.

Dans ces deux apprentissages, l'extension du proboscis est récompensée par le fait que l'abeille peut prélever avec son proboscis quelques microlitres d'eau sucrée.

L'utilisation du PER lors de tests d'apprentissage permet de tester plusieurs paramètres, tels que :

- les capacités de mémorisation des abeilles, à court et à long termes ;
- des paramètres liés à l'apprentissage (habituation, récupération ou généralisation).

L'utilisation du test PER permet d'étudier les effets de plusieurs types d'exposition des abeilles aux pesticides : aiguë (avant, pendant ou après le conditionnement) ou chronique.

En fonction des résultats obtenus sur les capacités d'apprentissage ou de perception, l'utilisation du test PER permet d'évaluer, d'une manière plus globale, les effets des pesticides sur le fonctionnement du système nerveux central des abeilles.

**Le test du labyrinthe en T** a été proposé par Han *et al.* (2010) pour étudier les capacités d'apprentissage visuel chez l'abeille. C'est une version simplifiée du test en labyrinthe précédemment décrit (Zhang *et al.* 1996). Il est constitué par un tube d'entrée de 20 cm de long, duquel partent deux bras de 12 cm de long ; le diamètre des tubes est de 1,6 cm. Les deux bras sont de couleurs différentes, bleu et jaune, pour réaliser l'apprentissage visuel. La version plus complexe de labyrinthe développée par Zhang *et al.* (1996) peut également être utilisée à des fins écotoxicologiques. Il est constitué de 20 boîtes cubiques identiques, dont chaque face de 30 cm est percée en son centre par un trou de 4 cm de diamètre dans lequel les abeilles passent. Après avoir été conditionnées à un repère visuel, les butineuses doivent parcourir en vol un trajet à travers le labyrinthe en suivant ce repère pour atteindre un nourrisseur à sirop. Les performances d'orientation de butineuses exposées à un pesticide sont comparées à celles de butineuses non exposées (Decourtye *et al.* 2009).

#### 3.1.2.1.2 Tests de motricité

L'activité locomotrice des abeilles peut être évaluée dans une enceinte verticale vitrée. On peut ensuite mesurer des paramètres comme la distance parcourue, le temps passé en immobilité et le niveau vertical atteint.

#### 3.1.2.1.3 Tests physiologiques

Il existe différents tests physiologiques permettant de suivre notamment la durée de vie, le développement des glandes hypopharyngiennes, le rythme respiratoire, la production de phéromones, la production de chaleur et l'expression de voies de détoxification, immunitaires, et de développement (au niveau moléculaire ou enzymatique). Le test larvaire en conditions *in vitro* permet d'évaluer les effets létaux et sublétaux à court et moyen terme de tout facteur de stress tout en assurant un contrôle total de l'exposition à ce facteur ainsi que des conditions environnementales de développement.

#### 3.1.2.1.4 Tests moléculaires

Des analyses transcriptomiques et protéomiques (Di Prisco *et al.* 2013) peuvent être réalisées pour permettre d'identifier notamment les fonctions physiologiques des abeilles affectées ou non par les molécules et caractériser des marqueurs moléculaires (Aufauvre *et al.* 2014; Derecka *et al.* 2013).

#### 3.1.2.2 Insecticides

Les insecticides font partie des pesticides. Certains co-formulants ne sont pas considérés comme des matières actives pesticides mais peuvent avoir un fort effet sur l'action des matières actives qu'ils accompagnent, notamment en augmentant leur biodisponibilité (*cf.* paragraphe 4.1.3.2.1). Ils peuvent aussi avoir une toxicité pour les abeilles à eux seuls. Zhu *et al.* (2014) ont montré que le N-méthyl-2-pyrrolidone (NMP), qui est un co-formulant usuel d'insecticides (*e.g.* néonicotinoïdes) ou de fongicides et est présent dans les cires (parties par million), avait une forte toxicité pour les larves d'abeilles (50 % de mortalité en 4 jours à 0,01 % de NMP). Ceci remet en questionnement le classement de certains co-formulants comme molécules dites « inertes ».

En fonction de leur cible, les pesticides sont classés en insecticides, acaricides, fongicides, herbicides. Ils comprennent par ailleurs plusieurs familles chimiques, dont plusieurs présentent un intérêt particulier dans le cadre du présent travail : les insecticides néonicotinoïdes, pyréthrianoïdes, organophosphorés, carbamates, les fongicides triazoles et carboxines.

##### 3.1.2.2.1 Insecticides néonicotinoïdes et fipronil et leurs effets sublétaux

Les néonicotinoïdes sont des insecticides systémiques neurotoxiques, qui interagissent avec les récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine présents dans le système nerveux des insectes.

Plusieurs insecticides néonicotinoïdes sont actuellement sur le marché mondial où ils représentent environ un tiers des insecticides utilisés (Casida et Durkin 2013; Simon-Delso *et al.* 2015). Ce sont l'imidaclopride, le thiaméthoxam, la clothianidine, le thiaclopride, le dinotéfurane, l'acétamipride, le nitenpyrame et le sulfoxaflure. A lui seul, l'imidaclopride représente 41 % du marché des néonicotinoïdes et la deuxième molécule phytosanitaire la plus utilisée dans le monde (Jeschke *et al.* 2011; Pollack 2011).

Dans l'Union européenne, le règlement d'exécution (UE) n° 485/2013 de la Commission du 24 mai 2013 a limité l'utilisation professionnelle de la clothianidine, du thiaméthoxam et de l'imidaclopride et a interdit la vente de semences traitées avec ces substances ainsi que les utilisations non-professionnelles. Les restrictions d'usage portent sur le traitement des semences ainsi que les traitements au sol et foliaire, et concernent, plus de 75 cultures différentes dont, outre le colza et le maïs, des cultures fruitières jugées attractives pour les abeilles. Ces restrictions font suite à une réévaluation de ces substances par l'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA) (EFSA 2013a; EFSA 2013b; EFSA 2013c), réévaluations décidées du fait des lacunes dans les méthodes d'évaluation utilisées jusqu'à présent, telles qu'elles ont été relevées dans un avis récent de l'EFSA (EFSA 2012a). Ont été évalués les risques associés à leur utilisation comme traitement des semences ou sous forme de granules, surtout les effets aigus et chroniques sur la survie et le développement des colonies d'abeilles, sur les larves et le comportement des abeilles, ainsi que sur les risques associés à des doses sublétales. Les trois principales voies d'exposition ont été considérées : nectar et pollen, poussières émises par les graines enrobées au moment de l'ensemencement et gouttelettes d'eau produites par les plantes traitées. Certaines réévaluations n'ont pu être finalisées par manque de données disponibles. Les réévaluations finalisées ont permis de conclure, pour les trois substances que (1) pour l'exposition au pollen et au nectar, seule l'utilisation de ces substances sur les cultures n'attirant pas les abeilles présentait un faible risque, (2) un risque pour les abeilles exposées à la poussière a été signalé ou n'a pas pu être exclu (à l'exception des betteraves sucrières, des cultures sous serres et de l'utilisation de certains granules), et (3) le risque de l'exposition des abeilles à des gouttelettes de guttation n'avait pu être évalué que pour le thiaméthoxam, avec un effet aigu sur les abeilles.

De nombreux travaux ont été réalisés depuis les années 90 pour analyser les effets des néonicotinoïdes sur les abeilles. Plusieurs synthèses bibliographiques ont été publiées récemment (Blacquièrre *et al.* 2012; Casida et Durkin 2013; Cresswell 2011; Decourtye et Devillers 2010; Godfray *et al.* 2014; Goulson 2013; Hopwood *et al.* 2012; van der Sluijs *et al.* 2013).

Très récemment, l'ensemble des données disponibles dans la littérature scientifique sur les néonicotinoïdes et le fipronil a fait l'objet d'une évaluation intégrée et mondiale en regard des impacts sur la biodiversité et en particulier sur les invertébrés (Pisa *et al.* 2015). Cette évaluation qui est une méta-analyse, a considéré également les métabolites des néonicotinoïdes (Simon-Delso *et al.* 2015). Elle a aussi repris toutes les données d'exposition publiées pour les divers milieux de l'environnement ou constituant les DARs (Draft Assessment Report). Plus particulièrement, l'ensemble des données concernant les pollens et les nectars ont fait l'objet d'une analyse détaillée (Bonmatin *et al.* 2015). Les abeilles et les bourdons ont été l'objet d'une attention particulière du fait de la richesse qualitative et quantitative des études disponibles. La conclusion des auteurs de cette méta-analyse va clairement dans le sens d'impacts directs et majeurs des néonicotinoïdes et du fipronil pour les pollinisateurs (van der Sluijs *et al.* 2015). En effet, selon les auteurs, la méta-analyse fait apparaître le cumul de quatre caractéristiques principales pour ces insecticides neurotoxiques : leur très haute toxicité aiguë, sublétales et par exposition chronique, leur large biodisponibilité en conditions réelles par le pollen et le nectar, leur longue persistance dans les milieux (sols, eaux, plantes) et leur usage très intensif et prophylactique, notamment pour les cultures nectarifères et pollinifères. Une autre voie d'exposition majeure a également été confirmée pour les pollinisateurs, *via* l'émission de poussières lors des semis de semences enrobées. ([www.tfsp.info](http://www.tfsp.info), voir infographie).

Les résultats des expérimentations sont présentés ci-dessous chronologiquement et selon l'ordre suivant : l'insecticide analysé (imidaclopride, thiaméthoxam, clothianidine, et acétamipride), et la catégorie de test réalisé (en laboratoire, sous tunnel et en plein champ).

### 3.1.2.2.1.1 Imidaclopride

L'imidaclopride est un insecticide de toxicité élevée pour l'abeille, avec une DL50 orale de 0,0037 µg/abeille et une DL50 contact de 0,081 µg/abeille. Il est à remarquer que l'imidaclopride représente l'archétype des molécules de la famille des néonicotinoïdes. Ce neurotoxique a été le plus étudié de sa famille (puisque le premier mis sur le marché) et de nombreux résultats de recherche sur l'imidaclopride sont potentiellement transposables aux autres néonicotinoïdes. Les contaminations moyennes par l'imidaclopride dans les pollens (ou dans les pains d'abeilles) issus de plantes traitées vont de 1 à 39 µg/kg selon les études, les cultures et les modes d'application. Ces contaminations moyennes vont de 1 à 73 µg/kg en ce qui concerne les nectars ou les miels (Bonmatin *et al.* 2015).

Les effets de cet insecticide ont été analysés en détail par différents comités d'experts français et européen. Au niveau français, les ministères de l'agriculture et de l'écologie ont conjointement mis en place le Comité scientifique et technique de l'étude multifactorielle des troubles des abeilles (CST) en 2001. Le CST a analysé 245 rapports d'études ou documents associés fournis par la direction générale de l'alimentation du ministère de l'agriculture (DGAL). Il a analysé également 93 documents issus de la littérature scientifique et technique à partir d'une analyse bibliographique exhaustive qui a rassemblé l'ensemble des données de toxicologie des abeilles et les données concernant les troubles comportementaux relatifs à l'utilisation d'imidaclopride aux différentes étapes de la vie de l'abeille. Ont été également prises en compte les données de terrain rapportées par les apiculteurs appartenant au groupe d'experts ou auditionnés pendant cette étude, ainsi que les données fournies par le fabricant de l'imidaclopride. Le CST a publié son rapport final en 2003 (<http://agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/rapportfin.pdf>).

L'originalité du travail des experts du CST, par rapport à la méthode classique d'évaluation des dossiers qui était alors appliquée, est que les experts ont défini des critères de validation des études, ce qui les a conduits à écarter les études présentant des insuffisances scientifiques ou techniques. Par ailleurs, ce travail a permis de mettre en évidence un besoin d'amélioration des techniques de dosage, des données de toxicité de la molécule et des métabolites sur différentes



catégories d'abeilles, ainsi qu'un manque de standardisation des protocoles de mesure sur le terrain.

La conclusion du rapport était la suivante : « *Dans l'état actuel de nos connaissances, selon les scénarios développés pour évaluer l'exposition et selon les facteurs d'incertitude choisis pour évaluer les dangers, les rapports PEC/PNEC<sup>23</sup> obtenus sont préoccupants. Ils sont en accord avec les observations de terrain rapportées par de nombreux apiculteurs en zones de grande culture (maïs, tournesol), concernant la mortalité des butineuses (scénario 4), leur disparition, leurs troubles comportementaux et certaines mortalités d'hiver (scénario 5). En conséquence, l'enrobage de semences de tournesol Gaucho® conduit à un risque significatif pour les abeilles de différents âges, à l'exception des butineuses lorsqu'elles ingèrent du pollen lors de la confection de pelotes (scénario 3). En ce qui concerne l'enrobage Gaucho® de semences de maïs, le rapport PEC/PNEC s'avère, comme pour le tournesol, préoccupant dans le cadre de la consommation de pollen par les nourrices, ce qui pourrait entraîner une mortalité accrue de celles-ci et être un des éléments de l'explication de l'affaiblissement des populations d'abeilles encore observé malgré l'interdiction du Gaucho® sur tournesol* ». Cette étude a, par ailleurs, recommandé d'étendre l'analyse à d'autres facteurs impliqués dans les pertes d'abeilles, comme les maladies, les pratiques apicoles et agricoles, les variétés génétiques pour les plantes cultivées et traitées, l'influence des terpènes, etc.

### 3.1.2.2.1.1 Expérimentations en laboratoire

Des expérimentations en laboratoire ont porté à la fois sur des évaluations de la durée de vie des abeilles et sur l'analyse des effets comportementaux et physiologiques.

- **Effets sur la durée de vie**

L'imidaclopride peut affecter la durée de vie des abeilles qui y sont exposées soit de manière aiguë, à la suite d'une exposition unique qui entraîne la mort de l'insecte au bout de quelques heures ou quelques jours, soit à la suite d'une exposition orale répétée (« chronique »). Lors d'une telle exposition, l'abeille est exposée à l'insecticide pendant une période de plusieurs jours, et meurt prématurément par rapport à sa durée de vie attendue.

Dans le cadre de ce rapport qui traite des interactions, il paraît logique de ne s'intéresser qu'à l'exposition chronique à l'insecticide, qui, pendant une certaine période peut se combiner à la présence d'autres facteurs, tels que des agents infectieux par exemple, pour altérer les fonctions de l'abeille. Toutefois, il est important de signaler que des abeilles peuvent également être exposées ponctuellement (exposition unique) à cet insecticide, alors qu'elles sont déjà soumises à une forte pression d'agents infectieux. Si la dose à laquelle elles sont exposées est proche de la DL50 (toxicité aiguë), il est alors possible que l'action combinée des agents infectieux et de l'insecticide induise une mortalité à une valeur d'exposition plus basse que celle de la DL50 moyenne.

Une étude de la toxicité chronique a été réalisée en nourrissant des abeilles âgées d'environ 3 semaines avec une solution sucrée contenant 0,1, 1 et 10 µg/L d'imidaclopride et de ses métabolites pendant une durée de 10 jours (Suchail *et al.* 2001). Le taux de 50 % de mortalité a été atteint entre le 7<sup>ème</sup> et le 10<sup>ème</sup> jour en fonction des concentrations, et correspond à une exposition de 0,01 ; 0,1 et 1 ng/abeille (soit teneurs de 0,1, 1 et 10 µg/kg, en prenant une abeille = 0,1 g). Ces doses sont 30 à 3 000 (pour le dérivé oléfinique), 60 à 6 000 (pour l'imidaclopride), et 200 à 20 000 (pour le 5-OH-imidaclopride) fois inférieures à celles requises pour produire le même effet en intoxication aiguë. Il est important de signaler que la mortalité des abeilles n'a commencé que 72 h après l'intoxication. Notons qu'un des métabolites systématiques : l'acide 6-chloro-nicotinique a présenté également une toxicité très élevée. Des effets similaires ont récemment été confirmés quant à la mortalité induite par l'exposition chronique de la drosophile à l'imidaclopride (Charpentier *et al.* 2014a). Les auteurs ont également montré que les fonctions de reproduction

---

<sup>23</sup> PEC = Predicted Environmental Concentration ; PNEC = Predicted No Effect Concentration

(accouplement et fécondité) étaient significativement affectées à des concentrations sept ordres de grandeur en dessous de la CL50 aiguë.

Dechaume Montcharmont *et al.* (2003) ont mesuré la durée de vie d'abeilles encagées depuis l'émergence et exposées à de l'imidaclopride. Celle-ci était significativement inférieure à celle des abeilles contrôles, soit de 28 jours et de 31 jours, respectivement pour les traitements avec l'imidaclopride à 4 µg/L et 8 µg/L de solution sucrée (équivalent, respectivement, à une consommation de 0,08 et 0,16 ng/jour).

Decourtye *et al.* (2003) ont trouvé des doses létales plus élevées que celles trouvées par les auteurs précédents, chez des abeilles d'hiver (LOEC = 24 µg/kg) et chez des abeilles d'été (LOEC = 8 µg/kg).

En réponse à la publication de Suchail *et al.* (2001) qui montre une très forte toxicité chronique par voie alimentaire de l'imidaclopride et de ses métabolites, la société Bayer a fait réaliser quatre études (Schmuck 2004). Ces études n'ont cependant pas porté sur l'imidaclopride, mais sur ses métabolites urée et acide 6-chloronicotinique uniquement (CST 2003)<sup>24</sup>. Elles n'ont montré aucune augmentation anormale de mortalité après ingestion alimentaire de ces métabolites. Lors de son analyse des rapports de ces 4 études, le CST a analysé l'ensemble des études et a conclu que « les études demandées par la société Bayer nous permettent seulement de conclure à une NOEC validée supérieure à 10 µg/kg ».

Dans une étude consacrée aux interactions entre la microsporidie *Nosema ceranae* et l'imidaclopride, Alaux *et al.* (2010a) ont analysé la toxicité chronique de l'imidaclopride par voie alimentaire (0,7 µg/kg, 7 µg/kg et 70 µg/kg) pendant 10 jours et ont montré que l'exposition à l'imidaclopride entraînait un taux de mortalité supérieure à celui des témoins au bout de 10 jours pour toutes les concentrations testées. Les résultats concernant les interactions entre *Nosema* et l'imidaclopride sont présentés dans le paragraphe 4.1.2.3.

En utilisant les données récentes d'analyse de résidus dans le pollen et le nectar ou le miel, et celles de la toxicité des pesticides, Sanchez-Bayo et Goka (2014) ont réalisé une nouvelle approche des risques des pesticides sur les abeilles en prenant en compte les effets d'accumulation en fonction du temps. Ces auteurs ont évalué le temps mis pour atteindre la DL50 (toxicité aiguë). Concernant l'exposition par contact, ils montrent que trois néonicotinoïdes, l'imidaclopride, le thiaméthoxam et la clothianidine entraînent un risque élevé avec le pollen contaminé. Concernant l'exposition par ingestion avec du pollen et du nectar contaminé, ces deux premiers néonicotinoïdes présentent également un risque élevé.

En utilisant les données de toxicité de l'imidaclopride sur abeilles issues de la littérature, Rondeau *et al.* (2014) ont utilisé le modèle toxicologique dérivé de la loi de Haber et qui prend en compte l'évolution de la toxicité du pesticide en fonction du temps. Ils montrent que les études de toxicité aiguë actuelles (qui ne durent que deux jours, voire quatre dans certains cas), et même les études dites chroniques (qui ne durent que dix jours) sont trop courtes pour caractériser d'éventuels effets sur la survie des abeilles au-delà de ces périodes. Or, la durée de vie des abeilles est d'environ 30 jours en été et 150 jours en hiver. En extrapolant les résultats de leur modèle, les auteurs suggèrent que des abeilles d'hiver qui consommeraient du miel contenant une teneur en imidaclopride de 0,25 µg/kg pourraient mourir avant la fin de l'hivernage et la reprise de l'activité de la colonie. Les auteurs proposent que les tests de toxicité réglementaires soient d'au moins 30 jours, et proposent d'utiliser des courbes temps/effets afin d'établir précisément l'évolution de la toxicité de l'insecticide dans le temps.

#### • Effets neuronaux et comportementaux

L'imidaclopride, comme les principaux néonicotinoïdes, interagit avec les récepteurs nicotiques de l'acétylcholine. Il agit de manière agoniste de ce neuromédiateur, en mimant son action sur la membrane post-synaptique (van der Sluijs *et al.* 2013). Le système nerveux de l'abeille est particulièrement riche en synapses cholinergiques, en particulier, le cerveau (Bicker 1999). De nombreux travaux ont analysé les effets éventuels de doses sublétales d'imidaclopride sur le

<sup>24</sup> CST 2003 p. 48

fonctionnement du système nerveux des abeilles et sur certains de leurs comportements (voir aussi la synthèse de Belzunces *et al.* (2012)).

✓ Effets neuronaux

Palmer *et al.* (2013) ont montré, par des enregistrements électro-physiologiques, que les troubles du comportement et de l'apprentissage provoqués par l'imidaclopride pourraient être dus à son action sur le fonctionnement des cellules des corps pédonculés (cellules de Kenyon). Ces cellules, qui représentent 40% des cellules du cerveau de l'abeille, sont le lieu d'intégration des informations multi-sensorielles qui parviennent au cerveau, ainsi que des processus d'apprentissage et de mémoire. De plus, les auteurs ont montré que l'exposition cumulée à plusieurs pesticides cholinergiques, tels que la clothianidine et le coumaphos, entraînait une neurotoxicité accrue.

✓ Effets sur l'apprentissage et le conditionnement

▪ Le test d'extension du proboscis

L'exposition par contact des abeilles à des doses sublétales d'imidaclopride (0,1, 1 et 10 ng/abeille) modifie le nombre d'essais nécessaires pour obtenir l'habituation de la réponse des abeilles de 7 et 8 jours à des stimulations sucrées (Guez *et al.* 2001).

L'exposition par contact aux doses de 5, 10, and 20 ng/abeille entraîne une augmentation du seuil gustatif, défini comme la plus basse concentration d'une solution sucrée déclenchant le PER. La dose de 1,25 ng/abeille n'a pas d'effet sur la fonction gustative, mais a un effet facilitateur sur l'habituation (Lambin *et al.* 2001). L'exposition orale (0,21 ou 2,16 ng/abeille) à l'imidaclopride augmente de manière temporaire (une heure après le traitement) le seuil de réponse au saccharose (Eiri et Nieh 2012).

L'exposition orale à des doses sublétales d'imidaclopride conduit à une diminution des capacités d'apprentissage olfactif. La plus faible dose induisant un effet sublétal (LOEC) est de 12 µg/kg pour les abeilles d'été et de 48 µg/kg pour les abeilles d'hiver (Decourtye *et al.* 2003). L'exposition orale chronique des abeilles pendant 7 jours à du pollen contaminé avec de l'imidaclopride à une dose sublétale de 48 µg/kg entraîne une diminution des capacités d'apprentissage olfactif (Han *et al.* 2010).

L'exposition sublétale de larves d'abeille par de l'imidaclopride (0,04 ng/larve) affecte leurs capacités d'apprentissage lorsqu'elles sont devenues adultes (Yang *et al.* 2012).

Decourtye *et al.* (2004a) ont administré de l'imidaclopride par voie orale (12 ng/abeille) 15 min ou 1 h après un conditionnement. Ils ont montré que l'imidaclopride altérait la formation de la mémoire à moyen terme par l'intermédiaire des cellules des corps pédonculés du cerveau, qui sont les centres d'intégration multi-modalités, l'apprentissage, et la formation et la récupération de la mémoire. Ces résultats confirment que l'imidaclopride provoque des effets comportementaux variables chez l'abeille en fonction de la dose et du type d'apprentissage, associatif tel que le conditionnement olfactif réalisé, ou non-associatif tel que l'habituation.

Decourtye *et al.* (2004b) ont étudié les effets sublétaux de l'imidaclopride par voie orale (solution sucrée à 24 µg/kg), à la fois en conditions de laboratoire et en cage de vol. L'imidaclopride a entraîné une diminution de l'activité de butinage de la source de nourriture et de l'activité à l'entrée de la ruche. Par ailleurs, des effets négatifs de l'imidaclopride ont été observés lors d'un test de discrimination olfactive (PER).

Williamson et Wright (2013) ont exposé par voie orale des abeilles à des solutions sublétales d'imidaclopride (100 nM et 10 nM). Au cours de la même expérience, ils ont également exposé des abeilles au coumaphos (organophosphoré) et à une combinaison des deux composés. En utilisant la méthode du PER, ils ont confirmé que ces composés, utilisés séparément ou en association, affectaient les performances d'apprentissage des abeilles ainsi que la formation de la mémoire, l'imidaclopride affectant principalement la mémoire à long terme et le coumaphos la mémoire à court terme.

- *Le test du labyrinthe en T*

L'exposition orale chronique des abeilles pendant 7 jours à du pollen contaminé avec de l'imidaclopride à la dose sublétales de 48 µg/kg entraîne une diminution des capacités d'apprentissage visuel (Han *et al.* 2010).

- *Conclusion des deux tests*

Les principaux résultats obtenus montrent des modifications des capacités d'apprentissage olfactif et visuel, de l'habituation, et du seuil de réponse au saccharose. Plus globalement, ces résultats montrent que le système nerveux des abeilles ouvrières est affecté par une exposition sublétales à l'imidaclopride, ce qui est cohérent avec le fait que la cible de imidaclopride, les récepteurs à l'acétylcholine, sont très abondants dans le cerveau de l'abeille ouvrière.

- ✓ Activité locomotrice

L'activité motrice d'abeilles exposées par contact (thorax) aux doses de 1,25, 2,5, 5, 10 et 20 ng/abeille d'imidaclopride a été évaluée dans une enceinte verticale vitrée (30 x 30 x 4 cm). Les paramètres mesurés étaient la distance parcourue, le temps passé en immobilité et le niveau vertical atteint (Lambin *et al.* 2001). L'activité locomotrice est diminuée à toutes les doses testées à l'exception de la dose de 1,25 ng/abeille, où elle est accrue (Lambin *et al.* 2001). Ces résultats ont été confirmés par Teeters *et al.* (2012), qui ont montré que l'administration orale d'imidaclopride aux doses de 0,05, 0,5, 5,0, 50, et 500 µg/kg a entraîné un effet inhibiteur sur la locomotion aux doses les plus élevées, et un effet stimulateur aux doses les plus basses.

- **Effets physiologiques**

- ✓ Glandes hypopharyngiennes

Les abeilles ouvrières ont une fonction de nourrices au cours des 10-12 premiers jours de leur vie. Pendant cette période, leurs glandes hypopharyngiennes (GHP) sont bien développées et produisent des sécrétions pour la nourriture des larves. Compte tenu de l'importance de cette fonction pour le développement de la colonie, plusieurs travaux ont porté sur l'analyse des effets éventuels de doses sublétales d'imidaclopride par voie orale sur le développement de ces glandes. Leurs résultats sont convergents. Ainsi, Smodiš Škerl et Gregorc (2010) ont exposé des abeilles d'âges différents pendant des durées variant de un à trois jours, et ont montré une diminution de la taille des acini (lobes des GHP), dès une durée d'exposition d'une seule journée. Heylen *et al.* (2011) ont exposé des abeilles âgées de 7 jours pendant une seule journée, et ont également montré une diminution de la taille des acini. Enfin, Hatjina *et al.* (2013) ont exposé des abeilles avec du pollen et une solution de sucres contaminés en continu pendant 14 jours. Ils ont confirmé une réduction de la taille des acini, qui se maintient jusqu'à la fin de l'expérience.

- ✓ Rythme respiratoire

Au cours de la même expérimentation, Hatjina *et al.* (2013) ont analysé le rythme respiratoire des abeilles exposées oralement à des doses sublétales d'imidaclopride, et ont montré que celui-ci était significativement affecté.

- ✓ Phéromones

Dussaubat *et al.* (2010) ont analysé les effets de l'imidaclopride sur la production d'oléate d'éthyle, un composé phéromonal d'ouvrière d'abeilles. Les abeilles ont été exposées pendant 10 jours, à raison de 10 h par jour, à une solution de sucres contenant 7 µg/kg d'imidaclopride. Aucun effet n'a été montré.

- ✓ Métabolisme de l'abeille

Nicodemo *et al.* (2014) ont montré que l'imidaclopride (25 à 100 µM) est un inhibiteur de la production d'ATP (adénosine-5'-triphosphate) par les mitochondries qui sont des organites impliqués dans le métabolisme cellulaire. L'ATP est le composé qui apporte de l'énergie à l'ensemble des cellules, et la diminution de sa production pourrait, en particulier, entraîner des effets négatifs sur les actes moteurs tels que le vol.

### 3.1.2.2.1.2 Expérimentations en tunnel : comportement de butinage

L'efficacité du comportement de butinage a été évaluée sur des petites colonies d'abeilles (2 300 abeilles) placées dans un tunnel (Colin *et al.* 2004). L'exposition orale à l'imidaclopride a été réalisée au moyen de nourrisseurs contenant une solution sucrée contaminée avec de l'imidaclopride à 6 µg/kg (concentration 70 fois inférieure à celle de la DL50, selon les informations qui étaient disponibles en 2003). L'imidaclopride entraîne une diminution de la proportion des abeilles actives et impacte donc l'efficacité du comportement de butinage.

Dans une expérience réalisée dans une cage de vol (où les abeilles sont libres de voler), des colonies (10 000 abeilles) ont été exposées à des solutions sucrées contenant une concentration d'imidaclopride à 48 µg/kg. A cette concentration, l'imidaclopride entraîne une diminution de l'activité de butinage et de la quantité de solution sucrée récoltée (Ramirez-Romero *et al.* 2005). Les auteurs précisent que la concentration testée est 16 fois plus élevée que celle retrouvée dans le pollen de tournesol, par exemple, et qu'il conviendrait de tester des concentrations inférieures à 48 µg/kg.

Précédemment, en employant le même dispositif, une diminution de l'activité de butinage sur un nourrisseur a été enregistré à l'aide de compteurs électroniques après la contamination du sirop à l'imidaclopride à la concentration de 24 µg/kg (Decourtye *et al.* 2004b).

### 3.1.2.2.1.3 Expérimentations en plein champ

#### • Effets sur le couvain

Des solutions d'imidaclopride aux concentrations de 0,1, 6, 50, 500, 1 000, 1 500 et 2 000 mg/L ont été déposées une fois par jour dans des cellules contenant des larves (Yang *et al.* 2012). Les larves ont donc été exposées à la fois oralement et par contact. Les rayons de couvain ont été replacés dans leurs colonies où les larves ont été élevées par les abeilles nourrices. L'exposition a été renouvelée au cours de 4 jours consécutifs, et les doses totales d'exposition ont été de 0,4, 24, 200, 2 000, 4 000, 6 000 et 8 000 ng/larve. Le taux d'operculation des cellules contenant les larves a été significativement réduit à partir de la dose de 24 ng/larve, ce qui signifie que les abeilles nourrices ont extrait des cellules les larves mortes ou en mauvaise condition. Derecka *et al.* (2013) ont analysé les effets de faibles doses d'imidaclopride (2 mg/L) sur le développement et la physiologie larvaires dans des colonies placées en plein champ. Ils ont montré que le niveau d'expression de 300 gènes était modifié chez les larves, soit dans le sens d'une réduction (pour 195 gènes) ou d'une augmentation (pour 105 gènes).

#### • Effets comportementaux

##### ✓ Comportement de butinage

L'étude des effets de l'imidaclopride sur le butinage des abeilles a, principalement, porté sur l'intervalle de temps entre deux visites à un site alimentaire et leur taux de retour à la ruche.

Yang *et al.* (2008) ont dressé des abeilles (marquées avec des points de couleurs) à visiter un site alimentaire placé à une distance de 35 m de leur ruche, et ont testé les effets de différentes concentrations sublétales d'imidaclopride. L'intervalle de temps entre deux visites est augmenté à partir de la concentration de 50 µg/l.

Bortolotti *et al.* (2003) ont testé les effets de 3 concentrations d'imidaclopride dans une solution sucrée (à 100 µg/l, 500 µg/l et 1 000 µg/l) sur la capacité de retour à la ruche des abeilles (marquées avec des nombres de couleurs) depuis une distance de 500 m. Les abeilles qui ont été nourries avec la solution à 100 µg/l retournent à la ruche, mais ne recommencent à butiner la solution sucrée qu'au bout de 24 h. Les abeilles nourries avec les solutions à 500 et 1 000 µg/l n'ont pas été retrouvées par la suite. Il est à noter que le protocole utilisé ne permet pas de savoir quelle est la quantité d'imidaclopride qui a été réellement consommée par la butineuse (pour lui fournir de l'énergie) et à laquelle elle a donc été exposée, puisqu'elle rapporte à la ruche une partie de la solution récoltée.

Une méthode automatisée de suivi de l'activité des abeilles butineuses au moyen de radiofréquences (RFID) a été mise au point chez le bourdon par Streit *et al.* (2003) et chez l'abeille

par Decourtye *et al.* (2011b). Utilisant cette technique, Schneider *et al.* (2012) ont montré que des abeilles soumises à une exposition aiguë (solution sucrée contaminée) à des doses sublétales d'imidaclopride (0,15 à 6 ng/abeille) présentent une réduction significative de l'activité de butinage à partir de la dose de 1,5 ng/abeille.

Une autre méthode de suivi des abeilles lors de leur retour à la ruche a été utilisée par Fischer *et al.* (2014), le radar harmonique. Ces auteurs ont testé les effets de trois néonicotinoïdes, l'imidaclopride (7,5 ng/abeille, ou 11,25 ng/abeille), la clothianidine (2,5 ng/abeille) et le thiaclopride (1,25 µg/abeille) sur les capacités d'orientation et de navigation des abeilles. Après avoir ingéré une solution sucrée contenant un des néonicotinoïdes, l'abeille munie d'un transpondeur est relâchée et suivie par le radar qui permet de décrire précisément son itinéraire de retour à la ruche. Les principaux résultats ont montré que le taux de retour à la ruche était réduit pour les trois néonicotinoïdes par rapport aux témoins. Les auteurs concluent que ces doses bloquent la récupération de la mémoire de la navigation ou altèrent cette forme de mémoire. Ils reconnaissent toutefois que ces doses sont élevées et reflèteraient un *pire cas* par rapport à la dose prise par une abeille au cours d'un seul vol de butinage. Les doses utilisées pourraient plutôt correspondre à ce que la butineuse prend de façon cumulée au cours d'une quinzaine de vols de butinage.

#### ✓ Communication par les danses

Eiri et Nieh (2012) ont testé les effets de doses sublétales d'imidaclopride sur des abeilles visitant un site alimentaire placé à 1,5 m de l'entrée de la colonie et contenant une solution sucrée. Les butineuses qui ingèrent de l'imidaclopride à la dose de 0,21 ng/abeille produisent significativement moins de danses de recrutement 24 h après le traitement. A long terme cette réduction des danses peut affecter la force de la colonie en réduisant la quantité de miel récoltée.

### 3.1.2.2.1.2 Thiaméthoxam

Le thiaméthoxam est un insecticide de toxicité élevée pour l'abeille, avec une DL50 orale de 0,005 µg/abeille et une DL50 contact de 0,024 µg/abeille. Les contaminations moyennes mesurées dans les pollens (ou pain d'abeille) issus de plantes traitées par le thiaméthoxam vont de 1,7 à 122 µg/kg selon les études, les cultures, les modes d'application et si on inclut son métabolite clothianidine. Ces contaminations moyennes vont de 0,6 à 9,9 µg/kg en ce qui concerne les nectars ou les miels (Bonmatin *et al.* 2015).

#### 3.1.2.2.1.2.1 Expérimentations en laboratoire

##### • Effets comportementaux

Après une exposition aiguë des abeilles par voie orale au thiaméthoxam aux doses de 0,1 , 0,5 et 1 ng/abeille, aucun effet n'a été observé sur l'activité locomotrice, la sensibilité au saccharose et l'apprentissage olfactif (El Hassani *et al.* 2008).

Après une exposition chronique par contact à des doses sublétales de thiaméthoxam (1 et 0,1 ng/abeille) pendant 11 jours, les abeilles ont été testées par le test du PER (Aliouane *et al.* 2009). Elles ont présenté une diminution significative de la mémoire olfactive (à 0,1 ng/abeille) et une diminution significative des performances d'apprentissage, sans effet sur la mémoire (à 1 ng/abeille). De plus, la réponse à des stimulations antennaires par du saccharose a été significativement diminuée pour des concentrations élevées (1 ng/abeille).

##### • Effets physiologiques : activité enzymatique

L'activité de certains enzymes, carboxylestérases (CaE1, CaE2, CaE3), glutathion-S-transférase (GST), catalase (CAT) et alcaline phosphatase (ALP) est modifiée après une exposition par contact sur le thorax à des doses sublétales de thiaméthoxam, 5,12 ng/abeille (DL50/10) et 2,56 ng/abeille (DL50/20) (Badiou-Bénéteau *et al.* 2012).

### 3.1.2.2.1.2 Expérimentations en plein champ

- **Comportement de butinage**

Des abeilles ont été soumises à une exposition aiguë à des doses sublétales de thiaméthoxam et ont été suivies par la technique RFID. Des mortalités importantes d'abeilles ont été constatées dues au fait qu'une partie d'entre elles ne parviennent pas à retourner à leur colonie (Henry *et al.* 2012). La suite de ce travail a montré une influence notable des conditions météorologiques et de la complexité paysagère sur la sensibilité des abeilles à l'insecticide (Henry *et al.* 2014). Le thiaméthoxam induit un risque moyen de non-retour à la ruche augmentant de 3 % à 26 % lorsque les conditions météorologiques deviennent défavorables. Ce taux de disparition lié à l'insecticide est en outre modulé par l'environnement paysager, atteignant 35 % dans les paysages bocagers contre 18 % dans les paysages ouverts, de structure moins complexe.

- **Effets à long terme sur les colonies**

Pilling *et al.* (2013) ont conduit une étude en plein champ d'une durée de 4 ans sur le thiaméthoxam. Des colonies ont été exposées à des champs de maïs et de colza d'une superficie de 2 ha. Les colonies disposaient de nourriture de réserve en abondance (15 à 20 rayons de nourriture). Les champs témoins et traités étaient distants de 2 km. Les auteurs n'ont montré aucune différence entre les colonies des champs contrôles et traités pour les paramètres suivants : mortalité des abeilles, comportement de butinage, force des colonies, poids des colonies, développement du couvain et quantité de nourriture stockée, l'hivernage et l'état de santé général des colonies.

Toutefois, les conditions expérimentales choisies, en particulier l'exposition des abeilles à des champs de 2 hectares seulement, sont différentes des conditions rencontrées par les colonies en zone de grandes cultures, où les floraisons simultanées ou successives d'un grand nombre de champs de colza ou de maïs pendant plusieurs semaines (voire plus d'un mois) les exposent à des quantités de résidus de pesticides plus importantes. Il n'est donc pas démontré que les abeilles aient été significativement exposées par rapport aux conditions habituelles du terrain. Par ailleurs, aucune analyse statistique n'est fournie dans ce travail.

#### 3.1.2.2.1.3 Clothianidine

La clothianidine est un insecticide de toxicité élevée pour l'abeille, avec une DL50 orale de 0,00379 µg/abeille et une DL50 contact de 0,0275 µg/abeille. Les contaminations moyennes dans les pollens (ou pain d'abeille) issus de plantes traitées par la clothianidine vont de 1,8 à 9,4 µg/kg selon les études, les cultures et les modes d'application. Ces contaminations moyennes vont de 1,9 à 89 µg/kg en ce qui concerne les nectars ou les miels (Bonmatin *et al.* 2015).

##### 3.1.2.2.1.3.1 Expérimentations en laboratoire

- **Effets neuronaux**

Palmer *et al.* (2013) ont montré que la clothianidine provoquait les mêmes effets que l'imidaclopride sur les cellules des centres supérieurs du cerveau de l'abeille (cf. « effets neuronaux » de l'imidaclopride).

- **Effets sur l'immunité**

Di Prisco *et al.* (2013) ont montré que la clothianidine (et l'imidaclopride) module négativement le facteur de transcription NF-κB qui est impliqué dans l'immunité, et affectent ainsi les défenses antivirales des abeilles. Ces néonicotinoïdes favorisent ainsi la réplication du DWV. Ces résultats soulèvent la question de la présence de circuits nerveux contrôlant l'immunité chez les insectes, comme il en existe chez les mammifères. Ce résultat démontre le lien étroit entre les divers facteurs de co-exposition, dans un sens de cause (néonicotinoïde) à effet (virus) bien déterminé.

##### 3.1.2.2.1.3.2 Expérimentations en plein champ : comportement de butinage

Des abeilles ont été soumises à une exposition aiguë à des doses sublétales de clothianidine (0,05-2 ng/abeille) et ont été suivies par la technique RFID. La clothianidine entraîne une

diminution significative de l'activité de butinage et une augmentation de la durée des vols de butinage à partir de la dose de 0,5 ng/abeille pendant les trois premières heures après le traitement (Schneider *et al.* 2012).

Une autre publication a également porté sur l'influence de doses sublétales de clothianidine sur les vols de retour à la ruche (Fischer *et al.* 2014). Ses résultats sont mentionnés dans la partie relative à l'imidaclopride (cf. « comportement de butinage »).

#### 3.1.2.2.1.4 Acétamipride

La DL50 orale est de 14,53 µg/abeille ; la DL50 par contact est de 8,09 µg/abeille. Les contaminations moyennes dans les pollens (ou pain d'abeille) issus de plantes traitées par l'acétamipride vont de 3 à 59,3 µg/kg selon les études, les cultures et les modes d'application. Cette contamination moyenne est de 2,4 µg/kg tandis qu'un maximum est observé à 112,8 µg/kg en ce qui concerne les nectars ou les miels (Bonmatin *et al.* 2015), sachant que peu d'études sont disponibles.

#### Expérimentations en laboratoire

Après une exposition aiguë des abeilles par voie orale à l'acétamipride aux doses de 0,1, 0,5 et 1 µg/abeille, la sensibilité des abeilles après une stimulation antennaire au saccharose (test PER) est augmentée (à la dose de 1 µg/abeille). La mémoire à long terme d'un apprentissage olfactif est affectée par une dose de 0,1 µg/abeille (El Hassani *et al.* 2008). Après une application thoracique, l'acétamipride ne produit pas d'effet sur ces deux tests, mais augmente l'activité locomotrice (aux doses de 0,1 et 0,5 µg/abeille) et le réflexe d'extension du proboscis induit par une exposition antennaire à de l'eau (aux doses de 0,1, 0,5 et 1 µg/abeille).

Les effets de doses chroniques (pendant 11 jours) sublétales (0,1 et 1 µg/abeille) d'acétamipride ont été évalués pour trois fonctions différentes, l'activité locomotrice, la réactivité à l'eau et au saccharose et les capacités d'apprentissage (Aliouane *et al.* 2009). Le seul effet significatif observé dans le cas d'une administration orale de 0,1 µg/abeille d'acétamipride est une augmentation de la réponse à l'eau. A la dose la plus élevée (1 µg/abeille), l'acétamipride entraîne des effets limités sur les fonctions sensorielles, motrices et cognitives de l'abeille.

#### 3.1.2.2.1.5 Thiaclopride

La DL50 orale est de 17,32 µg/abeille ; la DL50 par contact est de 38,82 µg/abeille. Les contaminations moyennes dans les pollens (ou pain d'abeille) issus de plantes traitées par le thiaclopride vont de 10 à 187,6 µg/kg selon les études, les cultures et les modes d'application. Ces contaminations moyennes vont de 1,8 à 6,5 µg/kg en ce qui concerne les nectars ou les miels, sachant que peu d'études sont disponibles (Bonmatin *et al.* 2015).

#### Expérimentation en plein champ

Une publication a porté sur l'influence de doses sublétales de thiaclopride sur les vols de retour à la ruche (Fischer *et al.* 2014). Ses résultats sont mentionnés dans la partie relative à l'imidaclopride (cf. « comportement de butinage » de l'imidaclopride).

#### 3.1.2.2.1.6 Fipronil

Le fipronil est un insecticide systémique appartenant au groupe des pyrazoles. Il agit comme un inhibiteur réversible du récepteur au GABA et des canaux chlore activés par le glutamate.

Le fipronil présente une toxicité élevée pour les abeilles, avec une DL 50 orale de 0,00417 µg/abeille et une DL 50 par contact de 0,00593 µg/abeille.

Au niveau français, les ministères de l'agriculture et de l'écologie ont conjointement mis en place le Comité scientifique et technique de l'étude multifactorielle des troubles des abeilles (CST). Celui-ci a rendu un rapport en 2006<sup>25</sup>. La conclusion du rapport est la suivante : « *En conclusion, en l'état actuel de nos connaissances, selon les scénarios développés pour évaluer l'exposition et en*

<sup>25</sup> [http://agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/080218\\_rapport\\_fiproniljuillet2006.pdf](http://agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/080218_rapport_fiproniljuillet2006.pdf)



*appliquant les facteurs d'incertitude choisis pour évaluer les dangers, les rapports PEC/PNEC obtenus peuvent paraître préoccupants (tableau XXXI) et ne permettent pas d'exclure des risques inacceptables. »*

Le fipronil a aussi fait l'objet de la très récente méta-analyse mondiale citée précédemment (Bijleveld van Lexmond *et al.* 2015). En particulier, les contaminations moyennes du pollen ou pain d'abeille vont de 0,8 à 28,5 ng/g ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) selon les études, les cultures et les modes d'application. Ces moyennes vont de 1,2 à 70  $\mu\text{g}/\text{kg}$  pour les nectars ou miels (Bonmatin *et al.* 2015). Comme pour les néonicotinoïdes, les conclusions des auteurs de la méta-analyse vont dans le sens de risques et d'impacts importants pour les pollinisateurs (Bonmatin *et al.* 2007; van der Sluijs *et al.* 2015).

### 3.1.2.2.1.6.1 Expérimentations en laboratoire

- **Mortalité chronique**

Des abeilles ont été nourries pendant 14 jours (exposition chronique) avec une solution sucrée contenant du fipronil à des concentrations de 2,2 à 9  $\mu\text{g}/\text{L}$  (Decourtye *et al.* 2005). Ces doses ont entraîné une mortalité des abeilles. La concentration testée la plus basse provoquant cette mortalité (2,2  $\mu\text{g}/\text{L}$ ) correspond à une dose de 0,1 ng/abeille/jour (environ 60 fois plus basse que la DL50). Des abeilles ont été exposées pendant 11 jours, par oral et par contact, à deux doses de fipronil, 0,1 et 0,01 ng/abeille (Aliouane *et al.* 2009). La dose de 0,1 ng/abeille (par voie orale et par contact) entraîne la mortalité de toutes les abeilles une semaine après le début du traitement. La mortalité augmente significativement à partir du 3<sup>ème</sup> jour pour l'exposition orale et du 5<sup>ème</sup> jour pour l'exposition par contact. Pour la dose de 0,01 ng/abeille, la mortalité n'est pas significativement différente de celle des abeilles témoins.

- **Apprentissage, conditionnement**

Des abeilles ont été exposées, par voie orale et par contact, à des doses sublétales (0,1, 0,5 et 1 ng/abeille) de fipronil (El Hassani *et al.* 2005). La dose de 1 ng/abeille en application topique entraîne une diminution significative de la sensibilité au saccharose alors que l'exposition orale n'entraîne aucun effet. La dose de 0,5 ng/abeille en application topique perturbe l'apprentissage olfactif. L'activité locomotrice n'est pas affectée par ces doses de fipronil.

Des abeilles ont été nourries pendant 14 jours (exposition chronique) avec une solution sucrée contenant du fipronil à des concentrations de 2,2 à 9  $\mu\text{g}/\text{L}$  (Decourtye *et al.* 2005). Une diminution des performances d'apprentissage a été constatée chez les abeilles exposées au fipronil.

Des doses sublétales de fipronil ont été injectées à des abeilles (0,1 et 0,5 ng/abeille) qui ont ensuite été testées au moyen du PER (El Hassani *et al.* 2009). La dose de 0,1 ng/abeille n'affecte pas le processus d'apprentissage, mais diminue les performances de mémorisation. La dose de 0,5 ng/abeille a des effets inverses, puisqu'elle affecte le processus d'apprentissage et pas les performances de mémorisation. Ces résultats montrent que des doses sublétales de fipronil affectent les processus d'apprentissage et de mémorisation à travers de multiples cibles incluant des récepteurs au glutamate et au GABA.

Des abeilles ont été exposées pendant 11 jours, par oral et par contact, à deux doses de fipronil, 0,1 et 0,01 ng/abeille (Aliouane *et al.* 2009). A la dose de 0,01 ng/abeille, au moins un paramètre comportemental a été affecté. Un des résultats principaux est que le fipronil affecte la discrimination des odeurs (généralisation). A cette même dose, l'activité locomotrice est également diminuée.

L'exposition par contact d'une dose sublétale aiguë de fipronil (0,5 ng/abeille) affecte les processus d'apprentissage tactile et de mémorisation (test PER) (Bernadou *et al.* 2009).

- **Effets sur l'immunité**

Aufauvre *et al.* (2014) ont analysé la réponse moléculaire d'abeilles exposées à *Nosema ceranae* et au fipronil, séparément ou en association. Les principaux résultats de ce travail sont présentés dans le chapitre sur les interactions. Lors de cette expérimentation, les auteurs ont montré que le fipronil seul avait un impact sur l'expression de certains gènes et l'activité enzymatique des abeilles, en particulier liés à l'immunité.

- **Effets sur le métabolisme de l'abeille**

Nicodemo *et al.* (2014) ont montré que le fipronil (25 à 100  $\mu\text{M}$ ) est un inhibiteur de la production d'ATP (adénosine-5'-triphosphate) par les mitochondries, organites impliqués dans le métabolisme cellulaire.

### 3.1.2.2.1.6.2 Expérimentations en tunnel : comportement de butinage

L'étude de l'activité de butinage (colonie de 2 300 abeilles) a montré que le fipronil à la concentration de 2  $\mu\text{g}/\text{kg}$  entraîne une diminution de la proportion des abeilles actives (Colin *et al.* 2004). Au bout de 4 jours d'exposition au fipronil, les abeilles ne butinent plus (pas de prise de nourriture). Dans un travail postérieur utilisant la technique des RFID, Decourtye *et al.* (2011b) ont montré une réduction du nombre de vols de retour à la ruche après exposition orale et aiguë à 0,3 ng/abeille (et pas à 0,06 ng), qui dure 24 h après l'application. Le temps de retour entre le nourrisseur et la ruche est quant à lui augmenté par cette même dose durant 3 jours.

#### 3.1.2.2.2 Insecticides inhibiteurs de croissance (IGR)

Les IGR peuvent être classés en quatre grandes catégories :

- inhibiteurs de la synthèse de chitine
- analogues d'hormone juvénile
- agonistes d'hormone de mue
- antagonistes de l'ecdysone.

Leur mode d'action varie selon leur catégorie d'appartenance.

#### 3.1.2.2.2.1 Inhibiteurs de synthèse de chitine

Les inhibiteurs de synthèse de la chitine comptent une dizaine de molécules utilisées pour leur action larvicide, dont une, le diflubenzuron, a été plus particulièrement étudiée. Cette molécule de la famille des benzoyl urées est essentiellement un larvicide doué d'action ovicide par contact. Elle perturbe le dépôt de chitine dans la cuticule en provoquant des lésions graves du tissu endocuticulaire. Du fait de son mode d'action, le diflubenzuron est réputé comme n'ayant pas ou peu d'action chez les insectes adultes. Il est recommandé pour la lutte contre la sésamie en maïsiculture, le carpocapse en verger, et certains ravageurs de forêts tels que la chenille processionnaire ou le bombyx disparate. Selon le type de culture, sa concentration d'usage varie de 48 g/ha en forêt jusqu'à 125 g/ha en maïsiculture. Le diflubenzuron est soluble dans l'eau à 0,02 mg/l, soit environ 25 000 fois moins que l'imidaclopride.

Chez l'abeille domestique *Apis mellifera*, Chandel et Gupta (1992) ont observé une plus forte sensibilité des nymphes au diflubenzuron comparées aux larves de 3<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> stade. Ces expérimentations réalisées sur des colonies en plein champ révèlent qu'une application de 6 et 4  $\mu\text{g}$  de diflubenzuron par nymphe conduit, chez plus de la moitié des adultes, à des malformations diverses (excroissances à l'extrémité de l'abdomen, ailes atrophiées). Dans cette étude, la DL50 par contact sur des larves de 4<sup>ème</sup> stade est évaluée à 6,01 ng par individu, et seulement à 2,42 ng chez des larves de 3<sup>ème</sup> stade. Aucune action létale ou morphologique différée n'a été observée après un traitement larvaire, dans la mesure où la totalité des individus sont morts. Plus récemment, dans des conditions d'élevage larvaire en laboratoire, Aupinel *et al.* (2007b) ont déterminé une DL50 à 48 h de 175 ng/larve, après une exposition orale aiguë à l'âge de 4 jours. Dans les mêmes conditions expérimentales, une dose de 23 ng/larve suffit à induire une mortalité nymphale significative (supérieure à 50 % pour un témoin à 20 %). La dose sans effet n'a pas pu être déterminée dans cette expérience, dans la mesure où cette dose de 23 ng/larve constituait la plus petite dose testée.

Gupta et Chandel (1995) se sont intéressés aux effets du diflubenzuron sur des abeilles émergentes, en application topique et orale. Ces mêmes auteurs ont également observé les effets d'une exposition orale chez des butineuses capturées à l'entrée de la ruche. L'application de 100  $\mu\text{g}$  de diflubenzuron sur le thorax de jeunes ouvrières naissantes affecte l'évolution du poids des individus dès le deuxième jour qui suit le traitement. Cette diminution du poids est également observée chez les butineuses exposées oralement à 12,5  $\mu\text{g}$  de diflubenzuron par individu. Chez

les abeilles émergentes, une absorption de 50 µg de diflubenzuron perturbe le développement des glandes hypopharyngiennes.

Chez des colonies nourries avec 1 L d'une solution sucrée contenant 50 mg de diflubenzuron, Chandel et Gupta (1992) notent, dans les 10 jours qui suivent le traitement, une réduction du couvain et une augmentation du taux de ponte de la reine, sans que les provisions de miel et de pollen soient affectées. Sur un dispositif similaire, mais avec une concentration plus élevée de 300 mg/L de matière active, correspondant aux taux d'application maximum sur culture, Thompson *et al.* (2005) observent des effets comparables, à savoir une diminution du couvain et un taux de remplacement des œufs et des larves accru. Ces auteurs notent également une baisse de la population d'abeilles adultes, mais ne mentionnent pas d'effets à long terme, lors de la reprise d'activité après hivernage. Des études en verger d'orangers (Emmett et Archer 1980) traités aux concentrations de 0,11, 0,20 et 0,40 kg MA/L n'ont révélé aucun effet sur les colonies, en termes d'évolution de populations adulte et larvaire et de mortalité. Une pulvérisation directe sur 230 butineuses avec une solution de 0,40 g/L de diflubenzuron conduit aux mêmes conclusions. Il faut toutefois noter que ces derniers travaux ne permettent pas de contrôler l'exposition des abeilles à l'insecticide, et que la pulvérisation sur butineuses simule une exposition très ponctuelle sur quelques individus.

Parmi les autres inhibiteurs de la synthèse de chitine étudiés sur *Apis mellifera*, le penfluron présente des effets analogues à ceux produits par le diflubenzuron à des doses similaires, à savoir une DL50 d'environ 2 µg/larve de 3<sup>ème</sup> stade, 6 µg/larve de 4<sup>ème</sup> stade, et 3 µg/nympe (Chandel et Gupta 1992). On note également pour cette molécule la production d'adultes mal formés. En conditions de laboratoire, Rabea *et al.* (2010) ont montré que le chlorfluozuron est très peu toxique sur adultes, avec une DL50 de 2 526 mg/L, soit plus de 10 fois la concentration d'usage. Sur des colonies nourries avec 1 L de sirop contenant 0,25 et 2,5 g de triflumuron, Amir et Peveling (2004) ont montré une réduction significative de l'activité de vol, ainsi qu'une diminution du couvain operculé. Les colonies exposées à la plus forte concentration présentent des effets à long terme se traduisant par une forte mortalité hivernale.

Chez *Bombus terrestris*, le diflubenzuron produit des effets comparables à ceux observés chez *Apis mellifera*. Des essais sur microcolonies élevées en laboratoire ont montré que des expositions par contact, contamination de pollen ou de sirop produisent les mêmes effets aux concentrations maximales d'utilisation en plein champ, 288 mg MA/L, à savoir une élimination du couvain (Mommaerts *et al.* 2006). Ces effets, observables deux jours après l'exposition, se prolongent sur deux semaines. Chez des larves âgées de 1 à 4 jours, une exposition au flubenzuron induit une mortalité totale. Gretenkord et Drescher (1995) observent des effets analogues sur les larves âgées de 1 à 4 jours, et une plus forte tolérance chez des larves de 6 jours.

Dans leur étude, Mommaerts *et al.* (2006) ont également testé les effets de sept autres inhibiteurs de chitine : la buprofezine, la cyromazine, le flucyclozuron, le flufenoxuron, le lufenuron, le novaluron et le teflubenzuron. Les effets observés sont en général similaires à ceux produits par le flubenzuron, en affectant plus ou moins le couvain.

### 3.1.2.2.2 Analogues de l'hormone juvénile

- **Méthoprène**

Le méthoprène présente une structure chimique apparentée à celle de l'hormone juvénile III trouvée chez l'abeille. Sa DL50 orale ou de contact chez l'abeille adulte est supérieure à 1000 µg/abeille (Redfern et Knox 1974).

Sasagawa *et al.* (1989) ont étudié si le méthoprène, injecté ou en application topique, affectait le développement des *corpora allata*<sup>26</sup> (glandes synthétisant l'hormone juvénile) et des glandes hypopharyngiennes. Ils se sont intéressés également à ses effets potentiels sur l'activité α-glucosidase et le comportement des ouvrières. Le développement des *corpora allata*, qui a lieu

---

<sup>26</sup> Organes endocrines pairs de la tête, appartenant au système endocrine rétrocébral. Les *corpora allata* élaborent l'hormone juvénile qui maintient les caractères larvaires lors du développement post embryonnaire et qui stimule la vitellogenèse lors de la vie imaginaire

normalement durant les deux premières semaines chez les abeilles, a été inhibé par injection de méthoprène (0,1, 0,5, 1, 5 et 10 µg) dans l'huile (0,5 µl) dans chaque abeille. La plus faible dose (0,1 µg) a semblé stimuler le développement des glandes hypopharyngiennes (dont la taille a été légèrement supérieure à celle de contrôles), alors que les doses les plus fortes ont inhibé leur développement normal. Le pic d'activité de l' $\alpha$ -glucosidase dans la glande, normalement observé chez les vieilles butineuses, a été induit en une ou deux semaines par injection de 0,1 à 10 µg de méthoprène.

Les effets du méthoprène sur les comportements liés à l'âge ont été étudiés par Robinson (1987). Des ouvrières d'un jour ont été marquées individuellement avec des tags colorés et traitées par une solution de méthoprène appliquée sur l'abdomen (groupes de 50 abeilles traitées avec 25, 50, 100, 150, 200 et 250 µg de méthoprène dissous dans 5 µl d'acétone). Le méthoprène a induit une diminution significative et dose-dépendante de la fréquence des soins au couvain et à la reine dans tous les essais et à la plupart des âges. Le méthoprène a causé d'importantes diminutions dose-dépendantes de la fréquence des comportements d'entretien du nid. Les abeilles traitées avec les doses les plus élevées ont montré des pics d'activité générale plus précoces. Robinson (1987) n'a pas observé d'effets significatifs du méthoprène sur la ventilation. Par contre, les abeilles traitées ont commencé leurs vols d'orientation et de butinage plus précocement que les abeilles des contrôles et ce, dans tous les essais. Dans une autre étude, Robinson (1985) a montré que si des ouvrières traitées avec 250 µg de méthoprène montraient un comportement précoce de butinage, des traitements à 2,5 et à 25 µg ne causaient que de faibles effets non-significatifs. Le méthoprène a induit également la production prématurée de deux phéromones d'alarmes, la 2-heptanone et l'isopentyl acétate. Deng et Waddington (1997) ont confirmé la plupart de ces résultats. Des butineuses marquées ont été traitées par application topique de 200 µg de méthoprène dissous dans 5 µl d'acétone. Les auteurs ont montré que le méthoprène n'influçait pas les préférences (*i.e.*, pollen vs nectar) et les performances des butineuses. Les abeilles adultes ont montré de la rythmicité circadienne du comportement locomoteur qui est associé à la division du travail. Parce que l'hormone juvénile coordonne divers processus physiologiques et comportementaux impliqués dans la division du travail, Bloch *et al.* (2002) ont testé si le méthoprène influçait l'ontogenèse des rythmes circadiens et les paramètres de l'horloge interne des ouvrières jeunes. Les traitements au méthoprène (200 µg dissous dans 5 µl d'acétone), ou l'allatectomie, n'ont pas influçé l'apparition de la rythmicité et l'activité locomotrice globale.

- **Kinoprène**

Les effets du kinoprène (Enstar 65 % WG) ont été évalués sur *Bombus terrestris* par Mommaerts *et al.* (2006). Des applications de 650 mg a.i.<sup>27</sup>/L par contact et par voie orale n'ont provoqué aucune mortalité. Au bout de 11 semaines, il n'y avait pas de différence avec les témoins. La production de mâles après 11 semaines n'a pas été affectée par des applications (650 mg a.i./L) par contact, orale : eau sucrée et *via* du pollen contaminé. Cependant, avec cette dernière voie de contamination, une mortalité significative a été observée chez les larves. Une application par contact de 65 µg a.i./L a influçé positivement sur la taille des ovaires et la production d'œufs.

- **Pyriproxifène**

Bitondi *et al.* (1998) ont montré que des abeilles traitées par application topique au cours de leurs stades larvaires par du pyriproxifène (1 µg dans 1 µl d'acétone) présentaient des altérations de la pigmentation et de la sclérotisation de leur cuticule. Les effets variaient selon le stade auquel le traitement était appliqué. En utilisant des groupes de 120 abeilles nouvellement écloses traitées avec de l'acétone (1 µl) contenant différentes concentrations de pyriproxifène (10, 5, 2,5, 1,25, 0,1, 0,01, 0,001 ou 0 µg), Pinto *et al.* (2000) ont montré que ce juvénioïde affectait la synthèse, la sécrétion et l'accumulation de vitellogénine chez les jeunes ouvrières selon une relation dose-dépendante. Machado Baptista *et al.* (2009) ont montré que la pulvérisation directe de pyriproxifène (Cordial 100 EC - 0.075) conduisait à une TL50 de 466 h. Yang *et al.* (2010) ont relevé un impact sur le couvain à partir de larves d'un jour nourries avec 0,1 et 1 ppm de

---

<sup>27</sup> Active ingredient

pyriproxifène. A 10 et 100 ppm toutes les larves sont mortes avant émergence. A partir d'un test larvaire, il a été montré (Devillers *et al.* 2013) qu'une dose de 305 µg/kg de pyriproxifène (dose cumulée de 54 ng/larve) affectait le développement des glandes hypopharyngiennes. A cette dose, jusqu'à 1/3 des émergentes pouvaient présenter des malformations au niveau des ailes. Les abeilles émergentes étaient souvent rejetées par leurs congénères lors de l'introduction dans les ruches. Ainsi, les larves traitées à 101 et 305 µg/kg ont conduit respectivement à des rejets de 38 % et 80 % alors qu'il était de moins de 10 % pour les contrôles.

Les effets du pyriproxifène (Admiral 10 % EC) ont été évalués sur *Bombus terrestris* par Mommaerts *et al.* (2006). Des applications de 25 mg a.i./l par contact et par voie orale n'ont provoqué aucune mortalité. Au bout de 11 semaines, il n'y avait pas de différence avec les témoins. La production de mâles n'a pas été affectée par des applications (25 mg a.i./l) par contact, orale ou *via* du pollen contaminé. Cependant, avec cette dernière voie de contamination, une mortalité significative a été observée chez les larves.

- **Fénoxycarbe**

Aupinel *et al.* (2007a) ont évalué les effets du fénoxycarbe (98,5 % pureté) sur les larves d'abeilles. Les doses testées à J4 étaient de 3, 6, 12, 25 et 50 ng/larve. Aucun effet léthal sur les larves n'a été observé, par contre l'émergence était affectée aux doses supérieures à 6 ng/larve (dans cette étude, des effets sur les adultes issus de ces larves n'ont pas été recherchés). Heylen *et al.* (2011) ont montré que le fénoxycarbe induisait un effet sur la taille et la structure des glandes hypopharyngiennes à 14 jours après exposition orale d'abeilles de 7 jours à des doses de 100 ppm.

Beliën *et al.* (2009) ont utilisé un nourrisseur contenant une solution sucrée de fénoxycarbe (Insegar 25 WG, 1 g a.i./l) pour contaminer expérimentalement des colonies de 18 000 abeilles (*A. mellifera carnica*). Le nombre total d'abeilles actives dans les ruches a été estimé à partir de photographies de chaque face de cadre et du comptage de toutes les abeilles présentes dans des zones fixes. Après six semaines, les colonies exposées contenaient moins d'abeilles actives que les contrôles. Beliën *et al.* (2009) ont aussi montré qu'à trois semaines, le développement du couvain et le poids des colonies intoxiquées étaient moins importants que dans les contrôles mais que ces effets ne perduraient pas. Par contre, à partir d'une semaine après la contamination, le nombre de butineuses par rapport au nombre d'abeilles actives a augmenté et est resté supérieur aux contrôles durant les 10 semaines de l'expérimentation.

Thompson *et al.* (2005) ont également utilisé un nourrisseur contenant une solution sucrée de fénoxycarbe (Insegar 25 %, 0,6 kg/200 l) pour contaminer expérimentalement des colonies. Ils ont estimé que cela correspondait à 50 µg de fénoxycarbe/cellule de couvain. A cette dose, ils ont observé une augmentation des taux de remplacements des œufs et du couvain par rapport aux témoins (*i.e.*, 46 % vs 24 % et 21 % vs 5 %). Aucun effet sur la production de sperme n'a été observé ; par contre, le taux d'accouplements des reines sœurs utilisées pour tester les effets de la molécule et le nombre d'œufs pondus ont été très fortement affectés. Un mois après la contamination, Thompson *et al.* (2005) ont observé un couvain moins important ainsi qu'un nombre plus faible d'abeilles. Les colonies traitées ont décliné plus rapidement que les témoins, affectant la reprise l'année suivante. Une des colonies traitées n'a pas survécu à l'hivernage.

Les effets du fénoxycarbe (Insegar 25 % WG) ont été évalués sur *Bombus terrestris* par Mommaerts *et al.* (2006). Des applications de 100 mg a.i./l par contact et par voie orale n'ont provoqué aucune mortalité. Au bout de 11 semaines, il n'y avait pas de différence avec les témoins. La production de mâles n'a pas été affectée par des applications (100 mg a.i./l) par contact, orale ou *via* du pollen contaminé. Les DL50 par voie orale sur des larves de 1, 4 et 6 jours ont été estimées à > 650, > 1740 et > 3710 ng/larve, respectivement (Tasei 2002). Les abeilles sont donc plus sensibles que les bourdons.

- **Azadirachtine**

C'est un métabolite secondaire<sup>28</sup> présent dans l'huile extraite des graines d'*Azadirachta indica* (aussi appelé margousier ou neem). C'est un antagoniste de l'ecdysone.

Une concentration de 100 mg a.i./l d'azadirachtine n'induit pas de mortalité en 24 h chez des abeilles adultes (Akca *et al.* 2009). Des larves d'abeilles traitées par contact avec 0,5 µL de méthanol contenant 0,25 et 0,50 µg d'azadirachtine ont montré des taux de survie réduits par rapport aux témoins. Seule la dernière concentration induisait une diminution du gain de poids par rapport aux témoins (Rembold *et al.* 1982).

Thompson *et al.* (2005) ont utilisé un nourrisseur contenant une solution sucrée d'azadirachtine (1 mg a.i./l) pour contaminer expérimentalement des colonies. Ils ont estimé que cela correspondait à 0,067 µg d'azadirachtine /cellule de couvain. Aucun effet adverse apparent n'a été observé sur le développement des colonies mais 4 des 5 colonies traitées à l'azadirachtine n'ont pas survécu à l'hivernage.

Deux formulations d'azadirachtine ont été testées sous tunnel sur microcolonies d'abeilles. Des granules de NeemAzal étaient ajoutés aux graines de colza au moment du semis (77 g/15 m<sup>2</sup> soit 2 fois la dose recommandée) ou l'azadirachtine était pulvérisée (1,5 mL/15 m<sup>2</sup>) au stade floraison. La formulation (systémique) granules n'a pas eu d'effets sur la mortalité, l'activité de butinage et le développement du couvain alors que le traitement par pulvérisation a eu des effets adverses sur le développement du couvain et a réduit l'activité de butinage (Shawki *et al.* 2005).

### 3.1.2.3 Fongicides et herbicides

#### 3.1.2.3.1 Effets des fongicides

Une étude a décrit un pain d'abeille anormal, dit « enseveli » (entombed), retrouvé dans les colonies mortes et dans lequel le fongicide, chlorothalonil, a été quantifié à la concentration moyenne de 1,3 mg/kg. Les auteurs supposent que la fermentation ne se produit pas correctement. En effet, les fongicides peuvent avoir un impact sur la colonie en modifiant la microflore présente dans les réserves alimentaires ou dans le tractus digestif des abeilles (Batra *et al.* 1973). Une étude a trouvé une corrélation positive entre le nombre de résidus de pesticides et les colonies symptomatiques (Simon-Delso *et al.* 2014). Pettis *et al.* (2013) montrent une corrélation positive entre la présence de *Nosema ceranae* et celle de fongicides (chlorothalonil et pyraclostrobine).

Les fongicides chlorothalonil et myclobutanil, comme l'imidaclopride, augmentent la mortalité cellulaire dans les intestins (Gregorc et Ellis 2011).

L'effet synergisant de certains fongicides (imidazoles ou Ergosterol Biosynthesis Inhibitors) en association avec des insecticides-acaricides est décrit dans le paragraphe 4.1.2.2 du présent rapport.

#### 3.1.2.3.2 Exposition des colonies d'abeilles aux fongicides et aux herbicides

- **Etat des lieux**

Les abeilles sont exposées aux fongicides et aux herbicides présents dans les aliments qu'elles consomment (e.g. nectar, pollen, pain d'abeille) ainsi qu'à ceux qu'elles captent dans l'atmosphère au cours de leur activité de butinage. Ainsi, tous les membres de la colonie sont susceptibles d'être exposés à ces substances (EFSA 2012a) et des études réalisées en Europe et aux Etats Unis témoignent d'une exposition régulière des abeilles aux fongicides et aux herbicides.

En France, des études conduites pendant 3 ans dans 5 départements et dans lesquelles 41 pesticides dont 11 fongicides ont été recherchés, mettent en évidence que 16 % des 181 échantillons de pollens, 9 % des 305 échantillons d'abeilles, et 1,1 % des 93 échantillons de cires et 0,7 % des 140 échantillons de miel analysés contenaient au moins un fongicide (Chauzat

<sup>28</sup> Métabolite secondaire est un terme consacré pour indiquer une molécule qui ne participe pas directement au développement des plantes (au sens large) mais plutôt intervient dans les relations avec les stress biotiques, abiotiques ou améliore l'efficacité de reproduction, la défense, etc.

*et al.* 2009). Les principaux fongicides quantifiés dans les pollens au cours de ces enquêtes sont le penconazole, le flusilazole, le tébuconazole, le cyproconazole le mycolbutanyl, et l'hexaconazole et pour lesquels des concentrations moyennes comprises entre 10 et 20 µg/kg ont été calculées. Les fongicides quantifiés dans les abeilles sont le penconazole, le tébuconazole et le tétraconazole avec des concentrations moyennes comprises entre 5 et 20 µg/kg (Chauzat *et al.* 2009). Cette enquête dans laquelle la fréquence de co-détection des fongicides a également été évaluée, révèle que les abeilles et les pollens sont fréquemment contaminés par plusieurs fongicides ou contaminés par un fongicide associé à un autre pesticide (ex : imidaclopride). Dans cette étude aucun herbicide n'a été recherché.

Plus récemment entre 2008 et 2009, une enquête sur la contamination des abeilles, du pollen et du miel a été réalisée dans 5 ruchers répartis entre la Bretagne et les Pays de la Loire. Sur les 22 fongicides recherchés, 5 fongicides sont retrouvés dans les 141 échantillons d'abeilles (benalaxyl, carbendazime, flusilazole, propioconazole et le thiophanate-méthyl), 9 dans les 120 échantillons pollens (bupirimate, carbendazime, cyproconazole, diéthofencarbe, flusilazole, iprodione, thiophanate-méthyl, triadimenol et vinclozolin) et 9 dans les 141 échantillons miel (bupirimate, carbendazime, cyproconazole, diéthofencarbe, flusilazole, imazalil, prochloraze, tebuconazole et thiophanate-méthyl) (Lambert *et al.* 2013). Le carbendazime est le fongicide le plus fréquemment retrouvé avec une fréquence de détection de 41 % dans les abeilles, 64 % dans le miel et 34 % dans les pollens. Pour l'ensemble des fongicides détectés, les concentrations moyennes calculées dans ces matrices est inférieure aux quantités retrouvées par Chauzat *et al.* (2009) (exemple : < 10 µg/kg), excepté pour le thiophanate-méthyl dont la concentration moyenne est de 23 µg/kg de miel. Dans cette étude aucun herbicide n'a été recherché.

En France durant la saison apicole 2014, la présence de résidus de pesticides dans les pollens collectés par des colonies a été étudiée dans 5 ruchers sédentaires (Vidau 2015). Les 165 échantillons de pollen de trappe collectés ont été analysés à l'aide d'une méthode multi résidus permettant de rechercher plus de 400 substances (LOQ =10 µg/kg). Les résultats d'analyses révèlent que 72 % des échantillons contiennent au moins un résidu de pesticide et qu'environ 25 % en contiennent 5 ou plus. Soixante-six substances ont été détectées, dont 32 fongicides, 23 insecticides, 8 herbicides et 3 régulateurs de croissance. Les résidus les plus fréquemment retrouvés incluent un insecticide, le chlorpyrifos-éthyl (27,9 %), deux fongicides le fludioxonil (17,6 %) et le cyprodinil (16,4 %), un analogue de l'hormone juvénile, le fénoxycarbe (14,5 %) et un herbicide, la pendiméthaline (10,9 %). Les concentrations moyennes de ces substances sont généralement comprises entre 10 et 250 µg/kg, mais des concentrations pouvant dépasser les 500 µg/kg sont parfois retrouvées. Les résultats présentés dans cette étude témoignent d'une exposition continue mais irrégulière, dans l'ensemble plus importante de la fin de l'hiver jusqu'au début de l'été, liée principalement à la contamination des pollens par des fongicides et des insecticides.

En Espagne durant les années 2006 et 2007, un état des lieux de la contamination du pain d'abeille a été réalisé dans plus de 1 000 ruchers (Bernal *et al.* 2010). L'analyse porte sur deux années où ont été collectés 845 échantillons au printemps et 176 échantillons durant l'automne. Sur l'ensemble des pains d'abeille collectés au printemps, 12 fongicides sont retrouvés. Il s'agit de la procymidone, de l'hexachlorobenzène, du matalaxyl, du difenoconazole du captan, du myclobutanil, de la vinclozolin, du chlorothalonil, du propioconazole, de l'azostrobine, de l'iprodione et du flusilazole. Les fréquences de détection de chacun des fongicides étaient inférieures à 2 % des échantillons. Les concentrations moyennes en fongicides sont comprises entre 67 et 2 µg/kg. Parallèlement aux fongicides, quatre résidus d'herbicide sont retrouvés. Il s'agit du trifluraline, de l'atrazine de la simazine et de l'imazamethabenzyl-méthyl détectés respectivement dans 9,7 %, 2,9 %, 1,9 % et 0,4 % des pains d'abeille analysés. Sur les deux années, les concentrations moyennes calculées pour ces 4 herbicides sont respectivement de 3,2, 25,15, 43,0 et 9,5 µg/kg. Les pains d'abeille collectés en automne sont en moyenne moins contaminés que ceux collectés au printemps, où aucun herbicide et seulement 2 fongicides sont détectés (hexachlorobenzène et vinclozoline dans 1,13 % des échantillons). Les auteurs de cette étude font également état d'une contamination plus importante dans les colonies transhumantes que dans les colonies appartenant à des ruchers sédentaires.

En Belgique, Nguyen *et al.* (2009) ont comparé la survie de colonies d'abeilles placées dans des environnements dans lesquels des cultures de maïs traitées avec de l'imidaclopride étaient présentes ou non. Entre le 20 août et le 20 octobre 2004, dans chacun des 16 ruchers répartis sur le territoire Belge, 3 colonies ont été échantillonnées. Dans les 48 échantillons de cires, d'abeilles et de miels qui ont été collectés, 2 fongicides et 1 herbicide sont retrouvés. Il s'agit du flusilazole, de la trifloxystrobine et du bitertanol retrouvés respectivement dans 14,6 %, 12,5 % et 2,1 % des miels et respectivement dans 31,3 %, 8,4 % et 4,2 % des cires. En revanche, aucun fongicide et herbicide ne se sont détectés dans les abeilles.

Aux Etats-Unis, un état des lieux a été dressé au cours des années 2007 et 2008 par Mullin *et al.* (2010). Dans cette étude ce sont 350 échantillons de pains d'abeille, 140 échantillons d'abeilles et plus de 200 échantillons de cire collectés au cours de la saison apicole qui ont été analysés. Cette étude révèle une contamination plus importante que celle décrite en France dans les études de Chauzat *et al.* (2009) et de Lambert *et al.* (2013), puisque 63 % des cires, 61 % des pollens et 13 % des abeilles contenaient au moins un fongicide (Mullin *et al.* 2010). Parmi les fongicides recherchés, 25 résidus ont été détectés au moins une fois dans les pollens, 23 dans les cires et 6 dans les abeilles, ce qui témoigne d'une diversité importante de fongicides auxquels les abeilles sont exposées. Dans les cires et les pollens, les concentrations moyennes de plusieurs fongicides (exemples : chlorothalonil, boscalide, captan et iprodione) dépassent parfois les 100 µg/kg. Cette étude révèle également la présence d'herbicides dans les matrices apicoles. En effet, la fréquence de détection des herbicides dans les cires, les pollens et les abeilles sont respectivement de 41,8 %, 50,3 % et 6,4 %. La diversité des herbicides retrouvée dans les cires et les pollens est moins importante que celle observée pour les fongicides, puisque ce sont respectivement 11 et 13 herbicides qui sont détectés dans les cires et les pollens. Comme pour les fongicides, les herbicides retrouvés dans les abeilles sont au nombre de 6. Les concentrations moyennes d'herbicides mesurées dans les cires sont globalement inférieures à 10 µg/kg excepté pour l'éthofumesate dont la concentration moyenne est de 392 µg/kg. Dans les pollens, les concentrations moyennes d'herbicides sont plus hautes que celles calculées sur les cires puisque elles dépassent régulièrement les 10 µg/kg. Les concentrations moyennes d'herbicides retrouvées dans les abeilles sont comprises entre 2,2 et 15,9 µg/kg.

- **Etude de cas**

Des études plus ciblées ont par ailleurs été conduites dans l'objectif d'évaluer l'exposition des abeilles après l'application de fongicides sur des cultures de colza (Wallner 2009), de pommiers (Kubik *et al.* 2000) et de cerisiers (Kubik *et al.* 1999).

Wallner (2009) a suivi pendant 7 jours la contamination du pollen et du nectar de jabot prélevés sur des butineuses de 14 colonies placées à proximité d'une culture de colza en fleur (issue de graines enrobées avec de la clothianidine) et traitée au boscalide 250 g/ha. Le boscalide a été détecté dans les 22 échantillons de pollen analysés (pool des pelotes récoltées sur 150 - 200 butineuses). Les concentrations moyennes mesurées dans le pollen sont respectivement de 13,9 mg/kg le jour du traitement, 26,2 et 4,7 mg/kg le lendemain et le surlendemain du traitement et atteignent 3 mg/kg une semaine après. Le nectar collecté par les butineuses est également contaminé par du boscalide sur l'ensemble de la période étudiée. Les concentrations mesurées sont respectivement de 1,43 mg/kg le jour du traitement, 0,13 mg/kg et 0,017 mg/kg le lendemain et le surlendemain du traitement puis de 0,025 mg/kg une semaine après. Dans cette étude, de la clothianidine issue de l'enrobage des graines de colza a également été co-détectée dans le nectar de jabot des butineuses à des concentrations comprises entre 0,001 et 0,003 mg/kg.

Des études comparables ont été conduites sur des colonies d'abeilles placées à proximité de vergers d'arbres fruitiers en fleuraison (Kubik *et al.* 1999; Kubik *et al.* 2000; Smodiš Škerl *et al.* 2009). Dans l'étude de Kubik *et al.* (2000), les formulations pulvérisées sur 10 ha de pommiers en fleur contenaient les fongicides captan (1000 g/ha) et difenoconazole (50 g/ha) et les matrices analysées étaient le miel, les pelotes de pollen de pommier et le pain d'abeille. Le suivi de la contamination du pollen a montré une persistance des fongicides 13 jours après le traitement. Les concentrations de captan mesurées dans les pollens sur l'ensemble de la période étudiée sont systématiquement supérieures à celles du difenoconazole. Pour les deux fongicides, des pics de



contamination des pollens de trappe ont été observés le troisième jour après traitement. Les concentrations maximales de résidus de captan et de difenoconazole mesurées dans ces pollens étaient respectivement de 18,9 mg/kg et de 0,166 mg/kg. Le pain d'abeille et le miel étaient également contaminés par ces deux fongicides 14 jours après la pulvérisation. En moyenne, le miel stocké dans les 10 colonies utilisées pour l'étude contenait du difenoconazole et du captan aux concentrations respectives de 0,6 µg/kg et 9 µg/kg. Le pain d'abeille obtenu à partir du pollen était d'avantage contaminé et renfermait des concentrations moyennes de difenoconazole de l'ordre de 270 µg/kg et de captan voisines de 6,5 mg/kg.

Dans l'étude de Kubik *et al.* (1999), les colonies étaient placées, en début de floraison, au centre d'un verger de cerisier d'une surface de 4,5 ha. Les traitements effectués dans ce verger contenaient du méthyl thiophanate (0,7 kg/ha) et de l'iprodione (0,7 kg/ha) pour le premier traitement, et du méthyl thiophanate (0,7 kg/ha), de l'iprodione (0,185 kg/ha) et de la vinclozoline (0,375 kg/ha) pour le second traitement effectué 6 jours plus tard. Les matrices analysées étaient les pelotes de pollen de cerisier, le miel, et le pain d'abeille. La contamination du pollen a été suivie quotidiennement durant 14 jours. Au cours de cette période, les pollens analysés contenaient régulièrement les 3 fongicides avec des concentrations moyennes de méthyl thiophanate de vinclozoline et d'iprodione respectivement de 0,25, 0,12 et 0,009 mg/kg. Un pic de contamination a été observé 11 jours après le premier traitement : méthyl thiophanate à 4 mg/kg, vinclozoline à 3 mg/kg et iprodione à 0,5 mg/kg. Le miel et le pain d'abeille ont été collectés dans 5 colonies, 14 jours après le premier traitement et contenaient des concentrations moyennes de 58,9 +/- 17,1 µg/kg de méthyl thiophanate, 107,0 +/- 43,6 µg/kg de vinclozoline et 23,1 +/- 5,4 µg/kg d'iprodione pour le miel et 1,9 +/- 1,0 mg/kg de méthyl thiophanate, 23,6 +/- 7 mg/kg de vinclozoline et 3,0 +/- 1,4 mg/kg d'iprodione dans le pain d'abeille.

Smodiš Škerl *et al.* (2009) ont comparé la contamination des pollens de trappe et des pains d'abeille collectés dans des colonies placées dans un verger de pommiers à celle des mêmes matrices prélevées dans une territoire dans lequel l'arboriculture n'est pas pratiquée. Les vergers ont été traités avec des formulations contenant du diazinon (15 l/ha), du difenoconazole (0,2 l/ha) et du thiaclopride (0,2 l/ha). La contamination des pollens par le diazinon est maximale le lendemain du traitement (1,98 mg/kg) puis décroît rapidement pour atteindre une valeur de 0,03 mg/kg 10 jours après le traitement. Dans les pains d'abeilles collectés 16 jours après le traitement, une concentration de diazinon de 0,09 mg/kg est retrouvée. Le difenoconazole et le thiaclopride, pulvérisés en mélange sur le verger sont retrouvés le lendemain dans les pelotes de pollen avec des concentrations respectives de 0,01 et 0,09 mg/kg. La contamination du pain d'abeille par ces deux molécules n'a pas été mesurée. Dans les pelotes de pollen et le pain d'abeille collectés dans les colonies contrôles, ces trois molécules ne sont pas détectées.

### 3.1.2.4 Antibiotiques

#### 3.1.2.4.1 Aspects réglementaires

Au sein de l'Union européenne, selon les règlements (CE) n° 470/2009 et (UE) n° 37/2010, aucune limite maximale en résidus (LMR) n'a été définie pour les antibiotiques dans les produits de la ruche (miel et gelée royale). Par conséquent, *aucun antibiotique n'est autorisé pour le traitement des abeilles*, et la détection de tout résidu d'antibiotiques dans le miel empêche sa commercialisation au sein de l'Union européenne. Toutefois, selon le principe de la cascade, tout vétérinaire pourrait théoriquement prescrire des antibiotiques pour traiter des abeilles en utilisant un antibiotique autorisé dans une autre espèce animale. Le vétérinaire prescripteur a alors la responsabilité d'indiquer la dose, la durée et le mode d'application, et le délai d'attente. En pratique, aucune dose, aucun temps d'attente ne sont officiellement établis. On peut noter que l'usage de l'oxytétracycline est autorisé au Royaume-Uni dans le cadre de la cascade pour le traitement de la loque européenne avec un temps d'attente d'au moins 6 mois (EMA 2010). Par ailleurs, une autorisation temporaire d'utilisation de la fumagilline pour le contrôle de *Nosema* spp. avait été délivrée en Espagne de 2005 à 2007 et au Royaume-Uni jusqu'à récemment. Ces exceptions ont été supprimées.

A l'inverse, aux Etats-Unis, l'oxytétracycline, la tylosine et, plus récemment, la lincomycine ont été enregistrées pour le traitement de la loque américaine, avec une LMR de 200 µg/kg et un temps d'attente de 4 (tylosine, lincomycine) et 6 semaines (oxytétracycline) (USFDA 2014). La tylosine est également autorisée au Canada pour la même indication avec une LMR de 200 µg/kg. Cependant, l'intérêt de l'utilisation d'antibiotiques pour lutter contre la loque américaine soulève des doutes car les antibiotiques sont inactifs sur les formes sporulées très résistantes de son agent étiologique, *Paenibacillus larvae*. La fumagilline est autorisée aux Etats-Unis et au Canada. Pour réduire les résidus, le traitement est interdit pendant la saison de butinage (USFDA 2012). Habituellement, les ruches sont traitées préventivement une fois à la fin de l'automne et une fois au début du printemps (Webster 1994). La fumagilline persiste à l'intérieur des ruches (Higes *et al.* 2011), et se dégrade au fil du temps (Nozal *et al.* 2008).

Le bicyclohexylammonium de fumagilline, un antibiotique isolé du champignon *Aspergillus fumigatus*, avait été le seul traitement largement utilisé pour le traitement de la nosérose chez les abeilles d'Europe occidentale *Apis mellifera* (Bailey 1953; Higes *et al.* 2011) pendant environ 60 jours (Higes *et al.* 2011). La fumagilline sous forme de concentration à 3% à usage vétérinaire, est considérée comme le seul traitement efficace de l'infection à *Nosema apis*; elle élimine également la microsporidie pathogène découverte plus récemment, *N. ceranae* (Williams *et al.* 2008), mais son efficacité est cependant contestée (Botías *et al.* 2013; Huang *et al.* 2013; Williams *et al.* 2011). La fumagilline n'est plus autorisée dans l'Union européenne, son AMM ayant été suspendue faute de LMR fixée au niveau européen.

#### 3.1.2.4.2 Usage des antibiotiques chez les abeilles hors Union européenne

La lutte contre les loques repose sur la destruction des foyers infectieux. La plupart des pays préconisent de détruire les couvains malades et de décontaminer par le feu les cadres et les ruches infectés après avoir transféré la colonie d'abeilles adultes dans de nouvelles ruches. Dans certains pays hors de l'Union européenne (Etats-Unis, Canada, Argentine), le traitement par les antibiotiques est autorisé pour contrôler ces maladies. Dans ces pays, les principaux antibiotiques utilisés en apiculture contre ces maladies du couvain sont les tétracyclines, la streptomycine, les sulfamides et le chloramphénicol (Al-Waili *et al.* 2012).

Il est important de rappeler les limites des traitements antibiotiques dans le cas des loques. Les antibiotiques agissent en bloquant le métabolisme des bactéries. Par conséquent, ils ne doivent être utilisés que pour lutter contre des bactéries en phase active de multiplication, correspondant pratiquement, sur le plan clinique, à la phase aiguë de la maladie infectieuse. Il ne faut pas attendre d'effet anti-infectieux sur les formes de résistance (spores) ou sur les bactéries en phase de latence. Autre conséquence, le foyer infectieux n'est pas détruit par le seul traitement antibiotique : une rémission peut être observée avec le traitement, mais l'infection reprend lorsque l'effet inhibiteur de l'antibiotique n'est plus exercé **Tableau 10**.

En cas de loque américaine (LA), lorsque l'infection à *Paenibacillus larvae* est modérée, un transvasement<sup>29</sup> est recommandé comme méthode de traitement (Reybroeck *et al.* 2012; von der Ohe 2003). La LA exige des mesures sanitaires rigoureuses : tous les cadres de la colonie sont incinérés et les corps de ruches désinfectés et traités à la flamme. Contre les formes sévères ont été utilisés les sulfamides, en particulier le sulfathiazole, et les tétracyclines. Certains auteurs (Kochansky *et al.* 2001; Okayama *et al.* 1996) ont rapporté une activité bactéricide contre *P. larvae* de la lincomycine. Son efficacité contre la LA a été démontrée par Feldlaufer *et al.* (2001). Diverses études ont montré l'efficacité de la tylosine dans le contrôle de la LA (Peng *et al.* 1996). La tylosine a été utilisée contre la LA quand on a constaté que *P. larvae* avait acquis une résistance aux tétracyclines (Reybroeck *et al.* 2012). L'érythromycine a été tout d'abord testée en 1955 (Katznelson 1956; Katznelson *et al.* 1955). Selon certains auteurs, l'érythromycine s'est avérée efficace contre la LA (Machova 1970; Okayama *et al.* 1996), tandis que d'autres l'ont trouvée inefficace (Alippi *et al.* 1999; Katznelson *et al.* 1955; Moffett *et al.* 1958). D'autres études

<sup>29</sup> Transvasement : pratique apicole qui consiste à récupérer les abeilles adultes d'une ruche et à les placer dans une nouvelle ruche équipée de cadres vides construits ou de cadres de cire gaufrée.

concluent à une plus grande efficacité de la pénicilline et des macrolides que des tétracyclines contre *P. larvae* (Leighton 1983).

Pour la loque européenne (LE), les sulfamides sont sans action. Quelques antibiotiques, comme l'oxytétracycline, ont montré leur efficacité contre la LE. La streptomycine et les tétracyclines ont été utilisées pour lutter contre cette maladie. La destruction et l'élimination des rayons malades sont obligatoires quelle que soit la pratique apicole. L'efficacité de l'érythromycine contre la LE a été démontrée par certains auteurs (Wilson 1962; Wilson et Moffett 1957). Gunes *et al.* (2008) signalent l'utilisation de cette molécule dans le sud de la Turquie par des apiculteurs professionnels.

La nosérose, maladie fongique (voir aussi 3.1.1.2.3.1), fait également l'objet de traitements antibiotiques hors Union européenne. Katznelson et Jamieson (1952) avaient trouvé la fumagilline efficace contre la nosérose. Le bicyclohexylammonium de fumagilline, un antibiotique isolé du champignon *Aspergillus fumigatus*, a été le seul traitement largement utilisé pour le traitement de la nosérose chez les abeilles d'Europe occidentale *Apis mellifera* (Bailey 1953; Higes *et al.* 2011) pendant environ 60 jours (Higes *et al.* 2011). Selon Williams *et al.* (2008), la fumagilline est considérée comme un traitement efficace de l'infection à *Nosema apis* et *N. ceranae*. Cependant, son efficacité est contestée (Botías *et al.* 2013; Huang *et al.* 2013; Williams *et al.* 2011). Ainsi, dans une publication récente, Huang *et al.* (2013) ont démontré que la fumagilline altérerait la structure protéique des tissus intestinaux des abeilles à des concentrations qui ne suppriment pas la reproduction des microsporidies. Au Chili, certains apiculteurs ont également utilisé des sulfamides contre la nosérose (Lourdes 2002).

#### 3.1.2.4.3 Conséquences de l'utilisation des antibiotiques dans la ruche

##### • Problématique particulière des résidus dans la ruche

Les modes spécifiques d'administration des médicaments en production apicole entraînent une problématique particulière des résidus dans cette filière de production. Les antibiotiques appliqués dans la ruche subissent rarement un métabolisme (**Tableau 4**). Par conséquent, les résidus ne sont pas éliminés après une certaine période comme cela est défini habituellement pour fixer les délais d'attente avec les médicaments vétérinaires administrés directement aux autres animaux. Par ailleurs, aucune limite maximale en résidus (LMR) n'est établie dans le miel et la gelée royale, produits consommés par l'homme. Donc, aucun médicament vétérinaire contenant des antibiotiques n'est autorisé pour l'espèce abeille en Europe contrairement aux Etats-Unis où certains de ces antibiotiques sont autorisés. Ainsi, aux Etats-Unis, l'oxytétracycline, la tylosine, la fumagilline, la lincomycine sont utilisées dans certaines conditions.

Suite à un traitement antibiotique, des résidus peuvent se retrouver dans les produits de la ruche, particulièrement, dans le miel. La présence de ces résidus peut sélectionner des souches résistantes et augmenter les fréquences de résistance des agents pathogènes (chez l'Homme et l'animal) (Al-Waili *et al.* 2012). Ainsi, aux Etats-Unis et en Argentine, l'utilisation intensive, de façon répétitive, des tétracyclines, a provoqué la sélection de souches de *P. larvae* résistantes à ces tétracyclines (Reybroeck *et al.* 2012). Suite aux échecs thérapeutiques liés à la sélection de ces souches résistantes, les tétracyclines ont été remplacées par la tylosine dont l'usage s'est développé.

Plusieurs études ont montré une persistance des différents antibiotiques dans le miel (Adams *et al.* 2009; Granja *et al.* 2009; Martel *et al.* 2006). Une étude a démontré que l'augmentation de la concentration en sulfaméthazine dans la cire s'accompagnait d'une augmentation simultanée des résidus de cette molécule dans le miel (Reybroeck 2003). De plus, la persistance du sulfathiazole dans la cire 12 mois après la dernière application sous forme de poudre a été récemment démontrée (Martinello *et al.* 2013). Dans une enquête portant sur 3 855 miels d'origines diverses analysés, 1,7 % des échantillons présentaient des résidus d'antibiotiques : la streptomycine, les sulfamides, les tétracyclines, le chloramphénicol, les nitrofuranes, la tylosine et les quinolones (Diserens 2007).

De plus, dans certains cas, des antibiotiques ont été utilisés également en agriculture, par exemple, la streptomycine contre le feu bactérien sur les arbres fruitiers. Les antibiotiques utilisés

comme produits phytosanitaires peuvent être récoltés par les butineuses lors de leurs visites des fleurs et contaminer les miels. Ainsi, en 2001, 21 % des miels allemands contenaient de la streptomycine (Bogdanov 2006; Brasse 2001). Actuellement, l'utilisation en agriculture des antibiotiques (streptomycine et oxytétracycline) est interdite en Europe.

Enfin, les circuits commerciaux des produits de la ruche sont très mondialisés. L'Europe importe des miels provenant de divers continents dont la réglementation sur les LMR est très différente de celle de l'Union européenne. Dans une synthèse bibliographique, Bogdanov (2006) rapporte que 20 à 50 % des miels importés en France, Belgique et Suisse contenaient des résidus d'antibiotiques, principalement de la streptomycine (dans des miels essentiellement d'origine mexicaine), des sulfamides (dans des miels essentiellement d'origine turque), mais aussi du chloramphénicol (surtout dans des miels provenant de Chine) et des tétracyclines.

**Tableau 4 : Résidus d'antibiotiques retrouvés dans le miel (Bogdanov, 2006)**

Antibiotics	References
<b>Sulfonamides</b>	
sulfathiazole, sulfamerazine, sulfamethazine, sulfamethaxazole, sulfadiazine, sulfamethoxypyridazine, sulfadoxine, sulfadimidine, sulfanilamide	(Martel and Zeggane, 2003; Reybroeck, 2003; Wallner, 2003; Kaufmann and Känzig, 2004)
<b>Aminoglycosides</b>	
streptomycine, dihydrostreptomycine	(Morlot and Beaune, 2003; Reybroeck, 2003; van Bruijnsvoort et al., 2004)
<b>Tetacyclines</b>	
tetracycline, oxytétracycline, chlortétracycline, doxycycline	(Argauer and Moats, 1991; Tantillo et al., 2000; Morlot and Beaune, 2003; Reybroeck, 2003; Sabatini et al., 2003)
<b>Amphenicols</b>	
chloramphénicol	(Dharmananda, 2003; Reybroeck, 2003; Verzegnassi et al., 2003; Orтели et al., 2004)
<b>Macrolides</b>	
tylosine	(Baggio et al., 2004; Feldlaufer et al., 2004)
myrosamine	(Nakajima et al., 1998)
<b>Beta-lactams</b>	
penicillins	(Nakajima et al., 1997; Reybroeck, 2003)
<b>Nitrofurane metabolites</b>	(Stiftung Warentest, 2004; Jenkins and Young, 2005)
AOZ, SC	

AOZ: 3-amino-2-oxazolidinone; SC: semicarbazide.

Des contaminations de la gelée royale sont également possibles par les résidus d'antibiotiques (Matsuka et Nakamura 1990). Des résidus de chloramphénicol ont été détectés dans la gelée royale produite en Chine (Dharmananda 2003; Reybroeck 2003).

L'utilisation des fluoroquinolones est croissante en Asie (Savoy Perroud *et al.* 2009). Les principaux résidus retrouvés sont l'enrofloxacin et la norfloxacin.

Les analyses des nitrofuranes dans le miel montrent que la furazolidone est le principal nitrofurane administré pour lutter contre les maladies des abeilles (Khong *et al.* 2004).

En 2007, Zhou *et al.* ont signalé qu'en Chine, cinq nitroimidazoles avaient été utilisés dans les années précédentes pour lutter contre *Nosema apis*, en tant qu'alternative à la fumagilline. Depuis, l'utilisation de ces molécules est interdite en Chine. Le principal résidu retrouvé dans le miel chinois était le métronidazole (Zhou *et al.* 2007).

La plupart des antibiotiques sont stables dans le miel, d'autres se dégradent (Tableau 5 et Tableau 6).

Tableau 5 : Résidus d'antibiotiques traceurs d'une utilisation par les apiculteurs (Reybroeck *et al.*, 2012)

Pharmacologically active substance	Metabolite	Marker residue <sup>a</sup>
Streptomycin	-	Streptomycin
Tetracyclines	Epimers	Sum of parent drug and its 4-epimers
Sulfonamides	-	Parent drug
Erythromycin	-	Erythromycin A
Tylosin	Desmycosin (tylosin B)	Tylosin A
Lincomycin	-	Lincomycin
Enrofloxacin	-	Sum of enro- and ciprofloxacin
Ciprofloxacin	-	Sum of enro- and ciprofloxacin
Trimethoprim	-	Trimethoprim
Metronidazole	-	Metronidazole
Chloramphenicol	-	Chloramphenicol
Furazolidone	AOZ (3-amino-2-oxazolidone)	AOZ (3-amino-2-oxazolidone)
Nitroimidazoles	Hydroxymetabolites	Hydroxymetabolites

<sup>a</sup> Commission Regulation (EU) No. 37/2010.

Tableau 6 : Temps de demi-vie ( $t_{1/2}$ ) de quelques antibiotiques dans le miel (Reybroeck *et al.*, 2012)

Pharmacologically active substance	Temperature – storage	Half-life	Reference
Tetracycline hydrochloride	20 °C – lab	242 days	Martel <i>et al.</i> (2006)
	35 °C – lab	121 days	Martel <i>et al.</i> (2006)
	in bee colony	65 days	Martel <i>et al.</i> (2006)
Oxytetracycline	34 °C – lab	12 days	Argauer and Moats (1991)
	in bee colony	2–4 days	Gilliam and Argauer (1981a)
	in bee colony	9–44 days	Thompson <i>et al.</i> (2006)
	in bee colony	11–14 days	Anon. (2002)

#### • Effets des antibiotiques sur les abeilles rapportés dans la littérature

Avant d'envisager les éventuels effets toxiques des antibiotiques sur la santé de l'abeille (et chez les consommateurs des produits de la ruche), il est important de rappeler que l'utilisation des antibiotiques peut créer une pression de sélection favorable à l'émergence de souches bactériennes résistantes aux molécules présentes dans le milieu. Ceci peut être la cause d'échecs thérapeutiques, chez l'animal et chez l'Homme. Ainsi, à la suite d'une large utilisation de l'oxytétracycline pour le traitement des loques, plusieurs études indiquent une augmentation des fréquences de résistance chez *Paenibacillus larvae*, *Melissococcus plutonius* et *Streptococcus pluton* aux Etats-Unis (vanEngelsdorp et Meixner 2010).

Concernant l'effet toxique proprement dit, l'infection des abeilles par *Nosema apis* entraîne une atrophie des glandes hypopharyngiennes. Chez les abeilles infectées et traitées à la fumagilline, on observe des changements ultra-structuraux des granules de sécrétion qui sont probablement associés à une modification de l'activité sécrétrice de ces glandes (Liu 1990) : l'antibiotique semble avoir des effets inhibiteurs sur les glandes hypopharyngiennes des abeilles infectées.

Peng *et al.* (1992) ont montré qu'avec une alimentation larvaire comprenant 0,0025 % de chlortétracycline (CTC), les mortalités larvaires sont similaires à celles observées pour le groupe témoin. A cette concentration, la chlortétracycline diminue les mortalités des larves inoculées avec  $1 \times 10^4$  à  $1,5 \times 10^8$  spores/mL de *Paenibacillus larvae*. Par contre, des concentrations supérieures à 0,0025 % en CTC retardent la croissance et le développement larvaire et entraînent une pigmentation précoce des jeunes larves. A 0,05 % de CTC, les auteurs observent 100 % de mortalités larvaires. Les auteurs considèrent que la loque américaine est contrôlée avec 0,0025 % de CTC même s'il y a des niveaux élevés en agents pathogènes inoculés aux larves.

D'après Peng *et al.* (1996), les larves d'abeilles peuvent tolérer des doses de 0,005 à 0,05 % de tylosine dans leur alimentation sans effet négatif observé. Un mélange de 200 mg de terramycine et de 100 mg de tylosine protège les colonies pendant 3 semaines. Une dose de 200 mg de tylosine protège la colonie pendant une semaine supplémentaire. Des doses de 100 mg de tylosine éliminent les signes cliniques de l'infection par la LA. Parmi les antibiotiques, les pénicillines, l'érythromycine et la tylosine apparaissent les plus efficaces contrairement aux

tétracyclines. La tylosine est plus efficace que le sulfathiazole dans le contrôle de la loque américaine. Mais pour des doses de 0,5% et plus en tylosine, les mortalités larvaires augmentent. Les quelques larves qui survivent pour des applications de 0,5 et 1 % ne continuent pas leur développement jusqu'au stade adulte. Pour le groupe nourri avec 0,03 % de tylosine, moins de mortalités sont observées par rapport aux autres groupes (témoins et traités avec différentes doses), et l'arrivée au stade adulte est plus élevée avec le groupe nourri à 0,03 % de tylosine. Ces auteurs indiquent que les colonies nourries avec 200 mg de tylosine sont protégées pendant 4 semaines mais ils attirent l'attention sur les résidus pouvant se retrouver dans le miel suite à cette application.

L'action du chloramphénicol s'exerce au niveau des protéines des insectes (Ashour *et al.* 1980; Fragouli-Fournogeraki *et al.* 1978). L'incorporation au régime alimentaire de 0,5 g/l de chloramphénicol (1,6 mM) entraîne une diminution significative des concentrations protéiques de l'hémolymphe d'abeilles, du 2<sup>ème</sup> au 5<sup>ème</sup> jour après le début du traitement (Bounias *et al.* 1982). Au bout de 16 jours, l'addition du chloramphénicol dans l'alimentation réduit le taux de mortalité de 21 à 2 % dans le cas des abeilles recevant du saccharose et de 50 à 45 % dans le cas du tréhalose.

Dans une étude ancienne, Gilliam *et al.* (1974) signalent que la présence de levures peut être un indicateur de condition de stress. Les antibiotiques diminuent la flore bactérienne intestinale des abeilles et augmentent la fréquence de levures. La combinaison de l'oxytétracycline et de la fumagilline diminue non seulement la flore bactérienne mais aussi la flore fongique. Plus récemment, Flores *et al.* (2004) ont étudié le rôle possible d'une utilisation excessive d'oxytétracycline comme condition favorisant l'apparition de la maladie du couvain plâtré sous trois températures (25, 30 et 35 °C). Aucune différence significative n'a été observée entre les colonies traitées et non traitées sur les couvains maintenus à 25, 30 et 35 °C. Par contre, des différences significatives ont été observées au début de l'étude sur les couvains maintenus à 25 °C : le pourcentage de couvain plâtré est plus important en présence d'oxytétracycline. Les auteurs pensent, que dans ces conditions, l'oxytétracycline pourrait perturber l'équilibre de la microflore de l'intestin des abeilles favorisant la croissance d'*Ascosphaera apis* (Menapace et Wilson 1979) ce qui induirait naturellement la maladie du couvain plâtré. Ils concluent, que dans les conditions de leur étude à court et moyen terme, la présence d'oxytétracycline n'entraîne pas de risque majeur de production de mycose du couvain. Néanmoins, ils estiment qu'il faudrait vérifier l'effet de l'utilisation de l'oxytétracycline à long terme dans les colonies.

### 3.1.2.5 Traitements antiparasitaires dirigés contre *Varroa* : effets toxiques pour les abeilles

Les apiculteurs doivent utiliser des traitements anti-*Varroa* (Rosenkranz *et al.* 2010) qui doivent être toxiques pour les parasites, tout en entraînant le moins d'effets secondaires possibles chez les abeilles, ce qui constitue une réelle difficulté compte tenu de la sensibilité des abeilles à de nombreux pesticides (Atkins 1992).

Les varroacides utilisés dans le monde peuvent être divisés en trois catégories : les molécules organiques de synthèse, les produits naturels et les acides organiques (*cf.* revue dans Johnson *et al.* (2010)).

#### 3.1.2.5.1 Les pesticides organiques de synthèse

- **Le tau-fluvalinate (Apistan®)**

Le tau-fluvalinate est un pyréthrianoïde contenant deux des quatre isomères du mélange racémique fluvalinate (EMEA 1995). Il s'agit du premier varroacide de synthèse autorisé en apiculture aux Etats-Unis (Ellis *et al.* 1998). Il se présente sous forme de lanières en plastique de 8 g contenant 10 % de tau-fluvalinate. Une seule lanière permet une diffusion du produit pendant 8 semaines (Bogdanov *et al.* 1998b; Vita Europe Ltd 2009).

Comme les autres pyréthrianoïdes, le tau-fluvalinate tue les acariens en bloquant les canaux calciques et sodiques voltage-dépendants (Davies *et al.* 2007), ce qui prolonge l'ouverture des canaux sodiques des cellules nerveuses du système nerveux (SN) central et du SN périphérique de ces acariens. Initialement, il stimule les cellules nerveuses et induit une hyperexcitabilité, puis

une paralysie et la mort de l'acararien. Alors que la plupart des pyréthriinoïdes sont très toxiques pour les abeilles, celles-ci tolèrent des concentrations élevées de tau-fluvalinate, et ce en grande partie grâce à une détoxification rapide par les cytochromes P450 monooxygénases (P450s) (Johnson *et al.* 2006). Pour le tau-fluvalinate, l'EPA (Environmental Protection Agency) s'attend à un risque de toxicité aiguë chez des insectes non cibles du fait de la toxicité élevée du produit chez les abeilles, dont la DL50 aiguë par contact est de 0,2 µg/abeille (EPA 2005). Chez les abeilles adultes, une augmentation de la mortalité liée au tau-fluvalinate a été estimée à 2,7 abeilles/jour pendant 60 jours (Frilli *et al.* 1991).

En agriculture, il existe une présentation de tau-fluvalinate sous forme d'émulsion aqueuse, qui a été largement utilisée par des apiculteurs pour imprégner des bandelettes de contreplaqué suspendues ensuite entre les cadres de couvain. Cet usage dans les ruches, non autorisé et peu coûteux, peut contribuer à la présence de résidus de tau-fluvalinate détectés dans les cires d'abeilles (Berry 2009; Bogdanov 2006; Mullin *et al.* 2010; Wallner 1999).

Le tau-fluvalinate n'est pas inoffensif chez les abeilles et affecte la santé des castes reproductrices. Dans une étude, les reines exposées à des doses élevées de tau-fluvalinate ont été plus petites que les reines non traitées (Haarmann *et al.* 2002). Dans des cages à reine, l'exposition par contact pendant 3 jours à 1 % de tau-fluvalinate a entraîné une mortalité significative chez les ouvrières accompagnatrices et augmenté la supersédure chez les reines. Une exposition pendant 7 jours a entraîné une mortalité significative chez les reines (Currie 1999).

Dans les colonies traitées avec l'Apistan<sup>®</sup>, le pourcentage de mâles émergents (86 %) a été significativement moins important que dans les colonies non traitées (97 %). Cependant, dans les deux cas, le taux de survie a été supérieur à celui des colonies infestées par *Varroa* (59 %). Une diminution du poids des faux-bourçons et de plusieurs glandes a été observée dans les colonies infestées par *Varroa* et dans les colonies traitées avec l'Apistan<sup>®</sup>. Les faux-bourçons exposés au tau-fluvalinate pendant leur développement ont moins survécu à la période de maturité sexuelle que les faux-bourçons non exposés ; leur poids était inférieur et leur production de sperme moindre (Rinderer *et al.* 1999).

Les conséquences pratiques de l'exposition des faux-bourçons au tau-fluvalinate semblent limitées, les faux-bourçons exposés ayant les mêmes capacités reproductrices que les non exposés (Sylvester *et al.* 1999).

Trois expérimentations ont été conduites sur des reines et des ouvrières pour évaluer les effets de l'Apistan<sup>®</sup>. Des ouvrières placées dans des paquets d'abeilles (chaque groupe pesant 1,4 kg) ont été traitées pendant 5 jours avec une lanière (de 2,5 x 13 cm) de tau-fluvalinate (à 2,5 %), sans augmentation de mortalité. Les reines en ponte après hivernage (n = 30) et des reines récemment accouplées (n = 60) ont été traitées, pendant 5 jours, dans des cages de Benton avec de l'Apistan<sup>®</sup> (tablettes Apistan<sup>®</sup> reines, 1%) : toutes les mortalités de reines ont été observées aux 4<sup>ème</sup> et 5<sup>ème</sup> jours de traitement, donc au-delà de la durée de traitement recommandée de 3 jours. Aucun groupe de reines traitées n'a présenté une augmentation significative de mortalité. Cependant, dans le second essai, les ouvrières ont présenté une augmentation significative de mortalité pendant le traitement. Aucune différence n'a été observée concernant l'acceptation des reines, la viabilité du couvain ou les taux de supersédure, deux à six mois après exposition (Pettis *et al.* 1991).

Initialement, le tau-fluvalinate était très efficace pour contrôler le *Varroa*, mais une résistance est apparue dans de nombreuses populations de ce parasite (Lodesani *et al.* 1995). Cette résistance est due, au moins en partie, à une mutation des canaux sodiques voltage-dépendants qui leur confère une affinité de fixation réduite pour le tau-fluvalinate (Wang *et al.* 2002). Malgré une baisse d'efficacité, le tau-fluvalinate est encore utilisé pour contrôler le *Varroa* en Europe et aux Etats-Unis (Elzen et Westervelt 2002; Macedo *et al.* 2002; Rosenkranz *et al.* 2010).

Enfin, il est important de noter que le tau-fluvalinate est largement utilisé en agriculture comme insecticide. De ce fait, sa présence dans les matrices apicoles est due au traitement acaricide volontaire de l'apiculteur et/ou aux traitements externes à la ruche qui contaminent le pollen et/ou le nectar. Cette situation a été démontrée par Paradis *et al.* (2013) ayant analysé le nectar collecté par les butineuses au cours du printemps en Vendée. Alors que les ruches n'avaient reçu aucun

traitement sanitaire au *tau*-fluvalinate, des teneurs jusqu'à 69,2 µg/kg ont été mesurées dans le miel frais.

- **Amitraze (Apivar®)**

L'amitraze est un pesticide de la famille des formamidines enregistré pour la première fois en 1992 aux Etats-Unis sous le nom commercial de Miticur®, la substance active étant incorporée dans des lanières en plastique suspendue entre les cadres de couvain (PAN 2009). Toutefois, le produit a été retiré du marché en 1994, des apiculteurs ayant rapporté des pertes de colonies suite aux traitements (PAN 2009). Cette décision a été prise en l'absence de preuve permettant de conclure que le produit avait entraîné ces pertes (PAN 2009). En Europe, les lanières d'amitraze (Apivar®) ont été autorisées en 1998 pour le contrôle de *Varroa*.

L'amitraze est un agoniste octopaminergique chez les arthropodes (Evans et Gee 1980). Par conséquent, il peut agir sur le comportement des abeilles. Des taux élevés d'octopamine dans le cerveau des abeilles ont été associés à une augmentation des comportements exploratoires/ de butinage. De plus, les jeunes abeilles nourries avec de l'octopamine ont commencé plus volontiers à butiner que les abeilles non traitées (Schulz et Robinson 2001). Les abeilles butineuses traitées avec l'octopamine ont augmenté la valeur des ressources rapportées lorsqu'elles ont communiqué par des danses (Barron *et al.* 2007).

Une toxicité aiguë de l'amitraze a également été observée chez des larves ayant présenté une apoptose plus importante des cellules de l'intestin moyen après avoir été exposées à une solution d'amitraze (Gregorc et Bowen 2000).

Aux Etats-Unis, des populations de *Varroa* présentent une résistance à l'amitraze, possiblement du fait d'une détoxification à médiation estérasiq ue élevée (Sammataro *et al.* 2005). Le mécanisme de résistance au *Varroa* peut être similaire à la résistance à la détoxification de l'amitraze observée dans certaines populations de tiques de bovins (Li *et al.* 2005).

L'amitraze est relativement peu toxique chez les abeilles (Briggs 1992; Thomson 1983). La DL50 est de 12 µg/abeilles par ingestion et de 3,6 mg/L par pulvérisation directe (The Agrochemicals Handbook Third Edition 1994).

- **Coumaphos**

La faible toxicité du coumaphos sous forme de Périzin® (produit retiré du marché) chez les abeilles a été établie par le fabricant, avec une DL50 de 14,39 µg/ abeilles (Klochko *et al.* 1994). Avec le Périzin®, une augmentation de la mortalité des abeilles adultes a été estimée à 15,7 abeilles/jour au-delà de 7 jours.

Le coumaphos est un pesticide organophosphoré utilisé pour le contrôle du *Varroa* et le traitement du petit coléoptère des ruches *Aethina tumida*. Dans l'Union européenne, mais pas en France, seules les lanières de Checkmite+® sont autorisées pour le contrôle du *Varroa*. Ces lanières, contenant environ 600 mg de coumaphos, sont suspendues entre les cadres de couvain pendant 6 semaines. Le coumaphos, ou son métabolite bioactif l'oxone de coumaphos, agit en inactivant l'acétylcholinestérase, interférant ainsi avec l'influx nerveux.

Initialement, le coumaphos s'est avéré efficace pour traiter des populations de *Varroa* résistantes au *tau*-fluvalinate (Elzen *et al.* 2000). Cependant, dès 2001, des populations de *Varroa* résistantes au coumaphos ont été détectées (Elzen et Westervelt 2002; Pettis *et al.* 2004; Spreafico *et al.* 2001). Le mécanisme de résistance du *Varroa* au coumaphos est inconnu, bien qu'un mécanisme de détoxification à médiation estérasiq ue ait été suggéré (Sammataro *et al.* 2005). Cette résistance pourrait relever de mécanismes impliqués dans la résistance de tiques bovines, *Boophilus microplus*, qui inclut une insensibilité à l'acétylcholinestérase et un métabolisme de détoxification accru (Li *et al.* 2005).

Les abeilles supportent des doses thérapeutiques de coumaphos en partie *via* le mécanisme de détoxification par des enzymes produites par les cytochromes P450 (Johnson *et al.* 2009). Néanmoins, des effets indésirables peuvent résulter d'une exposition au coumaphos. Ainsi, des jeunes larves d'abeilles ont été transférées dans des cupules contenant des concentrations connues de coumaphos (0 à 1 000 mg/kg). Ces larves ont été placées dans des colonies sans reines et examinées 10 jours plus tard pour déterminer le taux de rejet ou d'acceptation indiqué



par une cellule reine scellée. Aucune reine n'a réussi à se développer à 1 000 mg/kg, et plus de 50% des cellules reines ont été rejetées à une concentration de 100 mg/kg. De plus, les reines ayant survécu à une exposition de 100 mg/kg de coumaphos ont présenté un poids significativement inférieur à celui des reines témoins (Pettis *et al.* 2004). Des reines exposées chroniquement à 100 mg/kg de coumaphos incorporé dans de la cire d'abeille ne se sont pas développées (Collins *et al.* 2004).

Les reines en développement dans des colonies traitées avec une seule lanière imprégnée de coumaphos pendant plus de 24 h ont présenté un taux de mortalité élevé. Plusieurs reines ont présenté des effets sublétaux, notamment des anomalies physiques et des comportements anormaux. Les reines exposées au coumaphos présentaient un poids significativement inférieur au poids des reines du groupe témoin. Le poids de leurs ovaires était inférieur à celui des reines du groupe témoin (Haarmann *et al.* 2002).

La teneur moyenne en résidus de coumaphos dans des échantillons d'abeilles provenant de 120 ruches françaises dans des conditions de plein champ a été de 1 545,6 µg/kg. Il n'y avait pas de lien direct entre les niveaux de résidus détectés dans les abeilles et autres matrices et les mortalités des colonies (Chauzat *et al.* 2009).

Un rucher peuplé de colonies d'*A. mellifera carnica* a connu des troubles 4 h après la mise en place de lanières de coumaphos (Checkmite+®) : les abeilles ont quitté les ruches, volé intensément autour, se sont rassemblées devant la planche d'envol et sont tombées dans l'herbe devant les ruches. Les ouvrières se rassemblaient en petits groupes de 10 à 40 abeilles, et mouraient autour des ruches traitées, les ailes étendues et l'abdomen incurvé, tremblant. Les abeilles étaient également rassemblées à l'arrière des ruches, à leur entrée. Les cadres de couvain n'étaient pas correctement couverts d'ouvrières et des ouvrières mortes étaient trouvées au fond de la ruche. Les quantités de coumaphos trouvées dans des ouvrières prélevées dans les chambres de couvain, les compartiments à miel et devant les ruches ont été de 1 771, 606 et 514 µg/kg respectivement. La recherche de coumaphos s'est révélée négative chez des ouvrières issues de colonies non traitées. Les populations d'abeilles adultes ont été réduites d'environ un tiers dans les colonies traitées (Gregorc 2012).

La viabilité du sperme a été plus faible chez des faux-bourdons traités avec du coumaphos utilisé aux doses recommandées par le fabricant (Burley *et al.* 2008). L'exposition des faux-bourdons au coumaphos pendant leur développement et leur maturité sexuelle diminue significativement la viabilité du sperme pendant les six semaines d'observation. La viabilité a significativement baissé dès le premier prélèvement. Elle a en outre diminué significativement de la 5<sup>ème</sup> à la 6<sup>ème</sup> semaine pour tous les traitements utilisés (*tau*-fluvalinate, thymol) et chez les contrôles.

### 3.1.2.5.2 Produits d'origine naturelle

#### • Thymol (Apilife Var®, Apiguard®, Thymovar®) et huiles essentielles

Les varroacides à base de produits naturels (Colin 1990; Imdorf *et al.* 1999a) se sont développés lorsque l'efficacité des pesticides synthétiques a diminué (Rosenkranz *et al.* 2010).

Le thymol et le menthol, composants monoterpénoïdes d'huiles essentielles, sont utilisés pour contrôler *Varroa* et l'acararien des trachées, respectivement. Le thymol est le composant principal des présentations Apilife Var® (plaquettes), Apiguard® (gel) et Thymovar® (éponge ou plaquette).

Les varroacides à base d'huiles essentielles sont des additifs alimentaires « généralement reconnus comme sûrs » ("*generally recognized as safe*" - GRAS) pour la consommation humaine (Quarles 1996). Cependant, les monoterpénoïdes comme le thymol et le menthol ne sont pas forcément sûrs pour les abeilles puisque, dans les plantes, ils ont un rôle de pesticides à large spectre (Isman 2006). En effet, parmi tous les terpénoïdes testés par fumigation chez les abeilles, le thymol et le menthol ont fait partie des plus toxiques (Ellis et Baxendale 1997). Ces monoterpénoïdes tuent probablement les *Varroa* en se liant à l'octopamine (Enan 2001) ou aux récepteurs GABA (Priestley *et al.* 2003).

Les niveaux de résidus dans la ruche peuvent résulter du type, du nombre de traitements et du délai entre la fin du traitement et le prélèvement. Du fait de ses propriétés lipophiles, le thymol s'accumule préférentiellement dans la cire : 662-4 753 mg/kg (Bogdanov *et al.* 1998a) et 21,6–147,7 mg /kg (Floris *et al.* 2004). Plusieurs études ont montré que le thymol pouvait aussi

s'accumuler dans le pollen, à 0,037-39,7 mg/kg (Rennich *et al.* 2012), et le miel, à 2,07–7,54 mg/kg (Bogdanov *et al.* 1998a), 0,4–8,8 mg/kg (Floris *et al.* 2004), 0,75–8,2 mg/kg (Adamczyk *et al.* 2005) et 0,62–2,65 mg/kg (Nozal *et al.* 2002). Le pollen et le miel sont les principaux composants de l'alimentation des larves, mais le risque d'exposition des larves au thymol reste hypothétique. Toutefois, une étude en plein champ a montré que l'Apiguard® affectait l'expression de gènes impliqués dans la détoxification, l'immunité et le développement d'abeilles adultes à un niveau supérieur par rapport au tau-fluvalinate (Boncristiani *et al.* 2012).

Le thymol constitue une alternative intéressante aux produits de synthèse pour le contrôle du *Varroa*. Cependant, il s'accumule dans les produits de la ruche et est suspecté d'entraîner des effets indésirables dans les colonies, en particulier sur les larves. Les effets d'une exposition aiguë et chronique au thymol sur des larves élevées *in vitro via* de la nourriture contaminée ont été étudiés et comparés à l'exposition larvaire théorique basée sur la quantité de pollen et de miel consommée par les larves pendant leur développement.

Les essais de laboratoire ont montré que la DL50 - 48 h du thymol introduit dans l'alimentation des larves était de 0,044 mg/larve. La CL50 – 6 j était de 700 mg/kg d'aliment. Une diminution significative de la survie et du poids des larves a été observée à partir de 500 mg thymol/kg d'aliment ( $P < 0,0001$ ). Enfin, l'expression de la vitellogénine, qui atteint un maximum au 5<sup>ème</sup> stade larvaire, est retardée chez les individus exposés à 50 mg de thymol/kg d'aliment ( $P < 0,0006$ ). Ces résultats sont 10 fois supérieurs au niveau d'exposition théorique. En se basant sur les niveaux de résidus de thymol trouvés dans le miel et le pollen, ces résultats suggèrent que la contamination des aliments par le thymol ne représente pas un risque notable pour les premiers stades larvaires (Charpentier *et al.* 2014b).

Mattila *et al.* (2000) ont appliqué de l'Apiguard® dans des colonies pour déterminer l'effet du traitement sur du couvain operculé avant application (mortalité larvaire) et sur des abeilles adultes. Lorsque l'Apiguard® a été appliqué après operculation ou quand les larves avaient 4-5 jours, l'émergence des adultes qui a suivi a été très importante, chez les colonies traitées (95,5 – 100 %) et non traitées (92,3-100 %). Une mortalité plus élevée a été observée chez les jeunes larves (de moins de 3 jours) dans les colonies traitées (74,4-87,0 %) que dans les colonies non traitées (89,7-95,2 %). Les adultes survivants n'ont pas été affectés par le traitement à l'Apiguard®.

Bien qu'étant des produits d'origine naturelle, ces composés peuvent avoir des effets délétères sur les abeilles : un traitement par du thymol peut induire l'élimination de couvain (Floris *et al.* 2004; Marchetti *et al.* 1984) et une augmentation de la mortalité des reines (Whittington *et al.* 2000).

Durant une expérimentation avec l'Apilife Var®, une mortalité importante d'abeilles n'a pas été observée (Imdorf *et al.* 1994). Cependant, lors d'utilisation incorrecte, un surdosage peut entraîner des pertes d'abeilles importantes. Il peut arriver que des petites quantités de couvain situées près des plaquettes soient éliminées par les abeilles (Imdorf *et al.* 1995a).

Les effets secondaires chez les abeilles après application du Thymovar® ont été plus sévères que ceux observés avec l'Apilife Var® et l'Apiguard®. Dans toutes les ruches testées, l'enlèvement de couvain et de miel juste à côté du site d'application du Thymovar® a été observé. De plus, dans les ruchers situés au nord de l'Italie, une diminution marquée des populations dans les colonies et des perturbations sévères des abeilles ont été enregistrées. En particulier, dans un rucher, l'essai a été interrompu du fait des réactions sévères des abeilles au traitement (élimination massive du couvain, interruption de la ponte, diminution de la population d'abeilles adultes) (Baggio *et al.* 2004).

Imdorf *et al.* (1995b) ont étudié les relations dose-réponse entre plusieurs substances acaricides volatiles et les mortalités d'abeilles et d'acariens. Pour chaque test, deux cages (de type Liebefeld) ayant chacune 100 abeilles et 20 à 40 *Varroa* ont été exposées à de l'air contaminé par les acaricides à des concentrations différentes. Au bout de 72 h, un comptage des abeilles et des *Varroa* morts a été réalisé. Des concentrations de 5 à 15 µg/L pour le thymol, de 50 à 150 µg/L pour le camphre et de 20 à 60 µg/L air pour le menthol ont permis d'obtenir une mortalité de *Varroa* d'environ 100 % sans perte notables d'abeilles. Une concentration de 240 µg/L d'eucalyptol a entraîné 100 % de mortalité pour le *Varroa*, mais également 25 % de mortalité chez les abeilles. Le thymol s'est avéré être le principal composant varroacide de l'Apilife Var dans différents type de ruches. Le camphre et le menthol possèdent également les caractéristiques d'un varroacide

efficace. En revanche, l'eucalyptol est peu approprié pour le traitement du *Varroa*, car son taux d'évaporation est difficile à contrôler ; de plus, une faible différence a été observée entre sa toxicité pour *Varroa* et pour les abeilles.

Concernant les huiles essentielles, Hoppe (1990) a évalué la toxicité d'huiles essentielles pour les abeilles en plaçant des petites cages de 20 abeilles dans un récipient en verre de 3-4 L fermé contenant 10 µL d'huile essentielle pure. La mortalité des abeilles et de *Varroa* a été évaluée à 24, 48 et 72 h. Après 72 h, 24 huiles essentielles ont entraîné un taux de mortalité de *Varroa* supérieur à 90 %. Parmi elles, seules neuf ont induit un taux de mortalité chez les abeilles inférieur à 10 %. Après application topique, seules trois huiles ont induit le même taux de mortalité, avec un effet maximal observé à 48 h. Ceci suggère que l'évaporation passive est la forme d'application la plus appropriée pour les huiles essentielles et leurs composés. Lors d'un autre test de toxicité, 1 mL d'une solution d'acétone aqueuse contenant 0,5-20 % d'huiles essentielles a été pulvérisé sur des abeilles en cage. Seules des concentrations élevées d'huile de wintergreen ont entraîné une mortalité élevée de *Varroa*, tout en étant bien tolérées par les abeilles. Parmi 55 huiles essentielles, seule cette huile de wintergreen a été choisie pour des essais en plein champ.

Kraus (1990) a étudié les mortalités d'abeilles et d'acariens après exposition à des huiles de marjolaine, de cannelle, de clou de girofle, de citronnelle et de lavande. Dix abeilles, portant chacune un acarien, ont été placées dans un gobelet avec un morceau de cire contenant 0,1, 1 ou 10% d'une huile essentielle. La mortalité des abeilles et des acariens a été évaluée après 3 jours. L'huile de clou de girofle à 1% dans de la cire a entraîné une mortalité d'acariens de plus de 80 %, avec un taux de mortalité d'abeilles identique à celui des abeilles non traitées ; à une concentration de 10%, les mortalités d'abeilles et d'acariens ont été proches de 100 %. L'application d'huile de marjolaine à 10 % a induit une mortalité de 100 % chez les acariens et de 20 % chez les abeilles, taux non significativement différent du contrôle.

Bunsen (1991) a testé la tolérance des abeilles aux huiles de lavande, de mélisse, de wintergreen, d'aiguilles de sapin, de pins de montagne, de Neem, ainsi qu'au citral. Dans des cages de 20 abeilles, 300 µL d'acétone contenant 0,1, 1 ou 10 % d'huile se sont évaporés d'un papier filtre. Le comportement des abeilles a été observé pendant 7 heures. Toutes les concentrations de citral, ainsi que les seules concentrations élevées d'huiles de lavande et de mélisse, ont perturbé le comportement des abeilles. Les autres huiles n'ont pas induit d'effet. Une mortalité élevée du couvain a été observée après application de bergamote, de cannelle, de fenouil, d'aiguille de sapin, nérolidol, sarriette, thym, anéthol, linalool, acétate de linalyle, octénol et terpinéol.

D'autres monoterpènes ont été testés (ALP 2006; Imdorf *et al.* 1999a) selon le même type d'essai. A des concentrations de 400 - 1 000 µg p-cymène, 120 - 260 µg d' $\alpha$ -thuyone et 30 - 100 µg d'isopinocampone, une mortalité de près de 100 % a été observée chez les acariens, accompagnée d'une bonne tolérance chez les abeilles. L'isopinocampone est le composant principal de l'huile d'hysope. L'exposition à de l' $\alpha$ -terpinène a entraîné une mortalité élevée chez les acariens et les abeilles. Le limonène et l' $\alpha$ -pinène ont induit peu de mortalités, chez les acariens comme chez les abeilles, y compris à des concentrations élevées.

- **Acides organiques (acide formique, acide oxalique)**

Deux acides organiques, l'acide formique et l'acide oxalique, sont des possibilités intéressantes de lutte contre *Varroa*, car ils sont présents naturellement dans le miel et ont une action surtout varroacide (Bogdanov 2006; Rademacher et Harz 2006).

- ✓ Acide formique

L'usage de l'acide formique est ancien (Stoya *et al.* 1986). Actuellement il est autorisé dans plusieurs pays européens, dont la France depuis 2014, comme varroacide, présenté sous forme liquide ou de bloc à évaporation lente et agissant par fumigation (CMDv 2013). Cet acide agit probablement sur *Varroa* en inhibant le transport des électrons dans les mitochondries et, par conséquent, le métabolisme énergétique (Keyhani et Keyhani 1980) ; il peut induire une excitation des neurones des arthropodes (Song et Scharf 2008). L'acide formique peut avoir des effets délétères sur les abeilles en réduisant la longévité des ouvrières (Underwood et Currie 2003) et en altérant la survie du couvain (Fries 1991).

Les pertes de reines ont constitué un sérieux problème lors des premières utilisations de l'acide formique, notamment avec les préparations extemporanées « maison ». Actuellement, grâce aux méthodes d'applications modernes, ces pertes sont devenues exceptionnelles. Cependant, des troubles lors de l'ouverture du couvain ou de l'éclosion des jeunes abeilles ne peuvent être totalement exclus. Ces troubles dépendent de la température ambiante et de la distance entre le couvain et le dispositif d'évaporation. Dans les conditions observées en Europe, une perte modérée de couvain n'a pas d'effet négatif sur l'hivernage des colonies (Imdorf *et al.* 1999b).

✓ Acide oxalique

L'acide oxalique est autorisé en tant que médicament vétérinaire dans plusieurs Etats membres de l'Union européenne et en Suisse, mais pas en France à ce jour. Il peut être administré par dégouttement d'une solution sucrée entre les cadres (Mutinelli *et al.* 1997) ou par évaporation (Varro 2007). Le mode d'action de l'acide oxalique chez le *Varroa* n'est pas connu, cependant il nécessite un contact direct (Aliano et Ellis 2008), d'où une meilleure efficacité en l'absence de couvain.

Le traitement répété de colonies avec cet acide peut entraîner une mortalité plus importante des reines et une diminution de couvain operculé (Higes *et al.* 1999). Dans les intestins moyens d'abeilles nourries avec de l'eau sucrée contenant de l'acide oxalique, un niveau élevé de mort cellulaire a été observé (Gregorc et Smodiš Škerl 2007). Cependant, dans des conditions de plein champ, les abeilles évitent généralement de consommer du sirop contenant cet acide (Aliano et Ellis 2008).

L'acide oxalique est facilement disponible et peu coûteux partout dans le monde. Il n'a pas d'AMM en France, mais il existe une autorisation pour l'apiculture biologique pour le contrôle de *Varroa* (DGAL/SDSPA/N2004-8136, 12 mai 2004 : « le vétérinaire peut prescrire une préparation magistrale vétérinaire à base d'acide oxalique en apiculture biologique, sans qu'il soit obligé de juger au préalable de l'inefficacité des médicaments allopathiques chimiques de synthèse titulaires d'une AMM »). La facilité d'obtention de cet acide à partir de nombreuses sources n'a pas incité les fabricants à entamer une procédure d'enregistrement du produit longue et coûteuse (Johnson *et al.* 2010).

La concentration d'acide oxalique dans le rectum, les tubules de Malpighi, le tractus digestif et l'hémolymphe des abeilles est fortement influencée par le mode d'administration, topique ou oral. Il a été démontré que l'acide oxalique traversait la kératine par voie topique (Nozal *et al.* 2003).

La toxicité de différentes concentrations de dihydrate d'acide oxalique en solution aqueuse et sucrée a été testée chez *Varroa destructor* et chez les abeilles (*Apis mellifera*) par des tests d'immersion d'abeilles en cagettes et en pulvérisant des abeilles dans des colonies avec et sans couvain (Toomemaa *et al.* 2010). Une solution aqueuse à 0,5 % d'acide oxalique a permis de contrôler efficacement *Varroa* sans toxicité pour les abeilles, alors que des concentrations plus élevées (1 et 2 %) d'acide oxalique ont été très toxiques pour les abeilles. Les tests d'immersions dans des solutions à 0,1% d'acide oxalique ont montré une action acaricide en solution aqueuse ( $59,9 \pm 3,7$  %) et dans une solution de sucrée à 50% ( $71,1 \pm 4,2$  %). Des concentrations de 0,2 – 0,5 % se sont révélées très efficaces. L'acide oxalique dans la solution sucrée s'est avéré plus toxique pour les abeilles qu'en solution aqueuse. La pulvérisation d'une solution d'acide oxalique à 0,5 % (25 mL par cadre) en mai 2003 et en avril 2004 a montré une efficacité de 99,01-99,42 % dans le contrôle de *Varroa*. La plupart des acariens sont tombés après la première pulvérisation. En automne, une ou deux pulvérisations de solution à 0,5 % d'acide oxalique sur des colonies ayant peu de couvain operculé ont permis de contrôler efficacement *Varroa* ( $92,94 \pm 0,01$  % et  $91,84 \pm 0,02$  %, respectivement) sans toxicité notable chez les abeilles. Dans cette étude, cinq pulvérisations d'acide oxalique à 0,5 % ont été appliquées en avril 2004 avec une efficacité similaire ( $99,42 \pm 0,10$  %). La plupart des acariens ( $647,1 \pm 154,3$  soit 78,3 %) sont morts dans les 2 jours suivant la première application, moins sont morts dans les 2 jours suivant la 2<sup>ème</sup> pulvérisation ( $139,6 \pm 23,7$ , soit 16,9 %) et très peu après les pulvérisations suivantes. Toutefois, quatre des 11 colonies testées ont connu un affaiblissement très important, indiquant une toxicité du traitement pour les abeilles. Un affaiblissement notable a été observé après les 4<sup>ème</sup> et 5<sup>ème</sup> pulvérisations, surtout au bout de 12 jours. Le matin suivant la 3<sup>ème</sup> application, un

nombre important d'abeilles mortes (20 – 50) a été recensé devant l'entrée de certaines colonies testées. Après les 4<sup>ème</sup> et 5<sup>ème</sup> pulvérisations, la plupart des colonies testées avaient beaucoup d'abeilles mortes à l'entrée des ruches. Dans certaines colonies, des abeilles ont pu être observées présentant des signes d'intoxication, *i.e.* tombant et rampant devant la ruche.

### 3.1.2.6 Polluants industriels

Lors de ses différents voyages, la butineuse entre obligatoirement en contact avec les xénobiotiques industriels qui contaminent les différents milieux qu'elle visite. Ces substances, organiques ou inorganiques, sont retenues à la surface de son corps (*i.e.* cuticule, soies, pattes) et/ou absorbées pouvant, selon leur nature et leur toxicité, provoquer la mort de l'insecte à court ou long terme ou s'accumuler dans son organisme (Hladun *et al.* 2013; Raes *et al.* 1992). Ces polluants, de nature variée, sont souvent rapportés à la ruche et peuvent contaminer les autres membres de la colonie par contacts directs, trophallaxie, etc. Ainsi, Smith *et al.* (2002) ont identifié près de 200 molécules industrielles volatiles et semi-volatiles dans l'atmosphère des ruches. De la même façon, selon leurs propriétés physico-chimiques, en particulier leur lipophilie, les xénobiotiques sont également susceptibles de s'accumuler dans les autres individus peuplant la ruche mais aussi dans la cire, le miel et le pollen. C'est le cas des hydrocarbures aromatiques polycycliques ou HAP (Amorena *et al.* 2009; Ciemniak *et al.* 2013; Devillers et Budzinski 2008; Lambert *et al.* 2012; Lourdes *et al.* 2014; Perugini *et al.* 2009), des polychlorobiphényles ou PCB (Anderson et Wojtas 1986; Devillers et Budzinski 2008), et des retardateurs de flamme bromés ou RFB (Mohr *et al.* 2014; Wang *et al.* 2010). Cependant, aucun lien n'a été formellement établi entre leur présence et des effets toxiques avérés.

### 3.1.2.7 Autres : OGM

#### 3.1.2.7.1 Introduction

Les principales propriétés acquises par les plantes transgéniques sont (1) de résister à l'action de certains herbicides, (2) de résister aux insectes ravageurs et (3) d'acquérir de nouvelles caractéristiques agronomiques. Ainsi, les modifications géniques du colza ne visent pas une résistance aux insectes, mais peuvent permettre une tolérance aux herbicides, une modification de leur composition en acides gras ou une production de mâles stériles. Malone et Pham-Delègue (2001) ont rapporté des effets, sur les abeilles et bourdons, des produits de transgènes suivants :

- les toxines produites par *Bacillus thuringiensis* (Bt) qui se déclinent en divers phénotypes selon la souche d'origine (Cry1 Ac, Cry1 Ab, Cry 9c...);
- les inhibiteurs de protéases à sérine (Bowman-Birk soybean trypsin inhibitor (BBI), Aprotinin, Kunitz soybean trypsin inhibitor (SBTI), Potato proteinase inhibitor (POT-1 et -2), Cowpea trypsin inhibitor (CpTI), à cystéine (Oryzacystatin (OC-1), Chicken egg white cystatin);
- d'autres produits de transgènes (Chitinase,  $\beta$ -1,3 glucanase, avidine, résistance au glyphosate, lectines).

Les principales cultures concernées par ces transgènes sont le soja, le maïs, le cotonnier et la pomme de terre. D'autres cultures telles que les tomates, le tabac, la luzerne, le riz, la pomme, le kiwi, le raisin et le melon peuvent être également concernées par ce procédé. Certaines de ces cultures ont besoin des abeilles pour assurer leur pollinisation (pommes, kiwi, tomates) ou pour la production de semences (colza). D'autres, n'ayant pas recours aux insectes pour la pollinisation, jouent un rôle important dans l'alimentation des abeilles (cotonnier, maïs, pomme de terre). Malone et Pham-Delègue (2001) distinguent les effets directs des produits des transgènes des effets indirects. Les effets directs sont les conséquences sur l'organisme des produits du transgène après leur ingestion par l'insecte. Concernant les abeilles, le pollen constitue le principal vecteur d'exposition compte tenu de sa forte teneur en protéines comparé au nectar. Chez les abeilles adultes, la consommation de pollen est maximale durant les 10 premiers jours, les apports en protéines étant à ce stade nécessaires à la maturation des glandes hypopharyngiennes. Chez les larves, Babendreier *et al.* (2004) ont montré que la consommation de pollen de maïs est de l'ordre de 1,5 à 2,0 mg par individu, soit 5 % des protéines totales. L'expression des produits des

transgènes dans le pollen est variable selon l'espèce végétale, le produit, et la nature du promoteur. A titre d'exemple, dans le cas du maïs, selon le type de promoteur, les toxines Bt peuvent être mesurées dans le pollen à des concentrations allant de 260 à 418 ng de toxine par mg de pollen. Le même gène placé sous le contrôle d'un autre promoteur ne produira pas de quantités de toxines mesurables (Malone et Pham-Delègue (2001), selon Kozeil *et al.*, 1993).

Les effets indirects, sont consécutifs à une modification de la plante liée au transgène, et induisant une perte d'attractivité ou d'appétence. Ne pouvant être considéré comme réel facteur de stress, ceci d'autant plus qu'une diminution d'appétence liée à la présence d'une substance toxique peut s'avérer être un facteur protecteur, nous ne considérerons dans ce chapitre que les effets directs. Nous présenterons les résultats obtenus à partir de différents types de transgènes : le Bt, inhibiteurs de protéase (à sérine et autres), ainsi que d'autres transgènes (comme les chitinases, le glyphosate...) chez des espèces non-cibles du genre *Apis* et *Bombus*.

#### 3.1.2.7.2 Effets liés à l'exposition aux toxines de Bt.

- ***Apis mellifera***

Les toxines Bt, utilisées comme biopesticide contre certains ravageurs tels que des Lépidoptères ou des Coléoptères, sont connues pour leur innocuité vis-à-vis des Hyménoptères. Les principales plantes concernées par ces produits de transgène sont le maïs, le coton et la pomme de terre. Dans leur revue, Malone et Pham-Delègue se réfèrent à cinq publications qui relatent des travaux sur *Apis mellifera* en laboratoire sur individus larves et adultes et en plein champ sur colonies (Anon 2000; Arpaia 1996; Malone *et al.* 1999; Malone *et al.* 2001; Sims 1995). Ces travaux s'intéressent aux effets létaux, ainsi qu'à certains effets sublétaux tels que la croissance, la consommation et à l'activité de vol. Aucun de ces travaux ne révèle le moindre effet à des expositions pouvant atteindre par exemple 1 700 ou 10 000 fois les niveaux de concentration mesurés respectivement dans des pollens ou des nectars de coton transgénique. Plus récemment, Duan *et al.* (2008) ont effectué une méta-analyse à partir de 25 publications sélectionnées sur la base de six critères : travaux réalisés avec des protéines actives sur Lépidoptères ou Coléoptères, ingérées par *Apis mellifera*, en laboratoire, avec mesure de mortalité, en comparaison avec un témoin non traité, mesure de variabilité de la réponse. Cette étude conforte les conclusions de la revue précédente en notant l'absence totale d'effet léthal de ces toxines sur l'abeille domestique qu'il s'agisse de larves, de nymphes ou d'adultes. De nombreuses études plus récentes conduites en laboratoire et en plein champ, sur larves et adultes, non relatées dans ces deux revues, conduisent à des conclusions similaires, à savoir l'absence d'effet des protéines Bt sur la mortalité, le développement des colonies, des larves, le comportement alimentaire, la flore intestinale, les capacités de mémorisation, le développement des glandes hypopharyngiennes (Babendreier *et al.* 2005; Dai *et al.* 2012; Geng *et al.* 2013; Han *et al.* 2010; Hendriksma *et al.* 2012; Hendriksma *et al.* 2011; Hendriksma *et al.* 2013; Lipinski *et al.* 2008; Liu *et al.* 2009; Malone *et al.* 2004; Ramirez-Romero *et al.* 2008; Tian *et al.* 2006).

- ***Bombus***

Chez *Bombus occidentalis* et *Bombus impatiens*, une exposition à des doses réalistes de toxine Bt (Morandin et Winston 2003) n'a révélé aucun effet sur la consommation de pollen, le poids des ouvrières, le développement des colonies, la production de reines et de mâles. Une étude sur microcolonies de *Bombus terrestris* nourries avec du pollen de maïs transgénique en laboratoire (Malone *et al.* 2007) n'a révélé aucun effet de la toxine de Bt sur la survie des ouvrières, la consommation de pollen et de sirop, l'aptitude à produire des mâles ainsi que leur poids. Des microcolonies nourries avec des sirops contaminés avec 0,001% et 0,01% de toxine de Bt ont présenté un développement normal et une production de mâles non différente des témoins (Babendreier *et al.* 2008).

#### 3.1.2.7.3 Inhibiteurs de protéases

L'impact des inhibiteurs de protéases sur un insecte dépend du profil protéolytique de l'insecte ainsi que de l'activité spécifique (ou des activités) de l'inhibiteur de protéase concerné. Chez l'abeille domestique et les bourdons, les protéases à sérine sont prédominantes par rapport aux

protéases à cystéine. On peut donc s'attendre à observer chez ces espèces un effet prédominant des inhibiteurs de protéases à sérine (Malone et Pham-Delègue 2001).

- **Apis**

Dans leur revue, Malone et Pham-Delègue (2001) ont recensé plusieurs travaux mettant en évidence que les inhibiteurs de protéases à sérine peuvent inhiber les protéases de l'intestin moyen des abeilles domestiques et des bourdons. A concentrations élevées, ces substances peuvent causer une réduction de la longévité des insectes adultes. Plus récemment, Brodsgaard *et al.* (2003) ont réalisé une étude sur larves d'abeille domestique en laboratoire en exposant ces dernières par voie orale à des concentrations de SBTI variant de 0.1 à 1% de l'aliment larvaire, sachant qu'une concentration à 0,2 % correspond à un taux de présence de 1% des inhibiteurs de protéases dans les protéines totales du pollen (Malone *et al.* 2002). La concentration à 1 % rallonge significativement la durée de développement des larves, réduit le poids des adultes produits et augmente la mortalité larvaire. Chez l'adulte jeune, Babendreier *et al.* (2005) observent un effet négatif de cette molécule sur le développement des glandes hypopharyngiennes (GHP), après un nourrissage de 10 jours avec des pollens contaminés par du SBTI à 0,1 %. Sagili *et al.* (2005) observent un phénomène analogue à partir d'une concentration de 1 %, mais pas d'effet à 0,1 %. Bien que le SBTI ne soit pas détecté dans les GHP, il induit une diminution de consommation de sirop ainsi qu'une baisse d'élevage du couvain à une concentration de 1 % (Babendreier *et al.* 2005), et réduit significativement l'action enzymatique de l'intestin moyen ainsi que la survie des individus à cette même concentration (Sagili *et al.* 2005). Des résultats similaires ont été observés avec les protéines POT-1, POT-2 et BBI, qui appartiennent également au groupe des inhibiteurs de protéases à sérine (Malone et Pham-Delègue (2001), d'après Belzunces *et al.* 1994, Girard *et al.* 1998, Malone *et al.* 1998, 2000, Pham-Delègue *et al.* 2000, Sandoz 1996). Parmi les autres inhibiteurs de protéase testés sur adultes en laboratoire, Malone *et al.* (2004) n'ont montré aucun effet d'une exposition orale à l'aprotinine, inhibiteur de trypsine, à raison de 1,175 mg/g de pollen sur la survie de jeunes adultes et le développement des GHP.

Liu *et al.* (2009) n'observent pas de réduction de la survie des adultes nourris avec du pollen de coton transgénique exprimant des protéines de Bt et de CpTI. En utilisant ce même pollen, Han *et al.* (2010) ne constatent aucun effet après une exposition de 7 jours à ce mélange de protéines sur les capacités d'apprentissage révélées par le test d'extension du proboscis.

Parmi les inhibiteurs de protéases à cystéine, l'OC-1 ainsi que la Chicken egg white cystatin ont fait l'objet de tests à court (exposition sur 24h) et long terme (alimentation continue) sur abeilles adultes sans effet observé sur la longévité (Malone et Pham-Delègue (2001), d'après Girard *et al.* 1998, Sandoz 1996).

- **Bombus**

Les inhibiteurs de protéines à sérine produisent chez *Bombus* des effets analogues à ceux observés chez l'abeille domestique (Malone et Pham-Delègue 2001) à savoir : une réduction de la longévité des adultes, et une réduction de l'activité enzymatique de l'intestin moyen. Ces phénomènes sont notamment observés après une exposition à SBTI, POT-1 et POT-2. Conformément à ce qui est observé sur l'abeille domestique, l'aprotinine ne produit aucun effet sur la longévité. Plus récemment, Babendreier *et al.* (2008) ont testé des concentrations faible (0,01 %) et élevée (0,1 %) de SBTI dans du sirop proposé en nourrisseur à des colonies en compartiment de serre, ou en des microcolonies en laboratoire. Bien qu'aucun effet sur le comportement de butinage n'ait été observé sur colonies, les tests en laboratoire révèlent un effet de la SBTI à 0,1 % sur la survie, la production de mâles, et à 0,01 % sur le poids des ouvrières.

#### 3.1.2.7.4 Autres produits des transgènes

- **Apis**

L'exposition orale d'abeilles adultes à des doses de 11 µg/individu de chitinase n'a pas d'effet sur la survie à 24 et 48 h (Malone et Pham-Delègue 2001). Des injections de 1.69 µg par abeille conduisent à la même conclusion. A des concentrations de 1, 5 et 10 µg/mL de sirop, on n'observe également pas d'effet sur les capacités d'apprentissage. Des résultats similaires ont été obtenus

après ingestion par des adultes de  $\beta$ -1,3 glucanase à raison de 11  $\mu\text{g}$ /abeille, ou injection de 0,3  $\mu\text{g}$  de ce produit (Malone et Pham-Delègue (2001), d'après Picard-Nizou *et al.* 1997).

Des études préliminaires sur des jeunes adultes exposés oralement à des doses de 6,7 et 20  $\mu\text{M}$  d'avidine n'ont révélé aucun effet sur la consommation de pollen et la longévité (Malone et Pham-Delègue 2001). Des abeilles naissantes nourries durant 10 jours avec du pollen contaminé par de l'avidine à la concentration de 0,174 mg/g n'ont pas été affectées du point de vue de leur survie et du développement de leurs GHP. Par ailleurs, aucune trace de la molécule n'a été retrouvée dans cet organe (Malone *et al.* 2004).

Lehrman (2007) a testé les effets de lectines de pois (PSL) sur des larves en laboratoire, à partir de pollens collectés sur plants de colza transgéniques, incorporés à l'aliment larvaire durant toute la durée de développement à raison de 1,5 %. L'auteur a préalablement vérifié que cette concentration en pollen n'affectait pas le développement larvaire, et ont pu établir qu'elle induisait une concentration de 0,0012 % de PSL dans l'aliment larvaire. Aucun effet des deux PSL testé n'a été observé sur la mortalité, le poids et la durée de développement. Hendriksma *et al.* (2012) ont réalisé un travail similaire en exposant au 5<sup>ème</sup> jour d'élevage des larves à des doses allant de 0 à 80  $\mu\text{g}$  de GNA (*Galanthus nivalis* agglutinin). Cette lectine induit une mortalité totale des larves à la dose maximale, aucun effet n'étant observé pour des doses inférieures.

Huang *et al.* (2004) ont réalisé une étude sur les effets directs d'une exposition à des pollens de colza transgénique résistant au glyphosate. Dans une première approche, ces auteurs ont exposé des colonies à des parcelles semées de colza transgénique ou non transgénique ; dans une seconde expérience, ils ont nourri artificiellement des larves avec des pollens transgéniques ou non, puis réintroduit ces dernières dans les ruches. Dans les deux scénarii, aucun effet n'a été constaté sur les mortalités larvaire, nymphale, le poids des nymphes, la concentration de protéines dans l'hémolymphe. La première étude n'a également pas permis de mettre en évidence d'effet sur les niveaux de population adultes, bien que les conditions expérimentales soient sur certains points sujettes à critiques qui ont conduit à ce qu'elle ne soit pas validée dans le cadre de l'expertise collective CNRS-INRA<sup>30</sup> sur les plantes tolérantes aux herbicides.

- **Bombus**

Des colonies de *Bombus occidentalis* nourries avec du pollen contaminé à la concentration de 6  $\mu\text{g}$ /g de chitinase n'ont pas été affectées par ce traitement en termes de développement (quantité de couvain, nombre d'ouvrières) (Morandin et Winston 2003).

Babendreier *et al.* (2008) ont observé des effets négatifs de la GNA sur des microcolonies de *Bombus terrestris*. Cette substance rajoutée au sirop de nourrissage réduit significativement le poids des ouvrières ainsi que leur espérance de vie pour une concentration de 0,1 %. A cette même concentration, aucune descendance mâle n'est observée et la consommation de sirop est également plus faible. La production de descendance mâle est significativement affectée pour une concentration de 0,01 %.

**En conclusion**, tous les travaux portant sur les toxines Bt convergent vers le même constat, à savoir l'innocuité de ces protéines vis-à-vis des abeilles. La connaissance de cette innocuité a d'ailleurs précédé les OGM puisque les insecticides à base de Bt sont connus pour leur action spécifique sur lépidoptères et coléoptères en particulier. Il faut rappeler à ce sujet qu'une souche de Bt est commercialisée pour traiter les cadres bâtis contre la teigne.

Concernant les autres produits de transgènes, les inhibiteurs de protéases à sérine sont toxiques à des doses relativement élevées. L'expression de ces produits dans le pollen qui constitue le principal vecteur alimentaire doit être analysée au cas par cas pour juger du risque lié à l'exposition aux plantes qui expriment ces produits.

Il existe peu de travaux sur les effets sublétaux, excepté les tests d'extension du proboscis qui, pour ces produits, ne révèlent généralement pas d'incidence sur les capacités d'apprentissage. Il semblerait toutefois prudent de prendre en compte ces effets éventuels, ainsi que d'éventuels effets liés à une co-exposition à d'autres facteurs de stress.

<sup>30</sup> <http://inra.dam.front.pad.brainsonic.com/ressources/afile/223293-076bc-resource-expertise-vth-synthese.html>



### 3.1.3 Alimentation et ressources environnementales

La croissance et la survie des colonies d'abeilles sont intimement associées à la disponibilité (incluant quantité et qualité) des ressources florales sur lesquelles elles collectent le nectar et le pollen (Brodschneider et Crailsheim 2010; Haydak 1970). Le nectar floral stocké sous forme de miel est la principale source de glucides, l'aliment énergétique des abeilles, et le pollen fournit la plupart des protéines, des acides aminés et des lipides nécessaires au développement de certains tissus (corps gras, glandes hypopharyngiennes) et à l'alimentation des larves (Brodschneider et Crailsheim 2010). Ainsi les populations d'abeilles et les activités apicoles sont dépendantes des ressources environnementales et toute carence peut avoir comme conséquence immédiate un affaiblissement des colonies, notamment à cause d'une réduction significative de la production de couvain (Brodschneider et Crailsheim 2010). Sur le plus long-terme, un stress nutritionnel peut engendrer des déficiences physiologiques (Alaux *et al.* 2010b; Brodschneider et Crailsheim 2010) et pourrait ainsi affecter le seuil de résistance des abeilles à d'autres facteurs de stress. En outre, une dépopulation des colonies, due à un stress nutritionnel, peut limiter les capacités de réponse à un stress supplémentaire. Les colonies auraient alors atteint un point de non-retour au niveau de la flexibilité démographique (par exemple remplacement des butineuses ou des nourrices).

Dans cette partie, les besoins nutritionnels de la colonie seront d'abord décrits, puis les changements actuels dans la disponibilité des ressources alimentaires pouvant affecter ces besoins nutritionnels seront évoqués. Enfin, les effets potentiels de stress nutritionnels sur la santé des abeilles seront listés. Les pratiques apicoles de nourrissage sont traitées dans le paragraphe 3.1.4.

#### 3.1.3.1 Besoins nutritionnels de la colonie

Les glucides du nectar sont stockés sous forme de miel contenant principalement du fructose, du glucose et du saccharose à des teneurs très variables. Ces glucides couvrent les besoins énergétiques des abeilles nécessaires à la réalisation des différentes tâches d'entretien et de développement de la colonie. Le pollen est lui mélangé avec du nectar, des sécrétions salivaires contenant des enzymes et des microorganismes issus de l'estomac des abeilles. Ce mélange est stocké sous forme de pain de pollen produit à partir de fermentation lactique (Vasquez et Olofsson 2009). Il apporte l'essentiel des protéines et acides aminés jouant un rôle déterminant dans la production du couvain et la longévité des abeilles (voir Brodschneider et Crailsheim (2010) pour une revue). Il contient des nutriments additionnels comme les vitamines, les minéraux et les lipides mais leur importance pour la colonie est beaucoup moins connue.

Ainsi une colonie de 50 000 abeilles a un besoin annuel de 120 kg de nectar et 20 kg de pollen (Seeley 1995). Une abeille adulte a un besoin minimum de 4 mg de nectar par jour (Barker et Lehner 1974) et consomme 3 à 5 mg de pollen par jour durant les premières semaines de sa vie (Crailsheim *et al.* 1992; Pernal et Currie 2000). Enfin, une larve consomme environ 60 mg de glucides (Rortais *et al.* 2005) et 25 à 37,5 mg de protéines durant son développement, ce qui correspond à 125 – 187,5 mg de pollen (Hrassnigg et Crailsheim 2005). Pour prévenir certaines carences alimentaires, les apiculteurs fournissent à la colonie des sucres ou des suppléments protéinés mais ces ajouts ne procurent pas forcément les mêmes qualités nutritionnelles que le pollen (Cremonez *et al.* 1998; DeGrandi-Hoffman *et al.* 2008) et le nectar (Mao *et al.* 2013; Wheeler et Robinson 2014).

Enfin, les abeilles ont aussi des besoins importants et très variables en eau pour l'équilibre osmotique chez l'adulte, la préparation de la bouillie larvaire et rafraîchir la colonie pendant les mois les plus chauds. Selon la récente analyse de l'EFSA (2012a), cette quantité d'eau, difficile à estimer car variable dans le temps et selon les références, est de l'ordre de 20 à 42 litres par colonie et par année et jusqu'à 20 litres par semaine et par colonie pendant l'été.

#### 3.1.3.2 Disponibilité des ressources alimentaires

La disponibilité (incluant quantité et qualité) des ressources florales influence directement le développement et la survie des colonies. Or l'intensification agricole conduit à une réduction ou perte des aires de butinages des abeilles, de la diversité florale et des habitats naturels.

Dans la plupart des zones de grande production, les assolements sont devenus très simplifiés engendrant un déclin de la biodiversité florale, en particulier des plantes mellifères dans les zones céréalières. Le développement de monocultures conjugué à l'application d'herbicides (réduisant la diversité et l'abondance florale) engendre des périodes de disettes avant et après la période de floraison des monocultures. Dans ce cas, le nectar et le pollen sont relativement abondants mais durant une période très courte (encore faut-il qu'ils s'agissent de cultures de plantes mellifères), ce qui est un problème pour l'abeille domestique qui présente une période d'activité très étalée. Un lien potentiel entre la diminution des ressources environnementales et la perte de colonies a été suggéré aux Etats-Unis (Naug 2009). Cependant, à l'heure actuelle, il n'existe pas d'étude ayant montré un lien causal entre la disponibilité des ressources florales et les pertes de colonies. vanEngelsdorp *et al.* (2009) ont notamment reporté que les ouvrières issues de colonies atteintes de Colony Collapse Disorder ne présentaient pas d'altération des niveaux de taux de protéines (têtes, thorax et abdomen). Cela peut s'expliquer par le fait que même si cette diminution des ressources environnementales est potentiellement subie par l'apiculteur, elle peut être évitée en déplaçant les ruches sur des zones plus favorables durant certaines périodes où les colonies parviennent toutefois à trouver assez de ressources dans leur environnement pour survivre. Enfin, même s'il n'y a pas d'effet direct de la diminution des ressources sur la survie des colonies, un stress nutritif peut avoir des effets plus subtils et devenir un cofacteur de l'affaiblissement des colonies, en diminuant les seuils de tolérance à d'autres stress (Brodschneider et Crailsheim 2010; Le Conte *et al.* 2011). La présence de surfaces non cultivées et non traitées est un moyen de restaurer la diversité florale et instaurer une disponibilité continue des ressources entre les périodes de floraison des grandes cultures (Decourtye *et al.* 2011a). Ceci peut contribuer ainsi à diminuer les potentielles co-expositions telles que les traitements chimiques conjugués à une baisse de la qualité et quantité nutritive des ressources alimentaires des abeilles. Cependant ces zones restent encore peu développées dans les pratiques. Elles peuvent s'avérer pourtant cruciales lors de deux périodes clés du cycle des colonies : la préparation à l'hivernage nécessitant le stockage de réserves nutritives suffisantes pour survivre l'hiver et la reprise post-hivernale afin de promouvoir le développement des colonies.

### 3.1.3.3 Effet de la disponibilité des ressources alimentaires sur la santé des abeilles

Dans les conditions naturelles, les abeilles sont rarement confrontées à une absence totale de pollen dans leur environnement, mais font plutôt face à une variabilité dans le temps et l'espace de l'abondance, la qualité et la diversité des ressources, comme par exemple dans un environnement agricole (Odox *et al.* 2012). L'influence de ces trois niveaux sur la santé des abeilles sera abordée, mais il existe un fort biais des informations disponibles en faveur des ressources polliniques.

#### 3.1.3.3.1 Abondance

L'abondance des ressources alimentaires a un impact direct sur l'état populationnel des colonies. Si l'apport de pollen est interrompu, les abeilles maintiennent naturellement l'élevage du couvain pendant une courte période en puisant dans les réserves de pain de pollen, puis dans leurs propres réserves corporelles de protéines (les abeilles résultantes présentent cependant des carences en protéines) (Haydak 1970). Les jeunes larves, ayant profité d'un faible apport nutritif par rapport aux plus vieilles, peuvent aussi être cannibalisées afin que les nourrices se procurent des protéines pour nourrir les autres larves (Schmickl et Crailsheim 2001). L'élevage des larves peut aussi être compromis par la réduction de la taille des glandes hypopharyngiennes des nourrices en carence de pollen. Cette malnutrition des larves peut conduire à des altérations morphologiques et physiologiques des adultes (revue dans (Brodschneider et Crailsheim 2010)).

Une réduction de l'abondance et la qualité pollinique incite la colonie à modifier son effort de butinage en augmentant la proportion de butineuses de pollen (Pernal et Currie 2001) et les jeunes ouvrières deviennent butineuses à un âge plus précoce (Janmaat et Winston 2000a). De plus, dans des zones de production agricoles à paysage simplifié pauvre en ressources, les butineuses de pollen parcourent plus de distance que dans des paysages plus complexes (Steffan-Dewenter

et Kuhn 2003). Une augmentation des distances de butinage demande aussi une plus grande dépense énergétique et donc une plus grande consommation de glucides (nectar, miel). Une réduction du couvain, couplée à une augmentation de l'effort de butinage, conduit irrémédiablement à une diminution de la population de la colonie.

Au-delà des conséquences directes sur la taille de la colonie, une diminution des ressources peut aussi affecter la santé des abeilles et la tolérance à d'autres facteurs de stress. En effet, des expériences de laboratoire ont démontré l'importance de l'apport pollinique sur le métabolisme physiologique des jeunes abeilles (Alaux *et al.* 2011a; Ament *et al.* 2011). Par exemple, la production de vitellogénine, glycolipoprotéine impliquée dans la production de gelée royale (Amdam *et al.* 2003), la longévité (Seehuus *et al.* 2006) et l'immunité cellulaire (Amdam *et al.* 2004b), est réduite de manière très significative (Alaux *et al.* 2011a; Ament *et al.* 2011).

La plupart des études visant à tester l'effet de l'abondance des ressources nutritives sur la santé de l'abeille ont été réalisées selon une méthode de tout ou rien. Cependant, les abeilles sont rarement confrontées à ces cas extrêmes d'absence totale de ressources. Il est donc nécessaire de tester des apports quantitatifs intermédiaires, plus représentatifs des situations naturelles.

L'abondance des ressources pourrait aussi affecter la préparation à l'hivernage et donc compromettre la survie des abeilles durant l'hiver. En effet, la disponibilité des ressources environnementales pendant la préparation à l'hivernage apparaît comme un facteur clé pour la survie hivernale selon les apiculteurs (ITSAP). Toutefois, même si cela apparaît très implicite, cela reste à tester.

#### 3.1.3.3.2 Qualité

La qualité des ressources nutritives peut différer entre les espèces florales suggérant que certaines sont de meilleure qualité pour les abeilles que d'autres. En ce qui concerne les pollens, les teneurs en protéines, acides aminés, lipides et autres nutriments varient d'une espèce à l'autre (Herbert et Shimanuki 1978; Odoux *et al.* 2012; Roulston et Cane 2000). Il en est de même pour le nectar dont la composition et la concentration en glucides (5 à 80 %) changent selon les espèces (Baker et Baker 1982; Crane 1980; Cruden *et al.* 1983).

Ainsi tous les pollens n'ont pas la même valeur nutritive et diverses études ont démontré chez des abeilles élevées en laboratoire que leur qualité peut significativement affecter des traits de vie majeurs des abeilles comme la longévité (Di Pasquale *et al.* 2013; Maurizio 1950; Schmidt *et al.* 1987; Schmidt *et al.* 1995; Standifer 1967), le développement des glandes hypopharyngiennes (Pernal et Currie 2000; Standifer 1967) et la production de vitellogénine (Di Pasquale *et al.* 2013).

Dix acides aminés sont essentiels à l'abeille (de Groot 1953). En présence de pollens de mauvaises qualité nutritive ne contenant pas un ou plusieurs de ces acides aminés, les abeilles devraient être théoriquement affectées. Cependant, il est très probable qu'un minimum de diversité dans les approvisionnements polliniques, si elle est en quantité suffisante, compense ce phénomène de carence.

Certains acides gras ont des capacités antifongiques (*Ascosphaera apis*) et antibactériennes (loque américaine, loque européenne) *in vitro* (Feldlaufer *et al.* 1993a; Feldlaufer *et al.* 1993b; Hornitzky 2003; Shimanuki *et al.* 1992) mais ceci n'a pas été confirmé chez les larves d'abeille (Giersch *et al.* 2010).

Au-delà des effets bénéfiques, certaines ressources contiennent des nutriments toxiques pour les abeilles. C'est le cas de certains glucides (ex : galactose, lactose, stachyose, raffinose) trouvés dans le pollen, le nectar et les exsudats de certaines plantes (Barker 1977; Barker 1990; Barker et Lehner 1976). Par exemple, environ 40 % des glucides présents dans le pollen de soja sont toxiques pour les abeilles (Barker 1977). L'utilisation de supplément à base de pollen de soja doit donc être contrôlée.

#### 3.1.3.3.3 Diversité

En ce qui concerne la diversité des ressources, les abeilles ont tendance à préférer (*via* une plus grande consommation) une nutrition pollinique plurispécifique plutôt que monospécifique (Schmidt 1984), et ont ainsi une plus grande longévité (Schmidt *et al.* 1987). Cette biodiversité pollinique est bénéfique pour certains traits de l'immunocompétence, comme l'activité de la glucose oxydase

catalysant la production d'antiseptiques (peroxyde d'hydrogène) dans la gelée royale (Alaux *et al.* 2010b). Elle joue aussi un rôle de tampon lors d'un approvisionnement contenant des pollens de mauvaise qualité (pauvre en nutriments et/ou contenant des toxiques) en améliorant la longévité des abeilles (Schmidt *et al.* 1987) et la tolérance des larves et adultes à des agents pathogènes, comme le champignon *Aspergillus fumigatus* (Foley *et al.* 2012) et la microsporidie *Nosema ceranae* (Di Pasquale *et al.* 2013).

Le pollen et le nectar de fleurs, en plus d'être les principales sources de nourriture, contiennent également des composés phytochimiques et sont riches en caroténoïdes, flavonoïdes, alcaloïdes et en composés phénoliques qui ont des propriétés antioxydantes et des activités antimicrobiennes (Adler 2000; Balch et Balch 1990; Basim *et al.* 2006; Campos *et al.* 2003; LeBlanc *et al.* 2009a; Morais *et al.* 2011). La diversité des ressources nutritives dans l'environnement augmente pour les abeilles les possibilités de trouver des nutriments bénéfiques, mais aussi d'éviter ou de procurer une alternative aux composés toxiques des plantes. Un environnement agricole simplifié réduirait ces possibilités.

#### 3.1.3.4 Lacunes/perspectives

De nombreux travaux ont démontré les effets de stress nutritionnels sur la santé des abeilles mais la grande majorité a été réalisée en laboratoire, loin des conditions naturelles. Il est donc important de savoir si les effets observés en laboratoire sont transposables en conditions naturelles. A titre d'exemple, en laboratoire, les abeilles sont souvent nourries avec des pelotes de pollen alors que dans la colonie, les abeilles ingèrent le pollen essentiellement sous forme de pain d'abeilles ; ce dernier possède une composition chimique légèrement différente des pelotes avec des niveaux similaires de protéines et lipides, mais une absence d'amidon, un taux de sucre plus élevé et un pH plus faible (Herbert et Shimanuki 1978).

Dans la perspective de mieux cerner l'importance de la disponibilité des ressources alimentaires sur les colonies, il faudrait préciser (1) le lien entre la qualité/diversité des ressources alimentaires et le développement et la survie des colonies, (2) les interactions/mécanismes entre nutrition et autres cofacteurs (agents infectieux, parasitaires, chimiques), (3) le rôle de la flore intestinale, et (4) si la disponibilité des ressources alimentaires affecte la survie hivernale.

Enfin, s'il est possible de répondre à la question sur le type de ressources que les abeilles collectent dans leur environnement, il conviendrait de savoir si elles font face à des carences en ce qui concerne le développement et le maintien de leur colonie. Dans l'affirmative, il faudrait déterminer les périodes et types de carences.

#### 3.1.4 Pratiques apicoles

Tout apiculteur peut, en s'appuyant sur son savoir et son expérience, appliquer des méthodes visant à aider ses colonies d'abeilles à se développer, à conserver un bon état sanitaire et ainsi à exprimer leur potentiel de production : ce sont les pratiques apicoles. Les ouvrages relatifs à ces pratiques sont nombreux et parfois très anciens. De nos jours, ce management est devenu plus technique, et les pratiques sont devenues essentielles pour le maintien du cheptel apicole.

Ainsi, les pratiques apicoles incluent le choix des emplacements, des mesures de prévention des maladies, des choix zootechniques, *etc.* Les « *bonnes pratiques apicoles* » sont d'ailleurs définies dans un guide comme étant les pratiques de gestion de son cheptel par l'apiculteur « *visant à préserver la santé de ses colonies* » (ITSAP 2014). Néanmoins, si elles ont pour objectif de contribuer à la bonne santé des abeilles, certaines d'entre elles peuvent toutefois entraîner, dans certaines circonstances, des effets potentiellement stressants sur les colonies. En outre, certaines pratiques parfois nécessaires (ou parfois mal réalisées) constituent des facteurs de risque d'apparition de maladies. Ne seront retenues ici que les pratiques susceptibles de générer un stress ou un facteur de risque ajouté sur les colonies d'abeilles et ayant un effet potentiellement négatif sur leur santé.

Les pratiques apicoles suivent le cycle biologique annuel des colonies, qui se divise en quatre périodes : (1) la sortie d'hivernage (période de développement), (2) la période de reproduction des colonies (ou essaimage), (3) la période de préparation à l'hivernage et (4) la période d'hivernage

(cf. chapitre 2, paragraphe sur l'évolution annuelle de la population dans une colonie). L'apiculteur va donc, pour chacune de ces phases de la vie de la colonie, appliquer des mesures adaptées : aide au développement de la population, multiplication des colonies, exploitation des miellées, prévention des maladies, par exemple.

#### 3.1.4.1 Impact potentiel de certaines pratiques apicoles

La **multiplication du cheptel apicole, ou son maintien**, impose un élevage systématique. En effet, si l'apiculteur souhaite augmenter la taille de son cheptel il doit consacrer une part de son temps et/ou de son argent à l'élevage mais, étant donné les pertes (normales ou exceptionnelles) de colonies, il doit aussi pratiquer cet élevage *a minima* pour maintenir son cheptel. Les apiculteurs recourent donc soit à un auto-renouvellement de leurs colonies, soit à des achats de reines et/ou d'essaim, en France ou à l'étranger. Dans ces deux cas, les manipulations correspondantes et les effets qu'elles induisent peuvent avoir un impact sur la santé des colonies.

Dans le cas de l'élevage par l'apiculteur, la production de paquets d'abeilles ou les divisions de colonies (méthode d'élevage traditionnelle la plus répandue, après l'essaimage naturel (FranceAgriMer 2012)) vont déstructurer le superorganisme et modifier, au moins temporairement, la répartition des classes d'âges et/ou le ratio abeilles/couvain. Pour les reines, le remérage artificiel est *a priori* salubre pour une colonie dont la reine est vieillissante mais, dans le cas des reines vierges, l'interruption de ponte (délai entre le dernier œuf pondu par l'ancienne reine et le premier de la nouvelle reine, qui peut être estimé à 2 à 3 semaines) pourrait perturber l'équilibre de la population. On peut toutefois considérer que ces perturbations sont négligeables en période d'essaimage naturel : toutes les méthodes d'élevage « actives » (par exemple division ou élevage de reines) sont beaucoup mieux tolérées par les colonies et réalisées avec succès lorsque qu'on se rapproche de la période d'essaimage naturel (*i.e.* de la période de reproduction naturelle des abeilles). La plupart des déséquilibres évoqués et relatifs à la répartition des classes d'âge seront normalement sans effet durable pour la colonie.

Dans certains cas toutefois, et en particulier lorsque d'autres cofacteurs peuvent intervenir, les effets sur les colonies pourraient être importants. On peut, à titre d'exemple, évoquer le cas du couvain refroidi, conséquence d'une division avec trop peu d'abeilles adultes pour maintenir le nid à couvain à bonne température si une période de froid succède à une division. La disparition de butineuses exposées à des agents infectieux et/ou toxiques aurait le même effet. En outre, la période d'élevage des reines et de croissance de la population d'ouvrières va entraîner des besoins accrus en ressources alimentaires : si celles-ci sont insuffisantes ou absentes, les effets seront majeurs sur le cycle de développement de la colonie : cannibalisme, morphologie des abeilles (Brodtschneider et Crailsheim 2010; Di Pasquale *et al.* 2013; Naug 2009; Requier *et al.* Sous presse). L'apiculteur doit donc veiller à fournir, le cas échéant, un complément alimentaire aux colonies.

De plus, la qualité des reines obtenues peut varier en fonction de la saison d'élevage : les reines produites au printemps présentent un nombre de spermatozoïdes vivants dans leur spermathèque supérieur à celles produites en automne ; elles présentent en outre moins souvent des lésions affectant leurs ovaires et leur appareil vulnérant (Provost 2013). De même, des études en conditions semi-contrôlées ont mis en évidence que des stressseurs environnementaux biotiques et abiotiques (séparément ou combinés) pouvaient avoir un effet sur la qualité de la semence des mâles (Brunet 2013). L'obtention de reproducteurs de bonne qualité étant une garantie de la bonne santé de la colonie, *a contrario*, de mauvais reproducteurs entraîneront un niveau de ponte inférieur, d'où une population d'abeilles diminuée et une colonie affaiblie, donc potentiellement plus sensible lors de co-exposition, par exemple.

Dans le cas des achats de reines/d'essaims, le risque d'apparition de troubles est lié soit à l'introduction d'agents infectieux dans la colonie (susceptible de perturber les équilibres du portage asymptomatique), soit à l'introduction d'une autre sous-espèce d'abeille pouvant engendrer des

perturbations du fonctionnement de la colonie (agressivité, pillage, dérive<sup>31</sup> par exemple). L'apiculteur doit connaître les risques liés à ces pratiques.

Bien que chaque **manipulation des colonies d'abeilles par l'apiculteur** entraîne un risque (mort des ouvrières par écrasement ou par piqûre, mort de la reine par écrasement, pillage par les abeilles avoisinantes, transmission d'agents infectieux de ruche en ruche, abaissement de la température, perturbation de la grappe hivernale...), un minimum d'interventions apicoles demeurent aujourd'hui nécessaires pour maintenir en vie les colonies (traitement contre *Varroa*, vérification des stocks alimentaires). Les visites doivent être donc être limitées au nécessaire, à la fois en temps et en fréquence. Une formation préalable de qualité diminuera, jusqu'à les rendre infimes, les risques de dommages sur les colonies liés aux visites de l'apiculteur.

**La récolte des hausses**, mais surtout le prélèvement éventuel de cadres de miel de corps, qui consiste à prélever l'excédent de miel produit par la colonie pendant les semaines précédentes, peut constituer une forme de stress, outre les effets possibles de la manipulation décrite précédemment. En effet, en fonction des régions considérées, les saisons apicoles alternent parfois « périodes de miellées » et « trous de miellées » (production de nectar faible voire nulle dans une région donnée à un moment donné). Lorsque le retrait des hausses à miel coïncide avec un trou de miellée, en particulier au printemps (les corps de ruches peuvent alors être presque intégralement remplis de couvain et de pollen, notamment pour certaines sous espèces ou souche comme la Buckfast), les ressources énergétiques peuvent alors manquer. Ce stress nutritionnel pourrait être aggravé et allongé dans le temps par d'autres cofacteurs tels que des disparitions de butineuses de nectar, ou une période de claustration par mauvais temps. Ces phases sont donc critiques. Elles sont généralement bien appréhendées par les apiculteurs qui peuvent nourrir les colonies ou déplacer les ruches une fois la miellée terminée.

**Les transhumances** constituent des pratiques apicoles souvent évoquées comme des facteurs de stress pour les colonies d'abeilles. En effet, elles correspondent à une claustration des abeilles durant leur déplacement à l'origine d'une possible surchauffe ou d'étouffements, notamment pour des transferts sur de longues distances ou pendant de longues durées. Ces effets sont généralement gérés de façon préventive par les apiculteurs qui déplacent les colonies de nuit, à l'aube ou en soirée, en évitant les périodes chaudes, dans des ruches permettant une aération adéquate. Aux Etats-Unis, certaines études ont démontré que les transhumances, pouvaient également avoir des effets délétères sur la santé des colonies d'abeilles (vanEngelsdorp *et al.* 2013b; Welch *et al.* 2009). Néanmoins, les distances parcourues en France sont, au maximum, de l'ordre de quelques centaines de kilomètres, sans comparaison avec les parcours des ruches américaines. A l'inverse, un effet plutôt positif de la transhumance sur la santé des abeilles peut être observé : l'accès prolongé à des ressources nutritives est en effet bénéfique pour la colonie. En France, seules les abeilles importées, dans le cadre de renouvellement de cheptel par exemple peuvent subir de telles claustrations et leurs conséquences défavorables.

**La production de miel de cru** est généralement mieux valorisée que la production de miel toutes fleurs (FranceAgriMer 2012). Ainsi, certaines miellées sont très prisées des apiculteurs (acacia, tilleul ou lavande par exemple). Ces floraisons fugaces sont accessibles à tous les apiculteurs capables de déplacer leurs colonies et disposant d'un terrain d'accueil dans les zones à forte concentration d'une même essence florale. Ces zones hébergent donc un grand nombre de colonies d'origines géographiques différentes pendant une courte période (correspondant à la miellée désirée). Bien que difficiles à estimer, les échanges inter-colonies et inter-ruchers peuvent être augmentés. La probabilité de dérive, de pillage ou de contacts au sens large, et donc de possibles échanges d'agents infectieux, va nettement s'accroître (Welch *et al.* 2009). Enfin, lorsque la densité en colonies est très élevée sur une même aire, une forme de compétition pour l'accès aux mêmes ressources pourra apparaître et induire un effet sur les colonies (distances de parcours et temps de parcours augmentés, accès à l'eau en période sèche). Ces points constituent donc des zones à risque, à la fois pour les colonies qui s'y trouvent, mais également

<sup>31</sup> En apiculture, le mot « dérive » décrit le risque, pour une butineuse, de se tromper de ruche à son retour de butinage ; ce phénomène, identifié depuis longtemps, constitue un risque de transmission d'agents infectieux d'une colonie à une autre

pour l'ensemble de l'exploitation apicole dont elles proviennent (à leur retour) et dans la lutte collective contre les maladies apiaires.

**Le parcours technique des colonies (emplacements successifs occupés par une colonie au cours d'une saison apicole)** peut constituer un élément à prendre en compte comme cofacteur de la santé des colonies. En effet, l'apiculture professionnelle peut amener à faire se succéder les miellées exploitées par les mêmes colonies. On utilise ainsi le potentiel d'une colonie à exploiter des ressources, mais en modifiant le cycle biologique qui, de façon évolutive, doit être adaptée à une colonie sédentaire. Même si l'impact des transports sur de longues distances a été cité comme ayant un rôle potentiel dans les événements de surmortalité, notamment aux Etats-Unis (Oldroyd 2007; Pettis et Delaplane 2010), très peu d'études ont été menées sur le sujet. Le lien entre la transhumance et un fort taux de mortalité a toutefois été prouvé en Afrique du Sud (Pirk *et al.* 2014). Le développement des glandes hypopharyngiennes peut être affecté lorsque la longue transhumance concerne les ouvrières venant d'émergées (Ahn *et al.* 2012). Par contre, malgré une prévalence en virus plus élevée chez les colonies transhumées, elles ne présentent pas une augmentation de leur mortalité par rapport à des colonies sédentaires (vanEngelsdorp *et al.* 2008).

Une partie de ces risques, ou plutôt de ces facteurs de risque d'affaiblissement des colonies, peut aisément être compensée par des pratiques apicoles adaptées. Le respect des bonnes pratiques peut suffire dans la plupart des cas. Au contraire, au-delà des pratiques apicoles citées précédemment, d'autres sont plutôt déconseillées et peuvent parfois mettre en danger les colonies.

#### 3.1.4.2 Impact potentiel de certaines pratiques inadaptées ou non réalisées

**Le renouvellement annuel des cires** est recommandé, à raison du quart ou du tiers des cadres bâtis (ITSAP 2014). En effet, la cire peut accumuler des substances xénobiotiques lipophiles pendant de très longues périodes mais aussi des agents infectieux tels que les spores de *Paenibacillus larvae* (loque américaine). On retrouve ainsi fréquemment dans les cires des substances utilisées dans certaines pratiques apicoles de lutte antiparasitaire (coumaphos, tau-fluvalinate, paradichlorobenzène par exemple), des produits d'entretien du bois des ruches (Bogdanov 2004) et des pesticides (Chauzat *et al.* 2011). Ainsi, si l'on ne retire pas ces vieilles cires des ruches, la pression en contaminants, quels qu'ils soient, va augmenter. Ce contact permanent, à la fois des abeilles adultes mais aussi du couvain, avec des substances chimiques peut nuire à la santé de la colonie (Medici *et al.* 2012; Orantes-Bermejo *et al.* 2010). De même, les cires nouvellement introduites ne devraient pas contenir de substances xénobiotiques : il est ainsi déconseillé de réutiliser les vieilles cires, même refondues, car le chauffage à lui seul ne permet pas de décontaminer les cires (ITSAP 2014), notamment pour les pesticides ayant une température de dégradation élevée (plusieurs centaines de degrés Celsius). De plus, il faut s'assurer de la qualité sanitaire des cires achetées. Le circuit d'auto-renouvellement des cires, en utilisant de la cire d'opercule uniquement, paraît une précaution minimale.

Le circuit marchand des cires est mal connu. Il existe très peu d'éléments de traçabilité indiquant la provenance des cires et peu d'informations sur leur qualité. Il apparaît nécessaire d'encourager la mise en place de traçabilité dans cette filière dont les échanges sont largement mondialisés.

**Le renouvellement des reines** peut répondre à différents objectifs correspondant généralement à une stratégie souhaitée par l'apiculteur ou à un plan d'élevage. Le choix de la nouvelle reine et la sélection d'une génétique particulière s'appuiera, par exemple, sur des critères de production, de comportement (tendance limitée à l'essaimage, développement précoce au printemps, douceur, *etc.*) ou sanitaires (comportement hygiénique, résistances à certaines affections, *etc.*). Cette pratique de renouvellement des reines est devenue quasiment systématique en élevage professionnel pour atteindre des taux de changements de reines parfois annuels (FranceAgriMer 2012). L'espérance de vie théorique des reines est de plusieurs années (*cf.* chapitre 2). Toutefois, la durée de vie des reines rapportée par les apiculteurs a connu une réduction depuis les 15-20 dernières années. Le remérage naturel compense une partie de ces mortalités de reines, mais un certain nombre de colonies demeurent bourdonneuses aujourd'hui (*i.e.* la reine meurt mais n'est pas remplacée). Ces phénomènes de réduction d'espérance de vie des reines et de colonies

orphelines sont encore mal compris. Les bonnes pratiques apicoles nécessiteraient donc de précéder cette obsolescence de la reine par un renouvellement systématique. Une étude allemande menée sur plusieurs années a d'ailleurs montré que le risque de mortalité hivernale devenait nettement plus important lorsque la reine atteignait son 3<sup>ème</sup> hivernage (Genersch *et al.* 2010). L'apiculteur devra toutefois prendre soin d'adapter la génétique choisie à la zone d'implantation du rucher (*cf.* chapitre sur les facteurs génétiques) : l'inadéquation entre le cycle biologique ou les besoins alimentaires de l'abeille choisie avec les facteurs climatiques et floristiques du paysage de l'aire de butinage peuvent constituer des stress perturbateurs pour la colonie concernée. A titre d'exemple, une colonie très précoce en sortie d'hivernage ne sera pas adaptée à un climat montagnard.

**La lutte contre le parasite *Varroa destructor*** doit être l'objet d'une attention particulière pour tout apiculteur. Sa prévalence sur le territoire français est très élevée (86 % des ruchers visités dans le cadre du suivi épidémiologique français Résabeilles présentaient une pression parasitaire non nulle à l'automne 2013, sachant que cette estimation a été effectuée en cours ou en fin de traitement acaricide - Résabeilles Bulletin n° 2), et ses conséquences sur la santé des colonies d'abeilles sont de gravité majeure (*cf.* paragraphe correspondant). Une lutte systématique annuelle est donc indispensable. Cette lutte peut intégrer des méthodes différentes et doit être raisonnée : estimation de l'infestation, utilisation de médicaments, méthodes biotechniques, alternance des méthodes, vérification de l'efficacité de la stratégie mise en place, respect de cahiers des charges particuliers, période de miellée tardives, *etc.*

En cas d'absence de traitement ou de traitement(s) inefficace(s), outre les effets délétères du parasite *Varroa*, de nombreux facteurs de risque s'ajouteront aux autres cofacteurs potentiels et pourront mener à la mort de la colonie. Il faut donc traiter systématiquement et vérifier l'efficacité de ce traitement. Un traitement complémentaire peut parfois être nécessaire.

La lutte contre *Varroa* ne peut toutefois pas être réalisée de n'importe quelle façon : selon de récentes enquêtes épidémiologiques (Anses 2013; FranceAgriMer 2012), les pratiques de gestion antiparasitaire d'un certain nombre d'apiculteurs ne sont pas conformes à la réglementation car elles font appel à des médicaments ne disposant pas d'une AMM (Autorisation de mise sur le marché) pour cette indication. Ces mésusages sont dangereux à plus d'un titre : (1) les préparations « maison » exposent l'apiculteur au risque d'ingestion ou d'inhalation de substances très toxiques (cas des acides organiques, des sels de thymol ou de l'amitrazé en solution par exemple) ; (2) leurs présentations (supports cartons, chiffons imbibés, morceaux de bois, vermiculite, *etc.*) ne permettent pas d'assurer une diffusion maîtrisée des substances actives, d'où une action antiparasitaire inconstante ; (3) ces pratiques peuvent favoriser, à moyen terme, l'apparition de résistance du parasite vis-à-vis de substances jugées actives aujourd'hui, en exposant *Varroa* à des concentrations sublétales ; (4) ces pratiques participent largement à la contamination des cires en substances actives, avec des effets négatifs sur le développement du couvain (Medici *et al.* 2012) ; (5) l'innocuité vis-à-vis des colonies traitées n'est pas garantie ; (6) ces substances peuvent constituer un danger pour la santé du consommateur du fait de la persistance possible de résidus dans les produits de la ruche commercialisés.

Ces pratiques ne participent pas, *in fine*, à améliorer la santé des colonies mais peuvent, en revanche, lui nuire. Des médicaments vétérinaires autorisés pour le traitement de *Varroa* doivent être la seule option possible lorsqu'une lutte chimique est envisagée : elle garantit l'innocuité pour l'utilisateur et les abeilles, l'efficacité sur le parasite (même si elle n'est pas totale), l'absence de résidus dans les ruches et donc participe à la protection du consommateur.

L'apiculteur, par le **choix d'un emplacement**, impose à la colonie une zone de butinage. Cette aire doit subvenir aux besoins alimentaires de la colonie, constitués par les apports protéiques, glucidiques et en eau (*cf.* facteurs alimentaires). Un mauvais choix d'implantation du rucher peut donc être lourd de conséquences. De même, au-delà de ces ressources alimentaires, les butineuses vont collecter et apporter à la ruche un ensemble d'autres substances, créant ainsi une image fidèle de leur aire de butinage (« Abeille sentinelle de l'environnement »). Les éléments du paysage voisins d'un rucher pourront donc, s'ils sont attractifs pour les abeilles, être visités : sites industriels, surfaces cultivées, espaces urbains, voies de communication, exploitations agricoles,



*etc.* Le rayon de butinage habituel/moyen d'une abeille doit être connu des apiculteurs (*cf.* chapitre 2) afin de bien appréhender, autant que possible, l'ensemble des éléments paysagers auxquels sera exposée la colonie. En outre, la nourriture et l'eau peuvent être plus ou moins accessibles aux colonies et l'effort consenti pour y accéder peut être plus important si l'on tient compte des distances à parcourir, des conditions climatiques (vent, pluie, fortes chaleurs, *etc.*). Enfin, l'exposition et l'emplacement des ruches *sensu stricto* (en plein soleil, en zone humide, présences de nuisibles, *etc.*) peuvent constituer des facteurs de risque de développement de maladies, et/ou amener les colonies à des dépenses d'énergie excessives. Néanmoins, la raréfaction d'emplacements dans certaines régions, la volonté de produire une miellée particulière ou les contrats de pollinisation peuvent conduire l'apiculteur à poser ses ruches sur un emplacement non idéal, en toute connaissance de cause. Il faudra alors tenir compte des effets possibles sur les colonies concernées et compenser par des soins et une surveillance accrues.

Les **pratiques de nourrissage (alimentation artificielle) des colonies d'abeilles domestiques** sont anciennes. Les colonies d'abeilles stockent des réserves afin de survivre pendant les périodes de disette. Néanmoins, depuis très longtemps, les apiculteurs ont pris conscience que leur récolte de miel impacte forcément ces réserves et que les efforts fournis par les abeilles pour maintenir un stock suffisant sont nettement augmentés par cette captation humaine. On peut donc les aider à compenser cet effort en leur apportant de la nourriture, même si ce complément alimentaire n'est pas toujours nécessaire. Le nourrissage a pour objectif premier la survie hivernale (nourrissage d'automne), mais aussi l'aide au développement de la population et au renouvellement du cheptel par la réalisation de nouveaux essaims, dépourvus de butineuses (« nourrissage stimulant » ou « nourrissage spéculatif » - nourrissage de printemps, de fin d'été-) ou la compensation d'un manque lors de « trous de miellées » ou de mauvaises conditions climatiques. De plus, la raréfaction des cultures mellifères et pollinifères dans les systèmes agricoles, et de la flore sauvage dans certains milieux, impose ce nourrissage. Lorsque ce nourrissage, généralement nécessaire, n'est pas réalisé, le manque de nourriture peut conduire la colonie à la mort par famine<sup>32</sup>.

Pour les nourrir, les apiculteurs apportent des sucres (et parfois du pollen) à leur colonie. Ces intrants doivent être de bonne qualité sanitaire ; les sucres doivent être digestibles et adaptés à la période (candi en hiver, sirop au printemps). Le meilleur produit de nourrissage est, *a priori*, le miel, exception faite des risques de transmission d'agents infectieux. Néanmoins, ce type de nourrissage est peu réalisé car contreproductif. Les sucres de nourrissage sont donc généralement issus du commerce et l'on distingue plusieurs présentations et compositions : sirops, candi, sucre de betteraves ou de cannes à sucre, hydrolysats d'amidon de céréales, *etc.* Ils pourraient contenir, dans certains cas, des substances telles que des pesticides utilisés dans le traitement des plantes sucrières ou des OGM (Lu *et al.* 2012), des métaux lourds (Dufault *et al.* 2009) ou des taux trop élevés de HMF (Hydroxyméthylfurfural), notamment lorsqu'ils sont mal conservés (LeBlanc *et al.* 2009b). Par ailleurs, un taux de HMF élevé étant favorisé par un chauffage excessif, des préparations maison peuvent également en contenir (cas de sirops obtenus, par exemple, par chauffage d'un mélange de sucre cristallisé et d'eau). En avril 2010, en Belgique, un sirop contenant des quantités importantes de HMF (108 à 356 mg/kg) a été incriminé dans des mortalités de colonies (AFSCA 2010; Wilmart *et al.* 2011). Contrairement à l'HMF éventuellement présent dans le miel, qui ne semble poser aucun risque significatif pour la santé publique (Zirbes *et al.* 2013), l'HMF présent dans les sirops de nourrissage des abeilles semble être toxique pour celles-ci. Selon Jachimowicz et El Sherbiny (1975), un sirop contenant 30 mg/kg d'HMF administré aux abeilles ne montre aucune différence significative avec un sirop témoin sur la longévité des abeilles (en France, la teneur légale admise dans les miels, sauf exception, est de 40 mg/kg - décret n° 2003-587 du 30 juin 2003, annexe II sur les caractéristiques de la composition des miels). Par contre, toujours selon ces auteurs, un sirop contenant 150 mg/kg d'HMF conduit en moyenne à 58,7 % de mortalité après 20 jours d'administration. LeBlanc *et al.*

<sup>32</sup> On sait également depuis très longtemps que « la nutrition des abeilles pendant la période préhivernale et pendant l'hivernage par le sirop sucré peut réduire au minimum le pourcentage des abeilles affectées par *Nosema* dans les ruches » (Toumanoff C., Les maladies des Abeilles, Ed. 1930, p162)

(2009b) arrivent aux mêmes conclusions : une administration aux abeilles d'un sirop de maïs à haute concentration en fructose (55 %) et contenant 150 mg/kg d'HMF conduit à 50 % de mortalité après 19 jours. A 26 jours, en testant des concentrations en HMF de 57 à 250 mg/kg, seule la concentration de 250 mg/kg conduit à une mortalité significativement plus importante. Ces auteurs considèrent finalement que la concentration de 250 mg/kg est à considérer comme toxique pour les abeilles, seuil qui avait été franchi lors de l'épisode belge de 2010.

Les nourrissements protéiques sont surtout utilisés dans le contexte de l'élevage mais pourraient l'être de plus en plus étant donné les évolutions paysagères dont la moindre diversité est aujourd'hui mise en cause (voir facteurs alimentaires). Toutefois, peu d'informations sont disponibles sur les besoins physiologiques en acides aminés chez les abeilles et ces informations sont souvent anciennes (de Groot 1953). Les apports réalisés par les apiculteurs sont généralement issus de leur propre récolte de pollen ou de pain d'abeilles, mais certaines préparations commerciales ont aussi cette indication. Comme pour le nourrissage sucré, la présence de contaminants chimiques ou biologiques dans ces préparations est possible. La plupart ne propose pas non plus un étiquetage suffisant pour en connaître la composition précise. Il n'est pas possible, par exemple, de voir si les apports correspondent aux besoins ou de vérifier la digestibilité de ces protéines par les abeilles.

Le nourrissage artificiel est aussi couramment pratiqué par les apiculteurs afin de combler un manque de ressources ponctuel ou assurer un apport énergétique suffisant en cas de sollicitation forte de la ruche, en particulier en période d'élevage de faux-bourçons. Des expérimentations de terrain ont été menées afin de tester l'impact du nourrissage des nourrices des faux-bourçons en phase larvaire sur la qualité sur sperme des faux-bourçons. Les abeilles ont été nourries avec du sirop de sucre, ou un mélange de miel et de pollen, alors qu'aucun apport n'a été réalisé sur les abeilles des ruches témoins. Il s'avère qu'à maturité sexuelle, les faux-bourçons témoins, dont les abeilles nourrices n'ont pas reçu de nourrissage, produisent davantage de spermatozoïdes que les faux-bourçons dont les nourrices en ont reçu, et ce quel que soit le type de ce nourrissage. De plus, le sperme de ces faux-bourçons témoins a toujours le pourcentage de spermatozoïdes vivants le plus élevé (Provost, communication personnelle ; Rapport Projet Assistance technique FEAGA 2011-2014 coordonné par l'ADAPRO). Les questions soulevées par cette expérimentation concernent non seulement la nature de l'alimentation artificielle, sa qualité, son mode d'administration, le moment d'administration, mais aussi sa pertinence.

Ainsi, le nourrissage des colonies d'abeilles, pratique apicole généralisée car souvent indispensable, peut présenter un danger pour la santé des abeilles et un facteur d'affaiblissement (mortalités d'abeilles, toxicité de certaines substances). Actuellement, il n'existe pas de normes en France sur la composition des produits de nourrissage et, généralement, peu d'informations sur leur composition. Outre la question de la qualité sanitaire et nutritionnelle des produits de nourrissage pour les abeilles, se pose aussi la question de la digestibilité de cette nourriture. En raison d'une cristallisation possible (qui aurait d'ailleurs pour effet de concentrer certains toxiques dans la phase encore liquide du sirop (AFSCA 2010)) ou de particularités physiologiques de l'abeille qui ne dispose pas de lactase par exemple (Chauvin 1968), la question de la valeur de ces produits de nourrissage pour l'abeille doit donc être envisagée de façon très large. Des normes de qualité, s'appuyant sur les données scientifiques disponibles, devraient donc être imposées pour les produits de nourrissage.

Enfin, **les ruches choisies** par l'apiculteur pour abriter ses colonies peuvent présenter des défauts constituant des facteurs aggravants ou des effets indirects sur la santé des colonies. Concernant leur fonction, d'abord, elles doivent être adaptées au lieu d'implantation du rucher (protection contre le froid, la chaleur, les prédateurs) en minimisant au maximum les déprédations et efforts pour la colonie. Elles doivent aussi correspondre à l'espace nécessaire à la colonie, selon sa taille (application de partitions, par exemple, pour limiter les espaces inoccupés par l'essaim). Certaines pratiques apicoles inadaptées peuvent, en revanche et malgré la bonne intention première, nuire aux abeilles : partition en matériaux non inerte, peintures et revêtements toxiques par exemple. Des substances nocives (pour les abeilles ou les consommateurs des produits de la ruche) peuvent alors être libérées par les abeilles et entrer dans leur chaîne alimentaire.

### 3.1.5 Facteurs climatiques

Parmi les différents stress auxquels peuvent être exposées les colonies d'abeilles, les conditions climatiques font partie des plus souvent citées pour expliquer des mortalités ou des baisses de productivité. L'espèce *Apis mellifera* a toutefois démontré, au cours de son évolution, ses capacités de colonisation de différents milieux et d'adaptation physiologique et anatomique (ce que l'on nommait autrefois les « *accommodats* »), en particulier des capacités de thermogénèse et de thermorégulation remarquables. La sélection naturelle, l'isolement géographique ont ainsi permis de voir évoluer différentes souches identifiables par des caractères morphologiques, comportementaux et génétiques en 26 sous-espèces d'*Apis mellifera* aujourd'hui présentes sous des climats très différents, des plus froids aux plus chauds. Il s'agit donc ici, non pas de douter de l'adaptation de l'espèce à des conditions climatiques très contrastées, mais de repérer et d'estimer comment les conditions climatiques peuvent perturber la colonie d'abeilles dans son parcours de vie. La météorologie, sur laquelle on ne peut pas agir mais dont on peut éventuellement modérer l'impact par des choix zootechniques appropriés (emplacement du rucher, génétique de la colonie, nourrissage, etc.), peut en effet avoir des conséquences directes ou indirectes sur le développement des colonies d'abeilles.

#### 3.1.5.1 Impacts directs sur le développement des colonies d'abeilles

Sous nos climats tempérés, le cycle de développement des colonies est saisonnier avec, schématiquement, des périodes de développement du couvain (printemps et fin d'été) et d'arrêts de ponte (périodes froides). Les colonies, en particulier les reines, s'adaptent dans la mesure du possible aux conditions climatiques : à titre d'exemple, la période de ponte en sortie d'hiver est naturellement décalée lorsque l'hiver se prolonge. Des mécanismes de régulation tels que la disponibilité en pollens participent à moduler la ponte de la reine. D'autres mécanismes interviennent pour adapter le développement de la colonie à son environnement climatique. Ainsi, l'alternance des saisons change le comportement social de la colonie : les variations de la température extérieure, plus que la photopériode, modifient la répartition relative des tâches entre ouvrières, en relation avec l'hormone juvénile (Huang et Robinson 1995). Tout épisode climatique « anormal » constitue donc un stress pour la colonie, avec un coût protéique et glucidique.

La période hivernale constitue, *a priori*, la période la plus difficile à franchir pour une colonie d'abeilles étant donnée la quasi-disparition des ressources disponibles dans son environnement (pollen et nectar) et la nécessaire lutte contre le froid. Les réserves accumulées en amont prennent alors toute leur importance, à la fois par leur qualité et leur quantité. Les données épidémiologiques disponibles confirment le plus souvent le risque accru de perte pendant l'hiver. Toutefois, le taux de mortalité en saison peut parfois être du même niveau que le taux de mortalité hivernale en France : par exemple, pendant l'hiver 2012-2013, il a été estimé à 14,1 % (IC 95 = 10,8 – 17,5) (Chauzat *et al.* 2014), alors qu'il a été de 13,6 % au cours de la saison apicole c'est-à-dire durant le printemps et l'été 2013. L'observatoire des mortalités hivernales de l'ADARA - ITSAP évoque depuis sa création des taux supérieurs voisins de 20 % (données de mortalités obtenues sur la base du volontariat). Il en est de même pour les pays européens voisins et les Etats Unis où l'hivernage est une cause majeure de pertes pour les apiculteurs (vanEngelsdorp *et al.* 2008). Ces pertes sont nettement supérieures à ce qui était observé annuellement auparavant (environ 5 à 10 %).

Dans leur lutte contre le froid, les abeilles s'organisent pour former une « grappe hivernale », dont le diamètre et la densité en abeilles varient selon la température : plus il fait froid, plus la grappe est petite et dense (Heinrich 1981; Watmough et Camazine 1995). La température au cœur de la grappe, qui peut atteindre plus de 30 °C quelle que soit la température extérieure, est atteinte grâce à la production de chaleur par les ouvrières (Stabentheiner *et al.* 2003). Ainsi, lorsque le nombre d'abeilles à l'entrée de l'hiver est insuffisant pour former une grappe de taille suffisante, la petite colonie est condamnée. On admet que la force minimale d'une colonie, pour passer l'hiver et repartir au printemps, se situe au minimum à 8 000 abeilles sous un climat tempéré pour des colonies d'abeilles domestiques (Imdorf *et al.* 2010). Finalement, tout événement ou stress précédant l'hivernage et qui a pour effet de réduire la population d'abeilles adultes et/ou les

réserves nutritives peut participer à accroître le risque de mortalité hivernale (*cf.* paragraphe 3.1.3). De même, les sous espèces et les écotypes doivent être adaptés à leur environnement et en particulier au climat local (*cf.* paragraphe sur les facteurs génétiques).

Les conditions météorologiques peuvent constituer des facteurs de stress pour la colonie d'abeilles au-delà de la période hivernale. On sait depuis longtemps que des froids printaniers tardifs nuisent au développement du couvain et à la qualité des nourrices (Dustmann et von der Ohe 1988). De même, de longues périodes de pluie peuvent modifier le comportement des nourrices qui apportent moins de soins au couvain, une moindre inspection et un moindre nettoyage des cellules (Riessberger et Crailsheim 1997), favorisant ainsi la transmission des maladies, du couvain notamment. Enfin, certains agents infectieux et parasites (ex : *Varroa destructor* et *Nosema*) se développent de façon variable selon la température ou l'humidité (Chen *et al.* 2012; Harris *et al.* 2003). Les conditions météorologiques peuvent donc accroître la sensibilité des abeilles aux maladies.

### 3.1.5.2 Effets indirects sur le développement des colonies d'abeilles

Indirectement, les conditions météorologiques peuvent aussi impacter la physiologie des colonies d'abeilles en modifiant l'accès ou la qualité des ressources nutritives. Les comportements de butinage et d'expansion de la colonie sont liés à la floraison en lien avec les conditions climatiques.

Concernant la qualité des ressources nutritives, outre l'environnement floristique (*cf.* paragraphe 3.1.3), des événements climatiques peuvent modifier l'intérêt mellifère ou pollinique d'une même plante : de fortes pluies peuvent, à titre d'exemple, lessiver les fleurs d'acacias avec pour effets de les rendre moins attractives aux abeilles et de rendre son nectar plus dilué (Le Conte et Navajas 2008). A l'inverse, les fleurs de lavande ne produisent plus de nectar lorsque le temps est trop sec (Le Conte et Navajas 2008). Certaines périodes telles que celles de développement du couvain rendent particulièrement sensibles les colonies. En effet, lorsque la colonie et son couvain ont atteint une taille importante par un printemps propice, une brusque interruption dans la fourniture en pollen peut être très préjudiciable (Mattila et Otis 2006). Concernant l'accès à ces ressources, les conditions optimales de butinage peuvent varier selon le temps : les fleurs de tournesol sont butinées par les abeilles de façon optimale lorsque, selon (Puškadija *et al.* 2007), la température est comprise entre 20 à 25 °C pour une humidité de 65 à 75 %. Un taux d'humidité supérieur, des chutes de pluies intenses, du vent ou une température basse ont un effet négatif sur les visites de fleurs par les abeilles. De même, une augmentation de la température a un effet positif sur les sorties des butineuses mais l'intensité des rayons lumineux peut, une fois atteint un optimum, réduire leur nombre (Burrill et Dietz 1981).

Plus largement, des changements climatiques à grande échelle pourraient éventuellement, dans un futur plus ou moins lointain, causer une désynchronisation entre la distribution géographique des plantes mellifères et pollinifères avec le cycle de vie des abeilles (Abrol 2009; Delgado *et al.* 2012; Thuiller *et al.* 2005).

Ainsi, bien que les colonies d'abeilles domestiques disposent de moyens performants d'adaptation à leur environnement - ce qui leur a permis de coloniser des zones diverses et parfois hostiles - le climat influence largement leur développement et leur santé. Toutefois, comme l'abeille domestique est un insecte pollinisateur généraliste, et qu'elle est donc capable de récolter de la nourriture sur un grand nombre de plantes, elle serait moins affectée que les insectes pollinisateurs spécialistes de certaines plantes.

### 3.1.5.3 Conclusion

Les effets du climat sur les colonies d'abeilles peuvent être appréhendés selon une échelle locorégionale ou à l'échelle du monde. L'intensité et la durée des phénomènes météorologiques (sécheresse, pluie, températures extrêmes, vent) doivent être prises en compte comme des stress pour les colonies : ils peuvent, directement ou indirectement, entraîner l'affaiblissement d'une colonie en déplaçant son équilibre physiologique. Le choix d'une sous-espèce ou d'un écotype adapté à son environnement proche semble donc important. Dans le cas inverse, les pratiques

apicoles devront compenser ce stress (exemple du nourrissage hivernal pour des colonies de taille importante hivernant dans des zones à hivers longs et rigoureux). Les processus physiologiques de réponse des colonies aux stress climatiques sont encore méconnus, même si l'on connaît ses grandes capacités de thermorégulation, entre autres.

### 3.1.6 Facteurs physiques : champs électromagnétiques

Les abeilles disposent d'un système de réception magnétique (Kirschvink *et al.* 1997). Son mécanisme repose sur des « granules » de fer répartis de façon aléatoire dans le cytoplasme de certaines cellules de l'abeille, en particulier sous la cuticule de son abdomen (Hsu et Li 1994; Kuterbach *et al.* 1982). Ce système est très efficace puisque les abeilles peuvent détecter des fluctuations du champ magnétique terrestre (évalué à 50  $\mu$ T). de très faible intensité (*i.e.* dès 0,026  $\mu$ T) Il leur permet, selon (Hsu *et al.* 2007), de s'orienter grâce une « mémoire » magnétique de leur environnement.

On sait par ailleurs que les champs électromagnétiques créés par les activités humaines (lignes à haute tension par exemple) induisent des perturbations électriques sur les objets chargés. Les champs électromagnétiques produits par les lignes à haute tension peuvent ainsi affecter le comportement des abeilles (Bindokas *et al.* 1988; Lipinski 2006; Sharma et Kumar 2010) et le développement des colonies (Greenberg *et al.* 1981; Lipinski 2006). Les champs électromagnétiques induits par les téléphones cellulaires lors des communications téléphoniques peuvent, d'autre part, causer des modifications biochimiques (baisse des taux de glucides et de lipides présents dans l'hémolymphe) chez les ouvrières (Kumar *et al.* 2011), probablement en lien avec l'augmentation de leur activité (augmentation de leur agressivité et de la fréquence du battement d'ailes). Elles modifient aussi les sons émis par la colonie (induction du « piping » (Favre 2011)).

Néanmoins, les effets observés dans ces publications l'ont été lors d'une grande proximité entre la source émettrice et la colonie (téléphones portables placés dans la ruche (Favre 2011; Kumar *et al.* 2011), conditions qui ne sont pas réunies sur le terrain. Concernant les lignes à très hautes tensions, une distance de sécurité de 65 mètres suffirait à protéger les colonies d'abeilles des nuisances éventuellement induites par les plus hauts voltages (Lipinski 2006). Le choix d'un emplacement du rucher adapté devrait donc limiter les risques. Le cas échéant, les effets attendus par les perturbations d'un rayonnement électromagnétique sont de l'ordre de l'augmentation de consommation des réserves de la colonie (Kumar *et al.* 2011) et des modifications du comportement des abeilles (Lipinski 2006).

Enfin, de récentes publications ont montré l'importance des champs électriques dans les échanges entre individus (cas des abeilles domestiques (Greggers *et al.* 2013)) ou dans les échanges avec leur environnement (cas des bourdons (Clarke *et al.* 2013)).

Des études plus réalistes (plus proches des conditions de terrain) et plus ambitieuses (plus grand nombre de colonies testées et sur un plus long terme) permettraient de mieux appréhender le réel impact des champs électromagnétiques sur la santé des abeilles.

### 3.1.7 Altérations de la structure de la colonie

Certains états naturels de la colonie ne constituent pas des stress *sensu stricto* mais pourraient participer, en tant que facteurs de risque, à une exposition accrue à d'autres facteurs de stress. Parmi les événements physiologiques causant le plus d'effets, on peut retenir l'essaimage ou les reines vieillissantes.

Ces phénomènes génèrent essentiellement des modifications quantitatives de population par des troubles de ponte de la reine. Dans les deux cas, la pyramide des âges entre ouvrières peut alors être largement modifiée (répartition altérée des classes d'âge) et nécessite des adaptations (plasticité des rôles joués par les ouvrières). Ce déséquilibre dans la pyramide des âges peut, par ailleurs, être la conséquence d'autres étiologies (cas des intoxications avec mortalités des

butineuses). On soulignera que lors de ces phénomènes la (nouvelle) reine est susceptible de ne pas être fécondée voire de mourir (cas de l'essaimage, des colonies bourdonneuses, d'une supersédure). La mauvaise qualité des reines serait, pour les apiculteurs américains, la première cause de pertes hivernales de colonies (vanEngelsdorp *et al.* 2008). De même, l'âge de la reine à l'entrée de l'hiver est un paramètre prédictif de la survie hivernale de la colonie (Genersch *et al.* 2010). Enfin, une anomalie affectant la reine semble augmenter le risque de mourir pour une colonie transhumée (vanEngelsdorp *et al.* 2013b). De nombreuses causes, suspectées ou démontrées, peuvent nuire à la bonne qualité de la reine, parmi lesquelles :

- les pesticides, par exemple le coumaphos (Pettis *et al.* 2004), peuvent induire une baisse de la fertilité des mâles (Burley *et al.* 2008) ;
- certains agents infectieux ; par exemple *Nosema ceranae* affecte la physiologie des reines (Alaux *et al.* 2011b) et des virus sont responsables de dégénérescence ovarienne (Gauthier *et al.* 2011) ;
- ou, enfin, une mauvaise insémination (Richard *et al.* 2007).

Ces troubles, s'ils sont responsables de la mort de la reine, peuvent aboutir au collapsus de la colonie. Lorsqu'ils n'ont pour effet « qu'une mauvaise reine », ils augmentent la sensibilité de la colonie aux autres facteurs de stress. Les pratiques apicoles bien maîtrisées peuvent compenser, dans certains cas, ces altérations.

## 3.2 Présentation et analyse de données sur des expositions à des facteurs biologiques et chimiques en France (aspects monofactoriels)

### 3.2.1 Objectifs de l'examen des données d'exposition disponibles

Pour apprécier la situation d'exposition sur le terrain en France, le groupe de travail a disposé de données d'observation provenant de laboratoires d'analyse publics, d'études cofinancées par des fonds publics français ou européens, ou d'initiatives privées de réseaux professionnels.

Les données recensées et examinées ici ont été générées dans des contextes et pour des objectifs différents, en France, entre 2006 et 2013 (**Tableau 7**). Les neuf jeux de données et leur utilisation seront présentés brièvement ci-dessous. Ils comprennent des résultats d'analyses microbiologiques et chimiques sur différentes matrices (abeilles adultes, larves, pollen, miel, pain d'abeilles). Certains d'entre eux comprennent également des variables d'état des colonies (force des colonies, troubles, mortalité).

Tableau 7 : Présentation des jeux de données analysés

Nom ou acronyme	Titre	Objectif affiché par le maître d'œuvre	Type	Catégorie d'étude	Nombre de ruchers	Période/aire géographique	Mesure des AIP	Mesure des résidus chimiques	Mesure des co-occurrences	Paramètres d'état de la ruche
Oniris	Abeille sentinelle	Etude multicentrique de la présence de dangers chimiques et biologiques dans différents contextes de paysage	Analytique	Transversale répétée	18 ruchers	2008 et 2009, 4 prélèvements par an (Ouest de la France)	Oui en 2009 systématique quantitative (méthode appliquée par un seul laboratoire)	Oui en 2008 et 2009 quantitative (méthode appliquée par un seul laboratoire)	Oui	Oui en 2008 et 2009
Epilobee France	Mortalité des abeilles	Volet français de l'étude multicentrique européenne de prévalence des troubles et mortalités des abeilles (Résabeilles)	Analytique	Transversale répétée	391 ruchers	2012 et 2013 (6 départements français)	Oui mais recherche d'AIP en fonction des symptômes	Non	Non	Oui
Cruiser	Plan de surveillance post-homologation Maïs Cruiser TM	Suivi temporel de ruchers exposés à des surfaces cultivées avec des semences de maïs enrobées Cruiser	De conception Analytique, au final Descriptif	A l'origine, Cohorte (exposés/non-exposés) mais fort biais de recrutement. Utilisable comme étude de cas	56 ruchers	3 années 2008-2010 (6 régions)	Oui mais non systématique	Oui, mais non-systématique et plusieurs laboratoires impliqués sans harmonisation inter-laboratoires	Oui, mais non-systématique et non-standardisé	Oui, mais non-standardisés
BNEVP	Suivis temporels de résidus	Observation d'éventuels effets adverses liés aux résidus de pesticides	Descriptif	Etude de cas	5 ruchers	Printemps 2011 (2 départements Sud-Ouest)	Oui, mais non-systématique	Oui	Oui pour les résidus	Oui

Itsap/CETI OM	Suivi temporel de ruchers en cultures oléagineuses	Lien entre les facteurs de stress (résidus, agents infectieux) et état des colonies	Descriptif	Etude de cas	4 ruchers	Printemps 2012 et 2013 (région Centre)	Oui mais non-systématique	Oui	Oui pour les résidus	Oui
ADARA	Analyses sur des ruchers atteints de troubles en saison	Détection d'agents biologiques et chimiques associés aux troubles	Descriptif	Etude de cas	13 ruchers	Hiver 2012 (1 cas) Printemps et Été 2013 (12 cas) (région Rhône-Alpes)	Oui systématique quantitatif (méthode appliquée par un seul laboratoire)	Oui, mais non-systématique et plusieurs laboratoires impliqués sans harmonisation inter-laboratoires	Oui pour les AIP	Symptômes non-standardisés
DGAI - Ministère de l'Agricultur e	Réseau annuel de surveillance des troubles des abeilles	Cause des troubles en vue d'actions régaliennes (maladies réglementées, intoxications massives)	Descriptif	Etude de cas	36 ruchers	Année 2013 (national)	Oui mais non systématique	Oui mais non-systématique	Non	Symptômes non-standardisés
LNR Sophia	Bilan des résultats d'analyse des échantillons soumis au LNR (Anses de Sophia-Antipolis)	Résultats obtenus par un laboratoire de diagnostic et de référence national	Information sur le type de dangers détectés dans différentes matrices	ND ; pas de commémoratifs dans la base	482 + 253 rapports d'essais	2011-2013 (national)	Oui mais non systématique	Oui mais non-systématique	Non	Non
LDA39	Bilan des résultats d'analyse des échantillons soumis au LDA39	Résultats obtenus par un laboratoire de diagnostic départemental	Information sur le type de dangers détectés dans différentes matrices	ND ; pas de commémoratifs dans la base	658 rapports d'essais	2006-2012 (plusieurs départements)	Oui mais recherche d'AIP en fonction des symptômes	Non	Non	Non



Le traitement statistique pour les besoins de la saisine a été effectué par des scientifiques de l'Anses, en collaboration avec plusieurs membres du groupe de travail. Les statistiques descriptives (moyennes, quartiles, étendues) sont utilisées pour décrire les jeux de données et ont, pour la plupart, une valeur d'observation simple, non extrapolable à l'ensemble du territoire où ils ont été obtenus. Les résultats des tests d'association statistique sont valables à l'intérieur de chaque jeu de données.

Le bilan de ces observations permet d'établir des listes d'agents infectieux et parasitaires (« AIP ») et de substances chimiques (« résidus »), qui ont été détectés dans les matrices apicoles en France entre 2006 et 2013. Certaines méthodes utilisées étaient qualitatives (présence/absence), d'autres quantitatives. Les listes de dangers, puis les informations quantitatives (c'est-à-dire de charge infectieuse ou de dose de résidus) seront examinées successivement. Dans le chapitre 4.2 seront présentées et discutées les observations conjointes de dangers dans un même rucher (co-exposition) et leur cooccurrence avec des symptômes ou variables subcliniques.

Le présent état des lieux vise à tirer les enseignements de ces nombreuses observations en vue d'améliorer :

- le diagnostic de troubles de la santé des abeilles ;
- la connaissance des cooccurrences ;
- la surveillance de problèmes émergents ;
- l'évaluation ex-post des produits vétérinaires et phytosanitaires ;
- les dispositifs observationnels pour la recherche sur les troubles des abeilles.

### 3.2.2 Présentation synthétique des neuf jeux de données examinés et des informations apportées par chacun pour les besoins de la saisine

#### 3.2.2.1 Oniris : étude multicentrique des résidus et agents infectieux et parasitaires (AIP) sur 18 ruchers du Grand-Ouest (2008 – 2009)

Cette étude multicentrique sur 18 ruchers a été conçue pour évaluer l'utilité de l'Abeille domestique comme témoin de contamination de l'environnement par des dangers chimiques. Elle compare différents contextes paysagers de la région Pays de la Loire. Il s'agit de paysages bocagers, de grandes cultures ou de zone urbaine, ainsi que de deux ruchers insulaires. Les ruchers ont été suivis deux années de suite, 4 fois dans la saison apicole. Les résultats concernant les résidus de pesticides ont été publiés (Lambert *et al.* 2013). Ils seront rappelés dans le paragraphe 3.3 de discussion sur les substances détectées. La deuxième année (2009), des analyses microbiologiques systématiques et quantitatives (qPCR) ont aussi été effectuées aux quatre périodes de prélèvement.

Aucun de ces ruchers n'a présenté de symptômes de maladie ou de mortalité en saison, il s'agit donc d'un échantillon de ruchers asymptomatiques. Le taux de survie hivernale des colonies a été étudié en relation avec les charges infectieuses par Mouret *et al.* (2013). Les résultats en seront rappelés avec ceux des interactions dans le paragraphe 4.2.3.

Au-delà des prévalences de dangers chimiques et microbiologiques, il a été possible, à la demande du groupe de travail, de calculer dans ce jeu de données les cooccurrences de dangers dans un même rucher.

Certaines variables d'état ont été relevées à chaque visite, le lien a également été estimé entre les variables d'état et la détection de tel ou tel danger (chimique ou microbiologique).

On peut noter par ailleurs que les caractéristiques des paysages des zones de butinage sont connues (analyses paysagères par Système d'Information Géographique), ainsi que la famille botanique des pollens ramenés à la ruche à chaque période (analyses palynologiques) (Piroux *et al.* 2014). Des enquêtes de terrain ont également été faites sur les traitements effectués par les usagers (agriculteurs, collectivités, entreprises, particuliers). Ces informations complémentaires seront utilisées pour la discussion générale (paragraphe 4.3).

### 3.2.2.2 Epilobee France (Résabeilles 2012 et 2013) épidémiologie des cas de mortalité sur 391 ruchers

Cette étude a été motivée par le fait que l'ampleur réelle des pertes de colonies en Europe était inconnue. Epilobee est une enquête épidémiologique de prévalence (dénombrement de cas) de mortalités de colonies. Elle est coordonnée à l'échelle européenne par l'Anses, avec des protocoles standardisés. Les premiers résultats ont été disponibles en avril 2014 (Chauzat *et al.* 2014). Le volet français de cette étude porte sur 391 ruchers tirés au sort dans six départements. En cas de mortalité ou de cas cliniques (par exemple de symptômes caractéristiques de loque), des analyses microbiologiques ont été réalisées, mais le type de danger recherché dépendait des symptômes associés, dans une démarche de confirmation d'une suspicion clinique par des analyses de laboratoire. Il n'est donc pas possible de calculer des prévalences d'AIP dans cette population de ruchers. L'étude est représentative pour ce qui est de la prévalence des cas de mortalité et de maladie cliniquement exprimée, mais aucune association statistique ne peut être calculée entre la présence de tel ou tel danger microbiologique et la survenue des troubles, car il n'y a pas d'analyses dans les ruchers non affectés, par comparaison.

Dans cette enquête, les dangers chimiques n'ont pas été recherchés.

L'information apportée par cette étude au présent état des lieux est de savoir quels dangers microbiologiques ont été détectés en cas de mortalité ou maladie, et à quelle charge infectieuse (pour les méthodes quantitatives).

### 3.2.2.3 Maïs Cruiser - Plan de surveillance post-homologation 2008-2010

L'autorisation de mise sur le marché du Cruiser (semences enrobées avec comme substance active l'insecticide néonicotinoïde thiaméthoxam) en 2008 a été assortie d'un plan de surveillance d'éventuels effets adverses en conditions de terrain mis en place par la direction générale de l'alimentation (DGAL). Les semences utilisées à cette époque étaient celles commercialisées dans les usages pour lesquels les produits d'enrobage étaient autorisés. Dans la plupart des cas, l'enrobage comprenait également les fongicides fludioxonil et matalaxyl M (mefenoxam), ainsi que des substances adjuvantes de co-formulation. Les enrobages sont réalisés par des entreprises semencières et non le fabricant du produit. Une étude de suivi a donc été mise en place, s'apparentant dans sa conception à une étude épidémiologique explicative de type exposé/non-exposé (cohorte). La variable d'exposition initialement considérée était la présence ou l'absence de surface cultivée en maïs Cruiser dans un rayon de 1 km autour du rucher, dans un paysage déjà cultivé en maïs. Deux à trois ruchers « exposés » et deux à trois ruchers « non-exposés » par an ont été suivis dans 6 régions différentes. L'étude a duré 3 ans, 6 des 49 ruchers suivis l'ont été deux années consécutives, mais pas forcément sur les mêmes colonies.

De forts biais de recrutement ont affecté la mise en place de cette étude. De nombreux ruchers non exposés de l'étude présentaient en fait du maïs Cruiser dans la zone rapprochée de butinage (l'information sur les surfaces en maïs cultivées dans les 3 km, les autres cultures et autres traitements appliqués dans la zone de butinage rapprochée n'était pas disponible pour le présent travail). Durant ces années, le maïs enrobé Cruiser était le seul produit autorisé comportant du thiaméthoxam. La clothianidine, principal métabolite du thiaméthoxam, a également été commercialisée par le passé en tant que substance active, mais n'avait pas d'autorisation pendant les années de l'étude.

Comme les catégories « avec » ou « sans » Cruiser dans la zone des 1 km n'étaient plus valables, de nouvelles variables d'exposition ont été calculées à partir de la surface cultivée en maïs Cruiser et la surface totale cultivée en maïs dans la zone de butinage rapprochée.

Le thiaméthoxam et la clothianidine, ainsi que l'acétamipride et le thiaclopride ont été recherchés dans plusieurs matrices apicoles, principalement au cours de la période de floraison du maïs. Cependant, il est apparu que la contamination des matrices apicoles (en fréquence et en teneur) par le thiaméthoxam et la clothianidine a été assez semblable entre les zones de différente densité en maïs Cruiser. Ce biais ne permet pas la différenciation effective des situations de terrain pour une étude basée sur la comparaison.

Il n'y a pas d'analyses palynologiques qui permettraient de savoir quelles ressources ont été réellement butinées par les abeilles de ces ruchers.

Certains AIP (virus, bactéries, microsporidies, *Varroa*) ont été recherchés, mais de nombreuses données sont manquantes.

Des symptômes ont été relevés ainsi que certains paramètres d'état des colonies.

Au vu des insuffisances du protocole, ces données seront utilisées comme autant d'études de cas où des co-expositions ont pu être observées, en lien avec certaines variables d'état des colonies.

#### 3.2.2.4 BNEVP - Suivi temporel de résidus dans cinq ruchers (printemps 2011)

Suite à des cas de pertes de colonies au printemps 2008, la Brigade Nationale d'Enquêtes Vétérinaires et Phytosanitaires (BNEVP) a effectué des prélèvements en 2009 et 2010, sur quelques ruchers ayant été affectés en 2008, en vue d'identifier un éventuel facteur causal commun (*i.e.* qui serait présent à l'analyse lors de prélèvements en avril-mai). Ces ruchers n'ont pas présenté de troubles en 2009 et 2010. Au printemps 2011 (mars à mi-mai), ces ruchers ont alors fait l'objet d'un suivi hebdomadaire avec évaluation de l'état des colonies, recherche de 63 résidus et recherche de certains AIP, parmi lesquels seule la présence du virus SBV et la quantification des spores de *Nosema* spp. ont pu être utilisées pour l'étude statistique.

Bien que les données soient peu nombreuses, il a été possible d'observer des co-expositions à plusieurs substances dans les pollens de trappe et le pain d'abeilles. Il y a trop de données manquantes et les données fournies sont trop disparates pour quantifier le lien entre présence de résidus et variables d'état des colonies (taux de remplissage de cadres).

#### 3.2.2.5 ITSAP/CETIOM<sup>33</sup> Suivi temporel des résidus dans 4 ruchers dans un contexte de cultures oléagineuses (avril - mai 2012 et mai - juin 2013)

Le printemps est considéré comme une période à risques toxiques particulièrement élevés en zone de cultures oléagineuses (colza, tournesol). Ce suivi a consisté en 2 à 3 visites en l'espace de 15 jours, durant la floraison. Il avait pour objectif de mesurer l'exposition conjointe à 33 substances d'usage agricole sur ce type de culture, dont 3 substances néonicotinoïdes, dans des conditions de terrain. Des virus, microsporidies et bactéries (de loques) ont été recherchés sur des abeilles symptomatiques et des abeilles mortes, mais il y a de nombreuses données manquantes. L'infestation par *Varroa* n'a pas été étudiée. Parmi les acaricides utilisés dans la lutte contre *Varroa*, seul le *tau*-fluvalinate a été recherché, en raison de son utilisation en agriculture.

Le poids des ruches a été relevé et le gain de poids calculé sur 15 jours, ainsi que le taux de perte de colonies et la présence éventuelle de symptômes.

Ici encore, il ne s'agit que d'études de cas (ces ruchers n'ont pas été choisis pour être représentatifs des ruchers de la région).

Ces données ont contribué à la liste des AIP et résidus détectés sur des matrices apicoles.

Dans ces quatre ruchers, 13 colonies présentaient des troubles et 19 n'en présentaient pas. L'association entre troubles, mortalité et gain de poids dans les colonies a été examinée, ainsi que l'association entre troubles et détection des 33 résidus (pris un par un).

#### 3.2.2.6 ADARA<sup>34</sup> : Etude des dangers biologiques et chimiques sur 12 ruchers présentant des troubles en saison, en 2013, en région Rhône-Alpes

Cette étude d'initiative professionnelle a été mise en place comme un approfondissement du réseau national d'épidémiologie des troubles des abeilles (*cf.* paragraphe 3.2.1.7). Les douze ruchers signalés en Rhône-Alpes à cause de la survenue de troubles ont fait l'objet d'examen approfondis, d'une recherche systématique d'AIP avec une méthode calibrée (« standardisée » au niveau de cette étude) et quantitative (8 virus + *Nosema apis* et *N. ceranae*) et de recherches de résidus par trois laboratoires différents. Les loques n'ont pas été recherchées.

<sup>33</sup> CETIOM : Centre technique interprofessionnel des oléagineux, des protéagineux et du chanvre

<sup>34</sup> ADARA : Association pour le développement de l'apiculture en Rhône-Alpes

Ce jeu de données peut donc contribuer à la liste des AIP et des résidus détectés, avec une bonne fiabilité et comparabilité des charges infectieuses. La méthode analytique (qPCR) et les prises d'essai sont les mêmes que pour l'étude Oniris, qui a été faite dans une autre région et sur des ruchers sans troubles. Par contre pour les résidus, le nombre de substances et les quantités ne sont pas comparables d'un rucher à l'autre, car réalisés par des laboratoires différents.

Les cooccurrences entre dangers ont pu être décrites, mais n'ont pu être quantifiées que pour les AIP entre eux.

Les variables d'état et le type de symptômes renseignés sont assez disparates, mais permettent une réflexion d'ensemble sur la standardisation des questionnaires pour l'épidémiologie.

Enfin, l'association entre tel ou tel type de trouble et la présence de dangers biologiques a été recherchée.

### 3.2.2.7 DGAL : Réseau annuel de surveillance des troubles des abeilles 36 ruchers en 2013

La DGAL conduit depuis 2011 une épidémiologie passive, par remontée de déclarations volontaires, des troubles des abeilles. Il s'agit des cas cliniques de maladies infectieuses réglementées (loque américaine, nosérose à *Nosema apis*, arthropodes exotiques) et les « mortalités importantes en saison » (par exemple les intoxications massives).

La note de service DGAL/SDSPA/SDQP/N2012-8113 donne pour l'année 2013 la procédure d'investigation et le questionnaire à utiliser pour les cas signalés. L'objectif est de permettre aux services de l'Etat de prendre les mesures réglementaires appropriées pour enrayer les risques : assainissement des foyers de loque, repérage des effets indésirables de produits autorisés à la vente, sanctions pour l'utilisation inappropriée de produits homologués ou utilisation frauduleuse de produits non autorisés.

D'une façon générale, les troubles ont probablement été sous-déclarés (98 cas signalés pour toute la France, dont 36 ont été suffisamment bien renseignés pour pouvoir être utilisés pour le présent travail) et le remplissage des questionnaires est incomplet. Les analyses de laboratoire (AIP ou résidus) ont été effectuées selon le jugement du prescripteur en fonction de la suspicion, et sont peu comparables entre elles.

Ce jeu de données peut donc contribuer seulement à la liste d'AIP et de résidus détectés.

Les questionnaires remplis peuvent contribuer à la réflexion d'ensemble pour la définition des cas de « mortalité importante en saison » et la standardisation des questionnaires d'épidémiologie.

### 3.2.2.8 LNR Sophia-Antipolis - Bilan des résultats des échantillons soumis pour analyse au Laboratoire National de Référence 2011-2013

Le LNR réalise des analyses de détection d'AIP ou de résidus pour le compte de donneurs d'ordres publics ou privés. Les résultats des années 2011 à 2013 ont été extraits de la base de données interne au laboratoire. La base des résultats d'analyses chimiques étant distincte de celle des analyses microbiologiques, la structure des données ne permet pas de savoir quels dangers ont été identifiés simultanément sur les mêmes ruchers. Les motifs de l'analyse et les commémoratifs ne figurent pas dans la base.

Le jeu de données a été utilisé pour contribuer à la liste des dangers détectés, biologiques et chimiques. Il n'y a pas de données de co-exposition ni de variables d'état des colonies.

### 3.2.2.9 Laboratoire départemental d'analyses du Jura (LDA39) - Bilan des résultats des échantillons soumis pour analyse à un laboratoire départemental agréé 2006-2012

Le LDA39 réalise un certain nombre d'analyses de détection d'AIP en pathologie apicole pour le compte de donneurs d'ordre publics ou privés. Les résultats des années 2006 à 2012 ont été extraits de la base de données interne du laboratoire. Il n'y a pas de résultats d'analyses chimiques. Les motifs de l'analyse et les commémoratifs ne figurent pas dans la base.

Comme le précédent, ce jeu de données a été utilisé pour contribuer à la liste de dangers détectés. Il n'y a pas d'information sur les co-infections ni de variables d'état des colonies. A l'avenir, il serait intéressant que ces informations manquantes soient ajoutées dans les bases de données du LNR et des laboratoires départementaux d'analyses. Discussion générale sur les dangers détectés dans ces jeux de données

### 3.2.2.10 Grande diversité de dangers détectés dans différentes matrices

#### 3.2.2.10.1 Dangers biologiques

Le **Tableau 8** fait la synthèse des agents infectieux détectés sur les abeilles adultes et /ou sur le couvain. Selon les jeux de données, les « abeilles adultes » sont des abeilles de cadre ou des butineuses prélevées sur la planche d'envol. Les observations sont cohérentes avec les connaissances actuelles sur la sensibilité des méthodes, car certains dangers sont connus pour être plus facilement détectables sur telle ou telle matrice. Le seuil de détection dépend également de la méthode utilisée, les méthodes moléculaires sont généralement plus sensibles que la détection par comptage de spores (possible pour *Paenibacillus larvae*, et *Nosema* spp.). Les fréquences de détection dans les études sont données à titre indicatif dans ce **Tableau 8**.

La plupart des agents connus pour circuler en Europe sont détectés en France. Les virus sont omniprésents. Les agents des loques sont facilement détectés lorsque les méthodes moléculaires sont mises en œuvre. Les *Nosema* sont détectées dans toutes les études où elles ont été recherchées.

L'ensemble de ces observations est cohérent avec les connaissances actuelles sur la circulation de ces agents infectieux en France (cf. chapitres sur le portage asymptomatique et les dangers biologiques).

**Tableau 8 : Recherche et détection de dangers biologiques dans les jeux de données**  
(N = nombre d'études où le danger a été détecté / Nombre d'études où le danger a été recherché)

	Abeilles : prévalence (détection et symptômes – Epilobee)	Abeilles : détection	Couvain : détection	Commentaires
CBPV	1,2 – 2,6%	Oui (N = 8/8)	Non (N=2)	Virus souvent détecté dans les abeilles seulement
SBV	-	Oui (N = 7/8)	Oui (N = 5/5)	Virus souvent détecté dans les abeilles et le couvain
ABPV	-	Oui (N = 7/8)	Non (N=4)	Virus souvent détecté dans les abeilles seulement
BQCV	-	Oui (N = 7/8)	Oui (N=3/3)	Virus souvent détecté dans les abeilles et le couvain
DWV	-	Oui (N = 7/8)	Oui (N=2/3)	Virus souvent détecté dans les abeilles et le couvain
IAPV	-	Oui (N = 7/8)	Oui (N=3/3)	Virus souvent détecté dans les abeilles et le couvain
KBV	-	Oui (N= 4/8)	Non (N=3)	Virus parfois détecté dans les abeilles seulement
VdV1	-	Oui (N= 3/3)	-	Virus pas souvent recherché, mais détecté
<i>Paenibacillus</i> (loque américaine)	1,5 – 11,6%	Oui (N=1/1)	Oui (N=3/4)	Bactérie présente surtout sur couvain mais peu souvent recherchée
<i>Melissococcus</i> (loque européenne)	3,6 – 7,6%	Oui (N=1/1)	Oui (N=4/4)	Bactérie présente surtout sur couvain mais peu souvent recherchée
<i>Nosema</i> (comptage)		Oui (N= 5/5)	Oui (N=1/1)	Microsporidie souvent détectée sur abeille

<i>N. ceranae</i> (typage)	-	Oui (N = 7/7)	Oui (N=1/1)	<i>N. ceranae</i> plus souvent détectée que <i>N. apis</i>
<i>N. apis</i> (typage)	0 – 0,3%	Oui (N=4/6)	Non (N=1)	
<i>Acarapis woodi</i>	-	Oui (N=3/3)	-	Pas souvent recherché, mais détecté
<i>Varroa destructor</i>	0,9-7,3%	Oui (N= 4/4)	Oui (N=3/4)	Pas souvent recherché

### 3.2.2.10.2 Dangers chimiques

Dans sept des neuf études considérées, au total 115 résidus chimiques ont été recherchés sur des abeilles adultes, du pollen rapporté à la ruche ou du miel (ainsi que d'autres matrices).

Cinquante-cinq substances ont été détectées au moins une fois. La synthèse par catégories est indiquée dans le **Tableau 9**.

**Tableau 9 : Bilan des substances recherchées et détectées au moins une fois dans des ruches, dans 9 études sur le territoire français.**

Famille de substances	Nombre de substances recherchées	Nombre de substances détectées
<b>Acaricides</b>	6	3
<b>Herbicides</b>	3	3
<b>Fongicides</b>	38	22
<b>Insecticides</b>	61	27
<b>Autres</b>	7	0
<b>Total</b>	115	55

Les méthodes utilisées sont plus ou moins sensibles. En général, les méthodes multi-résidus sont moins sensibles. Les résultats sont d'autant plus difficiles à comparer entre eux qu'aucune méthode n'est normalisée d'une étude à l'autre. Certaines études ont fait appel à plusieurs laboratoires différents et des panels de substances différentes ont été recherchés.

L'analyse des données nous permet de constater que parmi les acaricides, c'est principalement l'Amitraze I et II, métabolites de l'amitraze (principal produit utilisé dans les ruches contre *Varroa*) qui sont détectés.

Sur les 61 insecticides analysés, 34 ne sont pas détectés, soit parce qu'ils sont effectivement absents, soit parce que leur niveau de concentration est inférieur aux limites de détection utilisées. Sept insecticides se dégagent des autres par leur détection plus fréquente notamment :

- le *tau*-fluvalinate et le coumaphos dans les abeilles,
- le carbaryl, le *tau*-fluvalinate, le phosmet, le coumaphos et le pyriproxifène dans le pollen,
- le carbaryl, l'imidaclopride, le *tau*-fluvalinate, le phosmet, le coumaphos, le pyriproxifène et le butoxyde de piperonyle dans le miel,
- le pyrimicarbe desméthyl, le thiaclopride, le thiaméthoxam, l'acétamipride, le *tau*-fluvalinate et le coumaphos dans le pain d'abeilles.

Sur les 38 fongicides recherchés, 16 ne sont pas ou peu détectés. Quatorze fongicides sont plus souvent détectés, notamment :

- le thiophanate-méthyl et le carbendazime dans les abeilles,
- le desthioprothioconazole, le pyrimethanil, le tebuconazole, le boscalide et le carbendazime dans le pollen,
- l'imazalil, le cyproconazole et le carbendazime dans le miel.

Le carbendazime est retrouvé fréquemment dans les trois matrices. Ces détections proviennent essentiellement de l'étude Oniris (échantillons de 2009, autorisation retirée depuis 2008 avec limite d'utilisation au 31/12/2009). Cette substance est également un métabolite d'autres benzimidazoles (thiophanate-méthyl et benomyl).

Les substances recherchées sont un sous-ensemble des substances réellement utilisées en France. Pour avoir un ordre de grandeur des quantités épandues, le bilan des quantités vendues,

de 2009 à 2012, des substances détectées dans les matrices, et leur place dans le classement des ventes, seront examinés dans le chapitre 4.2.

Le cas de l'étude Cruiser montre qu'il est peu fiable de quantifier l'exposition par la mesure des surfaces cultivées avec le produit dans la zone. En effet, le thiaméthoxam et son métabolite la clothianidine sont détectés dans les matrices apicoles de façon plus fréquente qu'attendu au vu des surfaces traitées dans la zone de butinage rapprochée (1,5 km dans cette étude). Ceci alors même qu'au moment de l'étude, aucun autre produit n'était homologué en France pour ces deux substances.

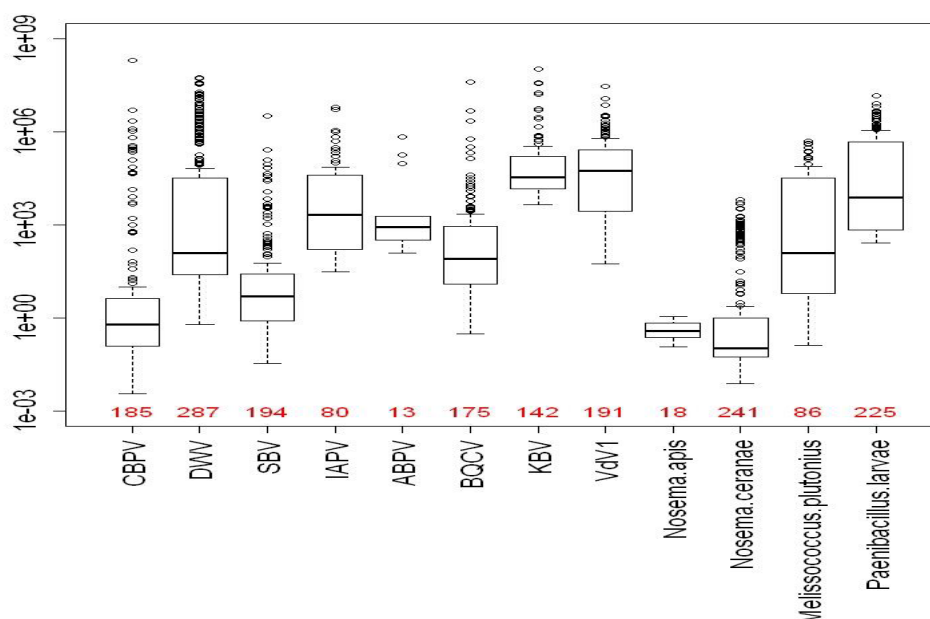
### 3.2.2.11 Des charges infectieuses et des quantités de résidus détectées très variables

#### 3.2.2.11.1 Charges infectieuses

La seule méthode qui donne des résultats standardisés comparables d'un laboratoire à l'autre pour la quantification des micro-organismes est le dénombrement de spores (pour l'agent de la loque américaine *Paenibacillus larvae* et pour *Nosema* spp.) (OIE 2014).

Les méthodes moléculaires, notamment la quantification par PCR quantitative utilisée pour quantifier les microorganismes, ne sont pas reproductibles d'un laboratoire à l'autre, même lorsqu'elles sont exprimées dans une même unité (nombre de copies par abeille). Les résultats ne peuvent être comparés qu'au sein d'une même étude, pour des variations saisonnières par exemple.

La **Figure 3** montre un exemple de l'étendue (minimum-maximum) des charges infectieuses détectées par qPCR dans l'étude Oniris sur des colonies sans troubles, au cours d'une saison apicole (mars à novembre 2009) dans le Grand-Ouest (méthode voir Gauthier *et al.* (2007)).



**Figure 3 : Minimum, maximum, médianes en « nombre de copies de gènes » par abeille détectés par qPCR dans des abeilles adultes de ruchers asymptomatiques durant l'année 2009, pour 12 agents infectieux.**

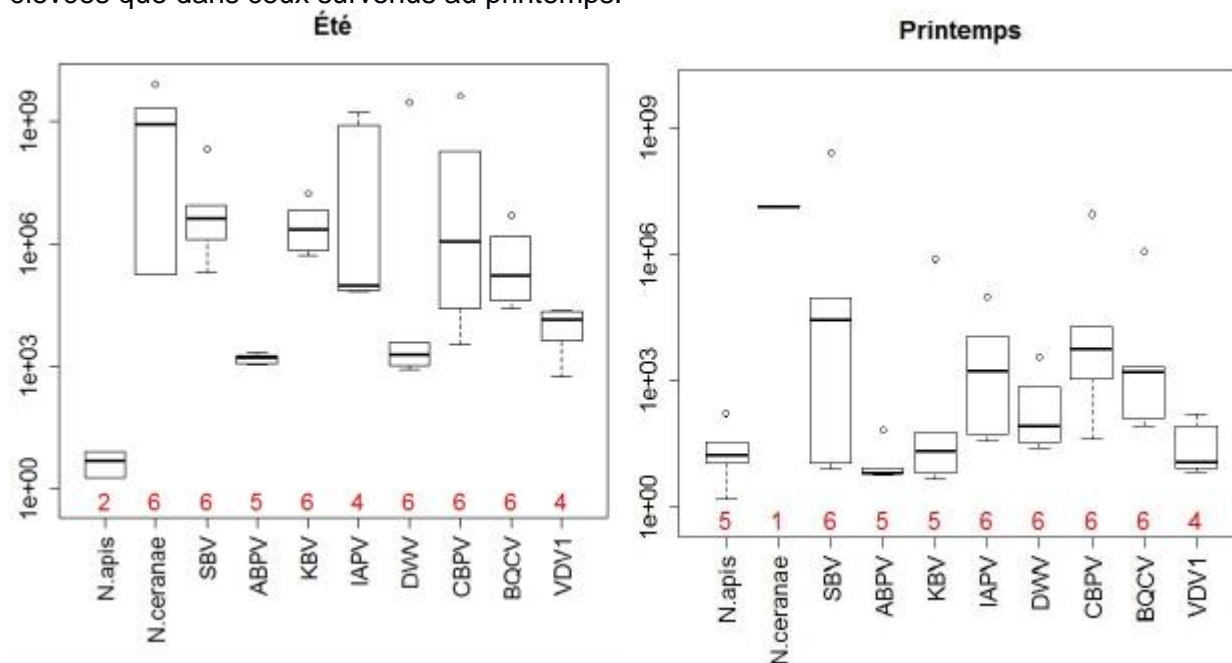
**Les boîtes à moustaches correspondent au premier et au troisième quartile (25 et 75 %). En rouge le nombre d'échantillons pour lesquels les résultats étaient disponibles.**

Les quantités d'agents détectés varient d'un facteur de 10 logarithmes, cette étendue recouvre certainement des différences saisonnières marquées. Cependant, on peut voir qu'elles sont systématiquement élevées pour le virus DWV et pour d'autres virus transmis par *Varroa*. L'étude Oniris ne donne pas d'information sur la charge parasitaire en *Varroa*, mais ces colonies sans

troubles hébergent manifestement de nombreux virus, les bactéries de la loque européenne et de la loque américaine, ainsi que ponctuellement de grandes quantités de *Nosema ceranae*.

Dans les données ADARA (13 cas de ruchers atteints de troubles de dépopulation ou de déséquilibres dans la structure de population de la ruche), les charges infectieuses détectées étaient aussi très variables, notamment entre le printemps et l'été (**Figure 4**).

Dans les cas d'été, les quantités mesurées en *Nosema ceranae*, CBPV, IAPV, BQCV étaient plus élevées que dans ceux survenus au printemps.



**Figure 4 : Minimum, maximum, médianes et quartiles du nombre de copies de gène par abeille détectés par qPCR dans des abeilles de 12 ruchers symptomatiques en 2013 (cas cliniques étude ADARA), pour 10 agents infectieux. En rouge le nombre d'échantillons pour lesquels les résultats étaient supérieurs à la limite de quantification.**

### 3.2.2.11.2 Analyse des résidus

Pour les résidus, les doses détectées (lorsqu'ils sont quantifiables) dépendent de la méthode, du laboratoire, de la matrice, de la prise d'essai et des conditions de stockage avant analyse. Il est donc totalement impossible de comparer les données quantitatives d'une étude à l'autre. En ordre de grandeur, la plupart des résidus positifs se situent autour de 10 fois la limite de quantification. On peut cependant remarquer, de manière générale, que toutes les matrices apicoles peuvent être contaminées par une multiplicité de pesticides, particulièrement par des insecticides (incluant les acaricides) et des fongicides.

### 3.2.3 Conclusion

Ces résultats ne permettent pas d'inférence sur la prévalence des dangers biologiques ou chimiques dans les ruchers en France, car les conditions de représentativité des échantillons ne sont pas réunies (existence de biais statistiques). De plus, une partie seulement de ces études étaient conçues pour une recherche systématique et standardisée d'une batterie de dangers biologiques et chimiques.

Néanmoins, ces observations permettent de préciser dorénavant les dangers à rechercher, et les méthodes à utiliser.

Pour les dangers biologiques, ces observations montrent qu'il faut des méthodes :

- qui détectent simultanément les principaux agents connus pour être potentiellement pathogènes en France ;



- qui soient spécifiques (distinction *Nosema ceranae*/*Nosema apis* par exemple, ou distinction entre les virus du complexe AKI) ;
- qui soient quantitatives (quantification relative entre agents, entre échantillons, entre dates de prélèvement) ;
- avec un seuil de détection assez bas.

Les méthodes de PCR quantitative répondent à ces besoins. Leur coût est aujourd'hui encore élevé, mais d'autres technologies (miniaturisées) pourront être utilisées à l'avenir, sous réserve qu'elles répondent à ces critères.

Ce type de méthode présente un grand intérêt en particulier pour les loques européenne et américaine, pour lesquelles la situation de prévalence est encore mal connue. Il est assez remarquable que ces deux agents ne soient généralement recherchés qu'après une suspicion clinique. Il est pourtant possible autant que pour d'autres agents qu'ils aient des effets subcliniques, additifs ou synergiques avec d'autres dangers.

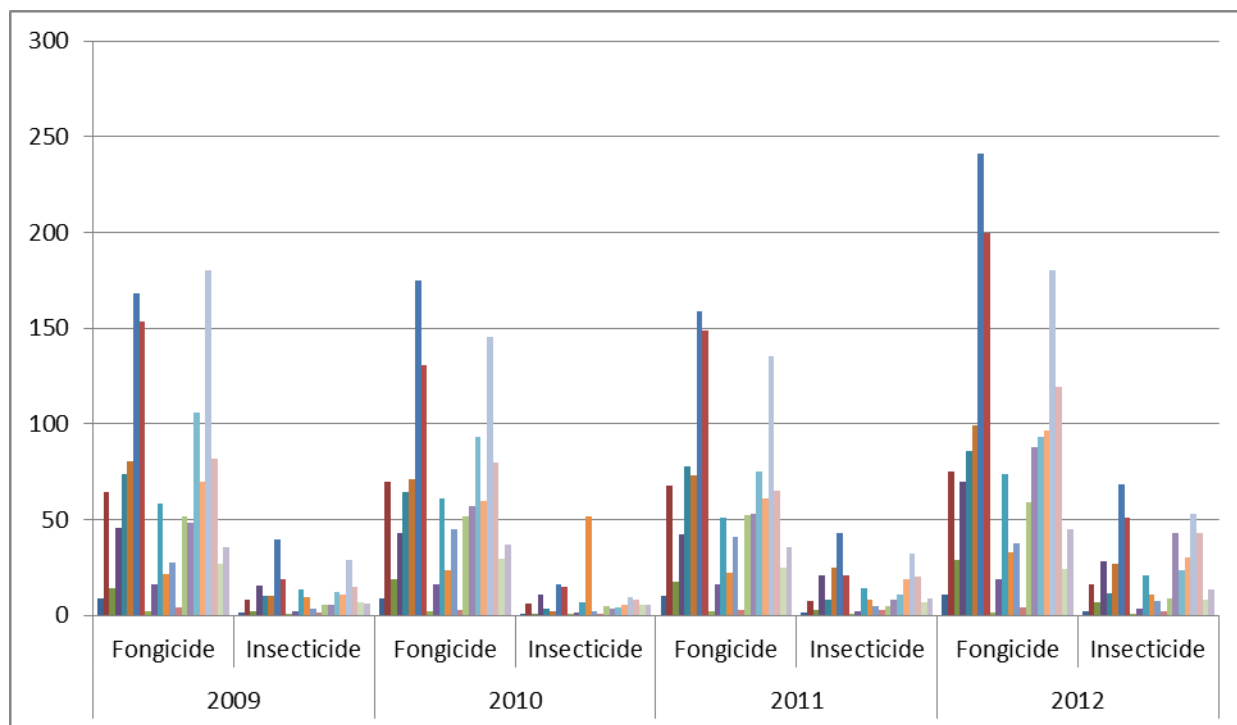
Pour les dangers chimiques, c'est la grande diversité et la multiplicité des substances détectées dans les différentes matrices qui est marquante. La diversité des substances réellement présentes est très certainement sous-estimée dans ces jeux de données, d'abord parce que le nombre de substances recherchées par étude est relativement peu élevé. Toutefois, il apparaît clairement que ce sont les insecticides et fongicides qui constituent les principaux agents chimiques présents dans toutes les matrices apicoles. Ici, en tout, 115 substances différentes ont été recherchées, alors que plus de 400 sont commercialisées en France (données BNV – D, 2012).

De plus en plus de méthodes multi-résidus sont développées par les laboratoires d'analyses, mais celles-ci ont souvent le désavantage d'être peu sensibles, avec un seuil de détection trop haut. Elles ont également un coût de mise en œuvre élevé, lié à la calibration et à la validation des appareils pour chaque substance et chaque matrice. Enfin, pour chaque matrice, le type d'extraction conditionne la sensibilité de l'analyse.

Le type de matrice à analyser en priorité dépend de la nature physico-chimique des résidus recherchés (lipophiles, hydrosolubles...), mais aussi du type de risque qui est évalué.

Lorsqu'un cas d'intoxication par un agent chimique est suspecté, les méthodes d'analyse multi-résidus sont d'abord à privilégier, notamment si l'agent chimique n'est pas identifié par une enquête de terrain, par exemple. Selon le résultat analytique, aucun, un ou plusieurs agents chimiques peuvent être présents. Ne rien détecter ne signifie pas qu'aucun agent chimique n'est en cause. Il convient alors de vérifier que la sensibilité de la méthode analytique (en termes de limites de détection et de quantification) est en adéquation avec l'investigation. Si cette sensibilité est bien adaptée à la situation, il conviendra alors d'élargir le spectre des substances recherchées. Si un agent chimique unique est détecté, il est nécessaire d'évaluer la cohérence du lien de causalité entre (1) la toxicité et/ou les effets de cet agent, (2) la teneur retrouvée de cet agent chimique dans la matrice analysée (compte tenu des limites de quantification et de détection de la méthode), (3) ses caractéristiques physico-chimiques (stabilité, etc.) et (4) la connaissance de la situation de terrain (traitements selon lieux et dates par exemple). Lorsque plusieurs agents chimiques sont identifiés, cette démarche, appliquée à chaque agent chimique, permettra de hiérarchiser les causes d'intoxications possibles, de la moins probable à la plus probable. Dans le cas où un agent chimique est fortement suspecté ou dans les cas de recherche de confirmation ou de meilleure sensibilité, les méthodes mono-résidus (qui impliquent la recherche de métabolites pertinents) sont à privilégier. Il existe également des méthodes multi-résidus à faible nombre d'agents recherchés, qui présentent l'avantage de combiner les atouts des méthodes précédentes, en termes d'identification et de sensibilité pour les matrices analysées. Enfin, il faut toujours garder à l'esprit que certaines substances ont des effets indirects importants à faibles concentrations (synergie avec d'autres facteurs de stress, inhibition de fonctions biologiques, etc.), de sorte que leur analyse doit toujours se faire avec une sensibilité adaptée, c'est-à-dire la plus grande possible. L'interprétation des résultats toxicologiques peut être délicate. L'identification d'un pesticide ou d'un métabolite dans un échantillon biologique est une preuve d'exposition. Mais il est souvent difficile d'évaluer précisément la dose ou la durée de l'exposition du fait des délais imprécis entre l'incident et la collecte des échantillons.

La Base de Données Nationale des Ventes de produits phytopharmaceutiques réalisées par les distributeurs agréés (BNV-D) a été consultée pour voir la place des substances détectées au gré de ces neuf études, dans l'ensemble des produits phytosanitaires. La base recense plus de 400 substances commercialisées chaque année en France métropolitaine, sous la forme de plus de 2500 produits différents. Par exemple, le boscalide, qui ressort dans un certain nombre d'études, y figure en 21<sup>ème</sup> place parmi les fongicides, en kg de substance active vendue (source : Onema et Anses – Banque nationale des ventes de produits phytopharmaceutiques réalisées par les distributeurs agréés – BNV-D). A titre d'exemple, la **Figure 5** montre les quantités vendues cumulées de 15 substances qui ont été détectées dans les matrices apicoles pour les usages fongicide et insecticide, par région et par an<sup>35</sup>. Ces données, qui ne reprennent qu'une fraction des substances utilisées en France, montrent que les co-expositions à des insecticides et des fongicides peuvent avoir lieu en permanence et être massives dans certaines régions.



**Figure 5 : Variation interannuelle et inter-régionale des quantités vendues cumulées par usage (en Tonnes) de 15 substances actives détectées dans les matrices apicoles en France (7 fongicides et 8 insecticides). Chaque couleur de barre d'histogramme représente les quantités cumulées pour l'une des 22 régions de France métropolitaine (source : Onema et Anses – Banque nationale des ventes de produits phytopharmaceutiques réalisées par les distributeurs agréés – BNV-D)**

La grande diversité des substances pouvant être rencontrées est reflétée aussi par une enquête sur les usages de produits phytosanitaires dans les zones de butinage de l'étude Oniris (18 ruchers dans le Grand-Ouest). La surface enquêtée représente près de la moitié de la surface totale des aires de butinage étudiées (Lambert 2012).

Le **Tableau 10** et le **Tableau 11** extraits de cette thèse montrent le grand nombre de traitements appliqués et la grande diversité des substances utilisées dans ces 18 aires de butinage.

<sup>35</sup> Sept fongicides = thiophanate-méthyl ; carbendazime ; des thioprothioconazole ; primethanyl ; tebuconazole ; boscalid ; cyproconazole. Huit insecticides = tau-fluvalinate ; carbaryl ; phosmet ; imidaclopride ; pyrimicarbe desmethyl ; thiaclopride ; thiamethoxam ; pyrimiphos-methyl

**Tableau 10 : Récapitulatif, par type paysager, du nombre de traitements phytosanitaires et vétérinaires réalisés dans les aires de butinage des 18 ruchers du Grand Ouest et rapportés à un hectare de surface enquêtée (source : Lambert, 2012, thèse de doctorat)**

Rucher	Nombre de traitements phytosanitaires		Nombre de traitements vétérinaires	Total	Nombre moyen de traitements par ha de surface enquêtée
	Usage professionnel agricole	Autres usages			
Bocage	5023	420	975	5443	0,52
Cultures	5754	133	397	5887	0,74
Urbain	872	791	246	1663	0,72
Insulaire	48	86	37	134	2,02

**Tableau 11 : Comparaison, par type paysager, du nombre de molécules différentes utilisées en 2008 dans les ruchers de l'étude par type paysager (résultats des enquêtes) et du nombre de molécules différentes recherchées et retrouvées dans les matrices apicoles (résultats des analyses toxicologiques) (source : Lambert, 2012, thèse de doctorat)**

Rucher	Nombre de molécules utilisées	Nombre de molécules utilisées et recherchées	Nombre de molécules utilisées, recherchées et retrouvées dans les matrices apicoles	Nombre de molécules retrouvées dans les matrices apicoles et non utilisées
Bocage	201	24	9	10
Cultures	223	35	16	8
Urbain	161	21	6	9
Insulaire	20	6	1	10

On remarquera une certaine discordance entre les molécules recherchées et celles utilisées dans la zone, ce qui est lié au fait que le panel des substances à rechercher a été décidé avant de connaître les résultats des enquêtes. Ensuite, les analyses ont révélé un certain nombre de substances qui n'avaient pas été recensées dans les enquêtes, soit parce que les utilisateurs n'avaient pas été interrogés, soit parce que les surfaces traitées étaient à l'extérieur de la zone des 3 km de rayon de butinage.

Il s'y ajoute que les ventes et usages de produits phytosanitaires sont très variables d'une région à l'autre pour une même année (consultation de la BNV-D).

Par conséquent, sauf à suspecter d'emblée une substance en particulier, les stratégies de détection de pesticides devraient avoir les caractéristiques suivantes :

- viser un panel de substances connues pour être utilisées localement, par exemple en consultant la BNV-D. Un minimum de quantité vendue dans la région peut être fixé, pour éviter de rechercher des substances utilisées de façon anecdotique ;
- utiliser des méthodes quantitatives avec des seuils de détection compatibles avec des hypothèses de potentialisation et des effets subcliniques ;
- en fonction de la question posée, tenir compte des traitements multiples appliqués sur la zone de butinage, et donc de l'éventuelle accumulation des substances dans certaines matrices comme les cires ou le pain d'abeilles. Selon la question posée, la matrice à analyser peut être différente.

### 3.3 Conclusions / recommandations

Dans le cadre des co-expositions des abeilles aux facteurs de stress, un certain nombre de facteurs ont été recensés dans la bibliographie et étudiés dans le présent rapport (sans hiérarchisation de leur importance dans la présentation). Les facteurs de stress les plus nombreux et importants sont les agents infectieux et chimiques.

**En ce qui concerne les dangers biologiques**, un certain nombre d'agents bactériens, viraux et parasitaires ont été identifiés comme facteurs de stress en France métropolitaine. Le pouvoir pathogène de certains de ces agents infectieux, notamment de virus et de *Nosema ceranae*, reste à approfondir, au laboratoire et sur les colonies d'abeilles. Il faut en outre souligner l'importance du portage asymptomatique d'agents infectieux et parasitaires rapportés dans la littérature et observés dans les jeux de données françaises examinés par le groupe de travail. Le maintien en équilibre de cette population microbienne est lié à des facteurs aussi bien intrinsèques à la ruche, qu'environnementaux, et dont l'altération peut conduire à l'apparition de troubles. Il est ainsi nécessaire de distinguer le portage asymptomatique et la maladie clinique. Des études récentes s'intéressent au caractère prédictif du portage pour l'apparition de troubles ultérieurs, notamment par une approche intégrant des données démographiques dans la colonie et spatio-temporelles au cours des saisons apicoles.

Le groupe de travail recommande la poursuite d'études :

- visant à préciser les facteurs de virulence d'agents infectieux, au laboratoire et à l'échelle des colonies, ainsi que le rôle des charges infectieuses dans l'apparition des troubles ;
- pour déterminer les mécanismes physiopathologiques impliqués, à l'échelle de la colonie et de l'individu ;
- sur le caractère prédictif des quantités d'agents infectieux présents dans l'apparition de troubles ultérieurs, en lien ou pas avec la présence de facteurs chimiques.

**En ce qui concerne les dangers chimiques**, leur nombre et leur diversité sont très élevés. Les substances d'intérêt dans le cadre du présent travail ont été les pesticides et substances à usage vétérinaire : les insecticides, les fongicides et les acaricides, notamment ceux utilisés en apiculture contre *Varroa destructor*. Un certain nombre de substances ont été identifiées comme impliquées dans des troubles chez les abeilles, parfois à des doses sublétales. La description des troubles a, dans certaines études, été associée à l'identification de mécanismes explicatifs. On peut remarquer que les études en laboratoire sont plus nombreuses que les études sous tunnel et/ou en plein champ, ce qui peut s'expliquer par les difficultés de réalisation et d'interprétation de ces dernières. L'exposition des abeilles au champ n'est pas comparable à l'exposition contrôlée en laboratoire et les résultats pour une même substance sont différents du fait du mode d'exposition qualitatif et quantitatif. La diversité des substances retrouvées dans les matrices apicoles a pu être constatée dans la littérature et elle ressort des résultats d'analyse des jeux de données examinés par les experts.

Le groupe de travail recommande la poursuite d'études :

- visant à préciser les expositions et les effets toxiques des molécules chimiques auxquelles les colonies sont exposées ;
- pour déterminer les mécanismes impliqués, à l'échelle de la colonie et de l'abeille-individu ;
- sur le caractère multiple de ces expositions au cours du temps et de leurs effets en co-exposition avec d'autres facteurs (chimiques et biologiques).

**L'alimentation et les ressources environnementales**, par leur abondance et leur diversité, jouent un rôle important dans la reproduction, le développement et l'entretien des colonies d'abeilles. Elles ont également une influence sur la santé et la tolérance des abeilles à d'autres facteurs de stress. Plusieurs études ont ainsi mis en évidence des effets négatifs de carences nutritionnelles sur le métabolisme et l'immunité. Ces études ont été principalement réalisées en laboratoire, il est donc important de savoir si les effets observés sont transposables en conditions naturelles.

Le groupe de travail recommande donc la conduite d'études en conditions naturelles.

Certaines **pratiques apicoles**, si elles ont pour objectif de préserver la santé des abeilles, peuvent générer un stress susceptible de s'ajouter à d'autres facteurs et induire l'apparition de troubles. L'impact négatif possible peut être inhérent à la pratique elle-même ou relever de pratiques inadaptées ou non réalisées. Le respect de bonnes pratiques apicoles, fondé sur une formation approfondie à l'apiculture, est une condition importante pour la santé des ruchers.

Concernant le climat, l'intensité et la durée des phénomènes météorologiques doivent être pris en compte comme des facteurs susceptibles de modifier l'équilibre physiologique d'une colonie et entraîner son affaiblissement. Les processus physiologiques de réponse des colonies au changement climatique sont encore assez méconnus et difficilement quantifiables ; ils devraient faire l'objet de recherches.

Dans ce contexte, le groupe de travail souligne l'intérêt d'utiliser et de maintenir des populations d'abeilles adaptées aux conditions locales.

La diversité des facteurs de stress auxquels les abeilles peuvent être exposées, de manière concomitante ou successive, apparaît donc importante. De plus, pour chaque facteur, il peut exister une grande variabilité d'un rucher à l'autre, voire d'une colonie à l'autre. Il en résulte une difficulté à déterminer le rôle attribuable à l'un ou l'autre de ces facteurs lors de troubles dans les colonies, ou leurs effets conjoints, et à pouvoir effectuer des comparaisons entre ruchers. En tout état de cause, ces divers facteurs de stress concourent à l'affaiblissement et aux troubles des colonies, même si dans certains cas un seul type de facteur peut être mis en cause (ex : infestation importante par *Varroa*, intoxication par un pesticide, etc.).

**Les résultats de l'analyse statistique des jeux de données** confirment le nombre important et la diversité des dangers biologiques et chimiques détectés dans les colonies d'abeilles en France. Ces résultats n'ont pas permis de conclure sur la prévalence des dangers biologiques ou chimiques dans les ruchers en France, les conditions de représentativité des échantillons n'étant pas réunies, et seules certaines de ces études ayant été conçues pour une recherche systématique et standardisée de dangers biologiques et chimiques.

Néanmoins, ces observations permettent de préciser les dangers à rechercher, les matrices à prélever et les méthodes à utiliser.

Pour les dangers biologiques, il faudrait des méthodes spécifiques, sensibles et quantitatives détectant simultanément les principaux agents potentiellement pathogènes en France.

Les stratégies de détection de xénobiotiques devraient avoir les caractéristiques suivantes :

- viser un panel de substances connues pour être utilisées dans la région ;
- développer et utiliser des méthodes quantitatives avec des seuils de détection et de quantification compatibles avec des études de potentialisation de molécules et de leurs effets adverses sur les colonies d'abeilles ;
- en fonction de la question posée, tenir compte des traitements multiples appliqués sur la zone de butinage dans le temps et cibler la(les) matrice(s) à analyser.

En outre, l'évolution des substances chimiques (cinétique de dégradation, accumulation, etc.) dans les différentes matrices apicoles, y compris les abeilles et les cires, devrait faire l'objet de recherches qui contribueraient au choix des matrices à prélever lors de troubles, de préciser les possibles co-expositions et interactions, concomitantes et successives, à des agents chimiques.

## 4 Co-expositions des abeilles aux facteurs de stress et interactions entre ces facteurs : mécanismes impliqués ; méthodes de mise en évidence

### 4.1 Données bibliographiques

Des données sur la contamination des matrices apicoles ont été collectées par le FERA (Thompson 2012), l'EFSA (EFSA 2012b; EFSA 2013d) et dans le cadre des travaux du GT :

- Thompson (2012) a trouvé 148 publications pour décrire les voies d'expositions des abeilles et leurs importances relatives, 103 références de mélanges et 112 publications portant sur des interactions pesticides/maladies ;
- l'EFSA a constitué une base en sélectionnant les concentrations les plus élevées retrouvées dans les publications et dans les monographies des substances et préparations phytopharmaceutiques pour développer un modèle d'exposition « pire-cas » pour des calculs réglementaires ;
- des données disponibles en France ont été regroupées et analysées dans le cadre de cette saisine pour décrire les co-expositions des abeilles aux substances (*cf. infra*).

La présence d'agents infectieux et de résidus dans les matrices apicoles, et donc de (co)exposition des abeilles individuelles et des colonies d'abeilles, est ainsi une réalité dont la mise en évidence s'est significativement développée avec l'amélioration des méthodes analytiques et de leurs seuils de détection/quantification. Ces co-expositions peuvent conduire à des interactions entre agents infectieux, agents chimiques et agents infectieux/agents chimiques *via* la mise en jeu de différents mécanismes, immunitaires et de détoxification en particulier. Ce chapitre présente les mécanismes de l'immunité et de détoxification possiblement mis en jeu dans les interactions, puis les types d'interactions rapportés dans la littérature.

#### 4.1.1 Mécanismes de l'immunité et de détoxification au niveau individuel et à l'échelle de la colonie

##### 4.1.1.1 Immunité de l'abeille et de la colonie d'abeilles

###### 4.1.1.1.1 Immunité individuelle

###### 4.1.1.1.1.1 Voies et réponses immunitaires

Comme tous les insectes, l'abeille possède différentes lignes de défenses. La première est représentée par la cuticule dont les propriétés physiques et chimiques préviennent l'entrée d'agents infectieux dans l'organisme. Cependant, les agents infectieux peuvent parvenir à traverser la cuticule ou tout simplement accéder aux organes internes par voie alimentaire, aérienne ou respiratoire. Interviennent alors les mécanismes de défenses du système immunitaire inné comprenant les défenses cellulaires et humorales.

**La réponse humorale** comprend la mélanisation (processus de cicatrisation) et la production, au niveau des corps gras, de peptides antimicrobiens circulant ensuite dans l'hémolymphe (apidaécines, abaécines, défensines, hyménoptacécines et lysozymes), tandis que **la réponse cellulaire** est menée par les hémocytes régulant la phagocytose et l'encapsulation de corps étrangers. Ces réponses permettent de lutter contre divers types d'agents infectieux comme les

bactéries, les champignons et les virus. Elles sont régulées par différentes voies de signallement qui consistent en la reconnaissance de l'agent infectieux, la modulation ou amplification du signal de reconnaissance, et la production de protéines ou métabolites directement impliqués dans l'inhibition ou la destruction de cet agent infectieux.

Quatre voies de signallement majeures et interconnectées ont été décrites chez l'abeille : les voies Toll, Imd, Jak/STAT et Jnk (Evans *et al.* 2006). Les voies Toll et Imd sont principalement impliquées dans la réponse humorale, et la voie Jak/STAT régule les deux types de réponses (humorales et cellulaires). La voie Jnk est encore mal connue mais participe à la réponse humorale. Le déclenchement de ces réponses immunitaires est initié par la détection de motifs moléculaires caractéristiques des pathogènes (*pathogen-associated molecular patterns* - PAMPs). Ainsi, les bactéries sont en général reconnues par des *peptidoglycan recognition proteins* (PGRPs) et les eukaryotes, comme les champignons, par des *Gram-negative binding protein* (GNBPs).

L'analyse du génome de l'abeille a permis d'identifier les différents gènes potentiellement impliqués dans ces voies mais il semblerait que l'abeille ne possède qu'un tiers des gènes de l'immunité préalablement identifiés chez la Drosophile. Par exemple, les protéines de reconnaissance PGRPs des abeilles sont peu diversifiées comparées à celles de la mouche. Il en existe seulement 4 dans le génome de l'abeille mais 13 dans celui de la Drosophile (Evans *et al.* 2006). Ce déficit de gènes de l'immunité semble être une tendance chez les insectes sociaux et ainsi une conséquence de l'évolution de la socialité et de l'immunité sociale (voir ci-dessous). Il se peut aussi que d'autres voies ou gènes non encore identifiés jouent également un rôle dans l'immunité de l'abeille. Par exemple, chez les insectes, la production de dérivés réactifs de l'oxygène représente une des réponses immédiates face à l'intrusion d'un agent infectieux au niveau de l'intestin (Ha *et al.* 2005).

Différentes études ont permis d'identifier les réponses immunitaires des abeilles face à des bactéries (Evans 2004; Evans *et al.* 2006; Siede *et al.* 2012), des champignons (Antúñez *et al.* 2009; Aronstein *et al.* 2010; Aronstein et Murray 2010; Chaimanee *et al.* 2012; Dussaubat *et al.* 2012; Huang *et al.* 2012; Schwarz et Evans 2013), des trypanosomes (Schwarz et Evans 2013) et au *Varroa* (Navajas *et al.* 2008; Nazzi *et al.* 2012; Yang et Cox-Foster 2005; Zhang *et al.* 2010), mais les réponses à une infection virale sont moins bien connues. Elles semblent être initiées par la reconnaissance d'ARN double brin, agissant comme PAMP viral chez l'hôte (Flenniken et Andino 2013), mais ne semblent pas impliquer de réponse humorale ou cellulaire, du moins en ce qui concerne l'ABPV (Azzami *et al.* 2012). Des stimulations du système immunitaire induisent des changements importants de l'expression d'un grand nombre de gènes et pas uniquement des gènes impliqués dans les cascades de la réponse immunitaire (Richard *et al.* 2012). Chez l'abeille solitaire *Megachile rotundata* exposée à des températures variables, certains gènes impliqués dans la régulation de l'immunité voient leur transcription modulée (Xu et James 2012).

Compte tenu de l'absence d'immunité spécifique et de réponse clonale chez l'abeille, les approches vaccinales ne semblent pas envisageables à l'heure actuelle.

#### 4.1.1.1.2 Ontogénèse de l'immunocompétence

La capacité des abeilles à produire une réponse immunitaire face à un antigène, ou immunocompétence, n'est pas constante et varie selon l'âge ou le sexe. Ainsi, chez les ouvrières, la production de phénoloxydase (PO), impliquée dans la synthèse de mélanine, la cicatrisation, l'encapsulation et la stimulation de la phagocytose, est la plus faible chez les larves et pupes et augmente avec l'âge chez les adultes (nourrices vs butineuses) (Schmid *et al.* 2008; Wilson-Rich *et al.* 2008). Par contre, les corps gras, site majeur de l'immunocompétence humorale, et le nombre d'hémocytes diminuent avec l'âge chez les adultes (Schmid *et al.* 2008; Wilson-Rich *et al.* 2008). Cette diminution du nombre d'hémocytes n'est pas retrouvée dans une autre étude (Amdam *et al.* 2005), ce qui indique que les variations dans l'abondance des hémocytes doivent dépendre d'autres facteurs que l'âge ou le statut comportemental, comme les facteurs nutritionnels ou génétiques. Cependant, le taux d'hémocytes est supérieur chez les larves et pupes comparés aux adultes (Wilson-Rich *et al.* 2008).

Les mâles ont une immunocompétence similaire aux ouvrières avec une faible production de PO chez les larves et pupes mais qui augmentent à l'émergence (Laughton *et al.* 2011). De même,

l'investissement dans la production de peptides antimicrobiens produits au niveau des corps gras diminue avec l'âge chez les adultes (Laughton *et al.* 2011). Toutefois, les adultes sont capables de développer une gamme de réponses immunitaires plus large que les larves (Gatschenberger *et al.* 2012), mais ces réponses restent plus faibles que chez les ouvrières (Laughton *et al.* 2011). Enfin, il faut rester prudent sur le lien entre la capacité immunitaire à répondre à un agent infectieux et la survie des abeilles, car les deux ne sont pas forcément liés (Bull *et al.* 2012).

#### 4.1.1.1.1.3 Modulation de l'immunocompétence

Au-delà des processus développementaux, l'immunocompétence des abeilles peut être régulée par l'alimentation pollinique (Alaux *et al.* 2010b) ou en miel (Mao *et al.* 2013). Par exemple, la stimulation de la production de certains peptides antimicrobiens par des constituants du miel laisse à penser que les apports alimentaires en substituts de miel aux colonies (par exemple du sirop de maïs à haute teneur en fructose) ne sont pas forcément bénéfiques pour la santé des abeilles (Mao *et al.* 2013). Les facteurs génétiques ont un aussi un rôle dans le façonnement de l'immunocompétence (Decanini *et al.* 2007).

Enfin des facteurs externes à la biologie de l'abeille peuvent perturber l'immunocompétence des individus, comme c'est le cas des pesticides, incluant les acaricides utilisés contre le *Varroa*, qui induisent une stimulation ou une inhibition de l'expression de certains gènes de l'immunité (Boncristiani *et al.* 2012; Garrido *et al.* 2013; Gregorc *et al.* 2012). Une étude récente montre que l'exposition aux néonicotinoïdes provoque une inhibition de la voie de signalisation Toll, ce qui aurait pour conséquence d'affaiblir le système immunitaire (Di Prisco *et al.* 2013). Cette étude est d'autant plus marquante que les voies Toll et Imd sont les principaux régulateurs de la réponse immune des insectes contre les bactéries, pour la production de défensines par exemple (Bonmatin *et al.* 1992; Il'iasov *et al.* 2012; Randolt *et al.* 2008).

#### 4.1.1.1.1.4 Coût de la réponse immunitaire

Si les défenses immunitaires sont nécessaires à l'hôte en réduisant l'impact des agents pathogènes, une réponse immunitaire implique souvent un coût énergétique direct. Par exemple, une réponse immunitaire "relativement simple", comme l'encapsulation, peut augmenter le taux métabolique jusqu'à 28 % dans différentes espèces d'insectes (Ardia *et al.* 2012; Freitak *et al.* 2003). Ceci suggère un fort coût énergétique de la réponse immunitaire, et peut-être des changements dans le comportement des individus afin de s'adapter à cette augmentation de la dépense énergétique. A titre d'exemple, l'apprentissage et la mémoire sont à la base de comportements ayant un coût énergétique pour les abeilles (Jaumann *et al.* 2013), ce qui suggère des perturbations cognitives à la suite d'un « stress » immunitaire (Alghamdi *et al.* 2008; Mallon *et al.* 2003).

#### 4.1.1.1.1.5 Microbiote et immunité

Le microbiote<sup>36</sup>, formant la population de symbiotes<sup>37</sup> de l'hôte, a récemment été identifié chez l'abeille (Engel *et al.* 2012; Olofsson et Vásquez 2008) et semble aussi jouer un rôle dans l'immunité des abeilles. En effet, il a été démontré que certaines bactéries du microbiote pouvaient stimuler le système immunitaire des abeilles (Evans et Lopez 2004) et améliorer la résistance des larves face aux agents des loques américaines (*Paenibacillus larvae*) et européennes (*Melissococcus plutonius*) (Evans et Armstrong 2005; Forsgren *et al.* 2010; Sabaté *et al.* 2009; Vasquez *et al.* 2012). Ceci laisse à penser qu'une dysbiose<sup>38</sup> de la flore symbiotique de l'abeille peut conduire à un affaiblissement de l'état général de la colonie (Hamdi *et al.* 2011). En effet, une étude métagénomique a montré que la présence de certaines bactéries était dramatiquement réduite chez les abeilles de colonies atteintes de CCD (Colony Collapse Disorder) par rapport à des abeilles de colonies saines (sans CCD) (Cox-Foster *et al.* 2007).

<sup>36</sup> Ensemble des micro-organismes existant dans un environnement donné

<sup>37</sup> Microorganismes établissant des interactions soutenues avec leur hôte et formant une association durable et à bénéfice mutuel

<sup>38</sup> Déséquilibre du microbiote



#### 4.1.1.1.2 Immunité sociale

Au-delà de l'immunité individuelle, les abeilles ont développé des mécanismes de défense collective résultant d'une coopération comportementale entre les individus appelés immunité sociale (Cremer *et al.* 2007; Wilson-Rich *et al.* 2009). En effet, la ruche offre un environnement favorable au développement d'agents infectieux ou de maladies entre les membres de la colonie : forte concentration d'hôtes potentiels en constante interaction et microclimat stable (température, humidité). Des adaptations comportementales permettent d'éviter ou de résister à la propagation des parasites ou agents infectieux. Ces comportements sont très divers et permettent de prévenir ou minimiser la propagation d'une infection.

##### 4.1.1.1.2.1 Réduction de la sensibilité

Les butineuses, généralement les ouvrières âgées, sont les plus susceptibles d'introduire des maladies au sein de la colonie. Les abeilles peuvent limiter l'intrusion d'agents infectieux en effectuant une sélection des individus à l'entrée de la colonie et ainsi rejeter les abeilles malades (Waddington et Rothenbuhler 1976). De plus, les butineuses meurent en général en dehors de la colonie et les abeilles mortes à l'intérieur de la colonie sont expulsées, ce qui contribue à réduire les risques d'infection.

Les ouvrières collectent aussi des matériaux issus de certaines plantes afin d'étanchéifier la ruche. Cette résine végétale ou propolis possède des propriétés antiseptiques qui permettraient de limiter le développement d'infections dans la colonie (Simone-Finstrom et Spivak 2010). En effet, des tests en laboratoire montrent une certaine efficacité de la propolis contre la loque américaine (Antunez *et al.* 2008; Bastos *et al.* 2008) et le *Varroa* (Garedew *et al.* 2002). Cependant, sur le terrain, les colonies collectant plus de propolis ne présentent pas forcément des taux plus faibles de *Varroa* comparées à des colonies collectant peu de propolis (Nicodemo *et al.* 2013). A noter que l'exposition à la propolis réduirait l'expression de certaines fonctions immunitaires (Simone *et al.* 2009), suggérant une diminution de l'investissement dans l'immunité individuelle.

Enfin, puisque l'immunocompétence varie selon le profil génétique des abeilles (Decanini *et al.* 2007), la polyandrie<sup>39</sup> assurerait une meilleure résistance aux maladies, en particulier celles affectant le couvain (Tarpay et Seeley 2006).

##### 4.1.1.1.2.2 Réduction de l'infection

L'auto-nettoyage ou le nettoyage de congénères est utilisé par les abeilles pour éliminer des parasites externes comme les acariens (Boecking et Spivak 1999). Les infections internes, par exemple bactériennes, peuvent aussi être détectées par les congénères car elles induisent une modification du profil d'hydrocarbures cuticulaires, un indicateur du statut social et physiologique (Richard *et al.* 2012). Une simple réponse immunitaire peut aussi altérer ce profil chimique (Richard *et al.* 2008) et ainsi les interactions avec les congénères. Les abeilles malades ou stimulées d'un point de vue immunitaire peuvent alors recevoir plus de comportement de nettoyage que des abeilles saines. Cependant des comportements d'agression envers ces individus peuvent aussi apparaître (Richard *et al.* 2008; Richard *et al.* 2012).

Le comportement hygiénique est aussi une réponse collective mais développée ici par les adultes envers le couvain infecté, notamment par la loque américaine (Spivak et Reuter 2001a) ou le *Varroa* (Boecking et Spivak 1999; Harris 2007; Ibrahim et Spivak 2006). Les capacités à développer ce comportement sont très variables entre les colonies et apparaissent comme un facteur important dans la résistance aux maladies. Ce comportement développé généralement par les ouvrières nourrices âgées consiste à détecter et enlever de la colonie les larves ou pupes infectées afin de limiter la multiplication de l'agent infectieux. Ces dernières vont agir sur les cellules du couvain ouvert et retirer les pupes parasitées ou malades. Les comportements hygiéniques envers le *Varroa* sont très spécifiques et comprennent une suite de comportements qui au final tend à supprimer la reproduction des acariens et a pour conséquence de diminuer la

<sup>39</sup> Fécondation de la reine par plusieurs mâles

durée de leur cycle de reproduction. En effet, les ouvrières vont éliminer les pupes infestées d'acariens hors des cellules fermées.

La « fièvre sociale » consiste en l'augmentation de la température dans les zones de couvain induisant la mort d'agents infectieux (Starks *et al.* 2000).

En cas d'infection de la colonie, « l'automédication » représente une autre forme de défense grâce à une augmentation de la collecte de propolis. Ceci a été observé dans le cas de colonies exposées expérimentalement à des spores d'*Ascosphaera apis*, l'agent de la maladie du couvain plâtré (Simone-Finstrom et Spivak 2012).

Enfin, le développement précoce d'un comportement de butinage apparaît comme une réponse générale des jeunes ouvrières à un parasitisme dû à *Varroa destructor* (Downey *et al.* 2000; Janmaat et Winston 2000a), *Nosema apis* (Wang et Moeller 1970), *Nosema ceranae* (Dussaubat *et al.* 2013; Goblirsch *et al.* 2013) et à un stress immunitaire (Alaux *et al.* 2012). Ces comportements semblent adaptatifs puisqu'ils permettraient de limiter les contacts dans la colonie avec la reine, le couvain et les jeunes ouvrières et ainsi la propagation des parasites dans la colonie (Cremer *et al.* 2007).

#### 4.1.1.2 Le système de détoxification de l'abeille

- Composition-localisation

Les effets d'une substance chimique toxique (xénobiotique) sur un organisme dépendent de plusieurs facteurs dont en premier lieu la résistance et la détoxification. La résistance caractérise trois mécanismes conjoints : (1) l'efficacité avec laquelle une molécule peut atteindre sa cible (exemple du transport d'un neurotoxique vers le système nerveux central), (2) la façon dont les molécules interagissent avec plus ou moins d'efficacité sur leur cible (exemple de la force de liaison entre ligand et récepteur) et (3) la façon dont le toxique peut-être extrait de sa cible pour être ensuite métabolisé.

Que ce soit avant d'atteindre la cible ou après en avoir été extrait, la détoxification est un processus physiologique qui permet, aux abeilles comme aux autres espèces, de diminuer la teneur en molécules toxiques. Elle permet donc souvent de diminuer les effets de ces substances lorsque les métabolites sont moins actifs que la molécule initiale auxquelles les abeilles ont été exposées. Ce n'est pas toujours le cas, comme pour l'exemple du thiamethoxam métabolisé en clothianidine. A ce titre, il est réducteur de penser que le risque engendré par une substance chimique s'arrête lors de la métabolisation du principe actif ou de quelques métabolites principaux, puisque la cascade métabolique est souvent méconnue, que la toxicité de l'ensemble des métabolites est peu étudiée, que les processus de métabolisation chez l'abeille sont peu décrits et que les molécules de référence pour l'analytique sont difficiles (voire impossible) à obtenir sinon à les synthétiser. L'exemple des néonicotinoïdes et du fipronil (Simon-Delso *et al.* (2015), *vide supra*) est un des plus documentés mais ce n'est pas toujours le cas.

Le processus de détoxification fait appel aux mécanismes de métabolisation et fait intervenir des enzymes qui dégradent les xénobiotiques (Claudianos *et al.* 2006; Gilbert et Wilkinson 1974; Gilbert et Wilkinson 1975) et des transporteurs membranaires qui facilitent leur élimination (Hawthorne et Dively 2011). Généralement, on distingue deux types d'enzymes. D'une part, les enzymes de métabolisation sont situées sur les membranes du réticulum endoplasmique. Elles catalysent des réactions d'oxydation, de réduction et d'hydrolyse. Par exemple ce sont les carboxyl/cholinestérases (CE) et les monooxygénases à cytochrome-P450 (CYP450). D'autre part, les enzymes de transfert sont localisées dans le cytosol et catalysent des réactions de conjugaison. Ce sont par exemple les glutathion-S-transférases (GST). L'action de ces enzymes modifie la structure moléculaire des xénobiotiques (par exemple par déchloration) ce qui diminue leur toxicité intrinsèque et/ou favorise leur excrétion en les rendant plus solubles.

Chez les abeilles l'activité du système de détoxification est généralement plus importante dans l'intestin, la tête et le corps gras que dans les autres tissus (Gilbert et Wilkinson 1974). Outre la détoxification, les CE et les CYP interviennent également dans la biosynthèse d'hormones et de phéromones (Claudianos *et al.* 2006).

Les approches classiques d'enzymologie utilisées pour étudier les enzymes de détoxication des insectes se sont rapidement heurtées à l'existence d'un inhibiteur endogène chez l'abeille. Ce composé libéré pendant la préparation des fractions microsomales a une action inhibitrice sur l'activité des CYP's (Gilbert et Wilkinson 1975). Ces auteurs ont toutefois réussi à isoler ce composé à partir d'une préparation d'intestin d'abeille. Il s'agit d'une nucléoprotéine de 19 KD dont l'action inhibitrice peut être atténuée par l'action de ribonucléases. Les difficultés rencontrées pour étudier les CYP à partir de fractions microsomales expliquent pourquoi il existe un nombre limité d'étude faisant appel à des approches biochimiques pour décrire l'activité de ces enzymes chez l'abeille.

L'étude conduite par Claudianos *et al.* (2006), suite au séquençage du génome de l'abeille, a montré que celui-ci contient relativement peu de gènes impliqués dans la détoxication. En effet, alors que le génome de la plupart des insectes comporte environ une centaine de gènes codant des CYP's (Feyereisen 1999), le génome de l'abeille n'en contient environ que la moitié. L'abeille possède plus précisément 46 gènes codant des CYP's alors que les génomes de la drosophile (*D. melanogaster*) et d'un moustique (*An gambiae*) en comptent respectivement 85 et 106. Une différence encore plus importante est observée pour les gènes codant les GST. Ils sont environ 3 à 4 fois moins nombreux chez l'abeille que chez ces deux espèces de mouche et moustique (Claudianos *et al.* 2006). Ainsi, malgré son intense activité de butinage qui l'expose à un grand nombre de xénobiotiques, l'abeille apparaît moins bien armée que les autres insectes pour se protéger du stress chimique. Plus récemment, l'analyse du nombre de gènes codant les CYP, GST et estérases est apparue similaire chez diverses espèces telles que *Bombus huntii*, *B. terrestris*, *B. impatiens*, *Apis mellifera* et chez *Megachile rotundata* (Xu *et al.* 2013).

Le lien direct entre un nombre plus faible de gènes codant les enzymes de détoxication et une sensibilité qui serait plus grande aux xénobiotiques peut cependant être discuté. En effet, un plus petit nombre de ces enzymes ne signifie pas qu'elles soient moins efficaces, surtout si leur spectre d'action est plus large. L'analyse de Hardstone et Scott (2010) va dans ce sens. Les auteurs comparent la toxicité aiguë (DL50) de 62 insecticides chez plusieurs insectes et montrent que l'abeille n'est globalement pas plus sensible à ces substances. Par ailleurs, l'hypothèse d'une immunité individuelle aux xénobiotiques plus faible chez l'abeille, telle qu'elle découle des travaux de Claudianos *et al.* (2006), doit être considérée également dans la perspective d'une immunité sociale dont les effets peuvent être importants et compensateurs pour la colonie. Ces deux types d'immunité sont effectifs dans la réalité de terrain pour protéger la ruche. C'est à ce titre que les effets des xénobiotiques peuvent avoir des conséquences importantes i) par les effets sur les divers individus, selon les diverses castes : larves, ouvrières, reine, ..., et ii) par les effets sur le superorganisme, selon les diverses fonctions essentielles à la colonie : hygiène, fécondité, reconnaissance, communication, etc.

- Métabolisation des pesticides

La grande variété d'enzymes permet au système de détoxication de reconnaître et métaboliser des molécules de natures très différentes et ceci protège, autant que possible, les abeilles contre la grande variété de xénobiotiques auxquels elles sont exposées dans l'environnement. Il existe plus d'une centaine d'enzymes susceptibles de métaboliser les xénobiotiques mais seulement quelques-unes d'entre-elles participent activement à la dégradation d'un xénobiotique en particulier. Le profil métabolique d'un xénobiotique, c'est-à-dire la nature et la quantité des métabolites formés au cours de sa dégradation, est donc conditionné par l'activité d'un nombre restreint d'enzymes. De ce fait, il est probable que lors de co-exposition à un nombre pluriel de xénobiotiques (exemple de plusieurs pesticides), la détoxication de chaque toxique s'en trouvera amoindrie puisque certains mécanismes pourront être sollicités en même temps (ou à peu d'intervalle) vers plusieurs matières actives ou leurs métabolites (compétition de détoxication). Ceci a été illustré dans le cas du coumaphos et du *tau*-fluvalinate (Johnson *et al.* 2009). Une étude plus précise a montré que trois enzymes de type CYP9Q étaient communes pour la détoxication du coumaphos et du *tau*-fluvalinate (Mao *et al.* 2011). C'est une explication des effets additionnels et/ou synergiques d'autres pesticides administrés ensemble. Johnson *et al.* (2013) ont notamment illustré ces effets dans les cas insecticide + insecticide ou insecticide + fongicide (voir **Tableau 12**). Lorsque les molécules sont de la même famille (par exemple lors de co-exposition à deux

néonicotinoïdes), la détoxification en serait encore plus amoindrie. A ce titre, le brevet déposé par Bayer (Andersch et al, US patent 7745375 B2, 29/06/2010)<sup>40</sup> stipule qu'« il a été maintenant trouvé que des mélanges comprenant, dans chaque cas, au moins deux composés de la famille des insecticides chloronicotinyles, agissent synergétiquement ». L'exemple particulier de l'imidaclopride et du nitenpyrame y est mis en avant.

		control 1 µl acetone	tau-fluvalinate	coumaphos	fenpyroximate	amitraz	thymol	mode of action
acaricides	tau-fluvalinate 1 µg	19.8 16.3-22.4	31.2 22.2-49.6	6.65 4.00-12.0	3.66 2.26-5.56	55.1 42.1-70.0		sodium channel modulator [33]
	coumaphos 3 µg	0.78 <sup>a</sup> 0.13-3.05		2.03 <sup>a</sup> 1.31-4.46	2.73 1.82-3.73	20.4 <sup>a</sup> 10.4-38.0		acetylcholinesterase inhibitor [33]
	fenpyroximate 1 µg	2.40 <sup>a</sup> 1.45-3.65	4.12 <sup>a</sup> 3.35-5.06		4.57 2.78-6.48	34.9 23.9-47.9		mitochondrial complex I electron transport inhibitor [33]
	amitraz 1 µg	3.74 <sup>a</sup> 2.14-7.08	9.20 <sup>a</sup> 1.12-25.1	1.80 <sup>a</sup> 1.61-2.04		43.2 25.3-61.0		octopamine receptor agonist [33]
	thymol 10 µg	10.2 <sup>a</sup> 7.85-14.0	23.1 14.7-34.5	3.69 2.83-4.98	3.91 2.98-5.52			modulator of GABA receptor [27]
	oxalic acid 100 µg	7.05 <sup>a</sup> 5.67-8.98	14.7 10.8-22.1	1.50 <sup>a</sup> 0.77-3.06	14.6 <sup>a</sup> 8.66-38.7	30.7 <sup>a</sup> 23.4-39.9		unknown [28]
	pyraclostrobin + boscalid 30 µg	5.95 <sup>ab</sup> 4.48-8.09	25.9 19.9-34.6	3.16 2.62-3.92	4.04 2.25-10.4	31.9 16.9-44.7		mitochondrial complex III ubiquinol oxidase inhibitor [32]
pyraclostrobin 10 µg	4.43 <sup>a</sup> 0.67-61.4	-	2.09 <sup>a</sup> 0.48-4.24	1.64 0.899-2.51	28.2 4.96-57.9		mitochondrial complex II succinate dehydrogenase inhibitor [32]	
boscalid 20 µg	11.6 7.43-19.9	22.6 15.3-32.4	5.64 2.89-17.2	4.82 2.83-6.74	47.1 35.4-62.1		multi-site contact activity [32]	
chlorothalonil 10 µg	7.24 <sup>a</sup> 3.96-12.9	16.6 6.77-85.6	6.41 5.62-7.36	3.34 1.48-8.89	29.8 <sup>a</sup> 21.1-39.9		sterol biosynthesis (P450) inhibitor [32]	
prochloraz 10 µg	0.01 <sup>a</sup> 0.006-0.017	0.44 <sup>a</sup> 0.38-0.50	0.25 <sup>a</sup> 0.17-0.34	2.48 1.45-3.74	39.0 <sup>b</sup> 33.2-45.1			
DEM 100 µg	8.26 <sup>†</sup> 7.57-9.03	19.9 <sup>‡</sup> 10.5-53.5	4.38 1.90-8.80	2.30 0.306-4.24	64.0 42.6-91.6		glutathione-S-transferase inhibitor [29]	
DEF 10 µg	1.96 <sup>†</sup> 0.83-4.17	7.29 <sup>†</sup> 4.88-9.22	1.26 <sup>a</sup> 0.10-15.2	2.17 1.63-2.87	35.1 21.9-52.0		carboxylesterase inhibitor [29]	
PBO 10 µg	0.01 <sup>†</sup> 0.006-0.015	5.04 <sup>†</sup> 3.34-7.01	0.27 <sup>a</sup> 0.12-0.75	2.41 0.917-6.35	32.4 19.8-49.6		cytochrome P450 inhibitor [29]	
LD <sub>50</sub> fold-change relative to control		<1	1	2	5	20	50	100

Tableau 12 : « Dose létale médiane (DL50) d'acaricides (listés horizontalement) pour les abeilles en 2009, suivant un prétraitement sublétal avec des acaricides, fongicides ou des inhibiteurs d'enzymes (listés verticalement). Les intervalles de confiance à 95% sont indiqués sous les valeurs de DL50. Les différences significatives comparées au traitement contrôle sont indiquées avec une lettre en exposant : a = effet de prétraitement significatif, b = effet dose de prétraitement acaricide significatif (voir table S1 dans Johnson et al., 2013). Les valeurs de DL50 sont issues d'études antérieures : † = Johnson et al. (2006) ; ‡ = Johnson et al. (2009). Un tiret traduit un DL50 non calculée du fait de données insuffisantes. » Johnson et al. (2013)

On notera que plus la case est de couleur rouge prononcée, plus l'interaction diminue la DL50 (voir cartouche). Par exemple le prétraitement avec 10 µg de prochloraz diminue la DL50 du tau-fluvalinate par un facteur 19,8/0,01=1980, soit l'équivalent de l'effet du PBO (10 µg) qui est un inhibiteur des CYP450.

Plusieurs voies de détoxification ont été identifiées grâce à l'utilisation d'inhibiteurs de l'activité enzymatique (inhibiteurs métaboliques spécifiques). Des travaux conduits avec le piperonyl

<sup>40</sup> <http://patentimages.storage.googleapis.com/pdfs/US7745375.pdf>

butoxide (PBO, inhibiteur des CYP), le S,S,S-tributylphosphorotrithioate (DEF, inhibiteur des CE) et le diméthyl maléate ou diéthyl maléate (DMM ou DEM, inhibiteurs des GST) ont montré que l'ajout de ces inhibiteurs peut augmenter la sensibilité des abeilles à certains xénobiotiques. L'expérience montre alors que l'enzyme correspondante (à l'inhibiteur ayant un effet) est impliquée lors de la détoxification. L'utilisation de ces inhibiteurs par Johnson *et al.* (2006) a permis de montrer que la première phase de détoxification de trois pyréthrinoïdes (cyfluthrine, lambda-cyhalothrine et *tau*-fluvalinate) est principalement liée à l'action des CYP. En comparant la toxicité aiguë (DL50) de ces 3 composés, ces auteurs montrent que ces pyréthrinoïdes sont, respectivement, 30, 80 et 980 fois plus toxiques pour les abeilles en présence de PBO. L'inhibition des CE par le DEF augmente également la toxicité de la cyfluthrine, lambda-cyhalothrine et du *tau*-fluvalinate, mais dans de moindres proportions qu'avec l'inhibiteur PBO. En revanche l'inhibition des GST par le DMM n'a aucune influence sur la toxicité des 3 pyréthrinoïdes étudiés et telle que cette toxicité a été évaluée (Johnson *et al.* 2006). Ces résultats indiquent que les CYP sont les principales enzymes qui métabolisent les pyréthrinoïdes (notamment le *tau*-fluvalinate) et ils expliquent pourquoi les abeilles sont plus ou moins sensibles à certains d'entre eux. Plus récemment, ces auteurs ont testé l'effet des mêmes inhibiteurs sur la toxicité aiguë (DL50) de divers acaricides (Johnson *et al.* 2013). Cette fois, l'inhibition des CYP et des CE augmente très significativement la toxicité du *tau*-fluvalinate, du coumaphos et du fenpyroximate, mais elle n'a que très peu d'influence sur la toxicité de l'amitrazé et du thymol. Enfin, l'inhibition des GST n'a aucune influence sur la toxicité de ces acaricides, telle qu'elle a été évaluée (DL50).

Les travaux d'Iwasa *et al.* (2004) ont considéré l'effet des inhibiteurs métaboliques sur la toxicité aiguë (DL50) d'insecticides néonicotinoïdes : acétamipride, thiaclopride et imidaclopride. Les auteurs ont montré que l'acétamipride, l'imidaclopride et le thiaclopride étaient respectivement 6, 1,7 et 154 fois plus toxiques chez des abeilles préalablement exposées à 10 µg de PBO. Ces résultats suggèrent fortement que les CYPs participent bien plus activement à la détoxification du thiaclopride qu'à celle de l'acétamipride ou de l'imidaclopride.

L'utilisation de PBO a également permis à Niu *et al.* (2011) d'étudier la détoxification de deux mycotoxines (l'aflatoxine B1 et l'ochratoxine A) produites par des champignons (ex : *Aspergillus spp*) fréquemment retrouvés dans les colonies d'abeilles. En comparant la longévité d'abeilles placées en contention, les auteurs montrent que l'inhibition des CYP augmente la toxicité de l'aflatoxine B1, mais n'influence pas celle de l'ochratoxine A.

A l'inverse des études cherchant à inhiber la détoxification, les chercheurs ont essayé de la promouvoir. Par exemple, l'ajout de quercétine induirait une production accrue de CYP, ce qui expliquerait une augmentation de la résistance des abeilles au *tau*-fluvalinate (Johnson *et al.* 2012). Un autre exemple est illustré avec l'ajout du coenzyme Q10 (CoQ10, 2,3-diméthoxy, 5-méthyl, 6-décaprenyl benzoquinone) qui augmente la production d'enzymes antioxydants dont les GST (Strachecka *et al.* 2014).

- Biologie moléculaire et biochimie

L'utilisation des inhibiteurs métaboliques à large spectre ne permet pas de déterminer avec précision quelles enzymes sont impliquées dans les voies de métabolisation des xénobiotiques. Pour y parvenir, il est possible de faire appel à des techniques de biologie moléculaire et de biochimie qui permettent d'étudier *in vitro* la dégradation des xénobiotiques par des enzymes recombinantes.

Les premiers travaux faisant appel à ces techniques sont ceux de Mao *et al.* (2011) dans lesquels ils ont étudié la métabolisation de flavonoïdes (quercétine, kaempferole, eriodictyole et taxifoline), des composés que l'on retrouve fréquemment dans le pollen et la propolis. A l'aide CYP recombinants, ils montrent que le CYP6AS1, CYP6AS3, CYP6AS4 and CYP6AS10 sont capables de dégrader la quercétine mais pas les trois autres flavonoïdes. Ils confirment également grâce à une approche de docking couplée à de la modélisation moléculaire que les sites actifs des CYP6AS sont bien capables de fixer la quercétine. Mao *et al.* ont également étudié, à l'aide de protéines recombinantes (CYP6AS3, CYP6AS10, CYP6AQ1, CYP6BD1, CYP338A1, et les CYP9), la métabolisation du *tau*-fluvalinate et du coumaphos. Ils montrent que seuls les CYP9Q1,

CYP9Q2 et CYP9Q3 sont capables de dégrader ces deux acaricides. Mao *et al.* prédisent également, par une approche *in silico*, la fixation du *tau*-fluvalinate et du coumaphos au niveau du site actif de ces trois enzymes. Ils suggèrent que l'inhibition compétitive qui en résulte conduit à un ralentissement de leur métabolisation et expliquerait les effets synergiques observés entre ces deux acaricides au cours d'études précédentes (Johnson *et al.* 2009; Johnson *et al.* 2006).

- Radio-marquage

D'autres études témoignent de l'efficacité du système de détoxification de l'abeille à dégrader les pesticides. Ces études se sont principalement focalisées sur la cinétique de dégradation des pesticides et sur leur profil métabolique à l'aide de molécules radiomarquées.

Pilling *et al.* (1995) ont étudié le métabolisme de la lambda-cyhalothrine chez des abeilles exposées par voie topique. Ils observent 16 heures après l'exposition que trois métabolites majoritaires sont apparus. Il s'agit du 4'hydroxy 3-phénoxybenzyl alcool, de l'acide 4'hydroxy 3-phénoxybenzoïque et du 2'-hydroxy 3-phénoxybenzyl alcool. Ils constatent également que si les abeilles sont exposées simultanément à du prochloraze (fongicide), la métabolisation de la lambda-cyhalothrine est inhibée durant les 16 premières heures. La confirmation de cette inhibition est apportée par l'étude *in vitro* qu'ils ont conduite en parallèle sur des intestins d'abeille et qui témoigne d'une modification du profil métabolique de la lambda-cyhalothrine en présence de prochloraze. Pilling et Jepson (1993) suggèrent que l'inhibition de la métabolisation de la lambda cyhalothrine par le prochloraze explique la synergie observée entre ces deux substances dans une étude antérieure. Toutefois l'hypothèse métabolique avancée par Pilling et Jepson expliquant la synergie entre les pyréthriinoïdes et le prochloraze a été contestée quelques années plus tard par Chalvet-Monfray *et al.* (1996). Après avoir modélisé la cinétique de dégradation de la deltaméthrine en présence de prochloraze, Chalvet-Monfray *et al.* soutiennent que l'inhibition des CYP ne peut pas à elle seule expliquer la synergie observée sur la mortalité des abeilles. Ils formulent de nouvelles hypothèses selon lesquelles la synergie pourrait être due à une augmentation de la perméabilité cuticulaire des pyréthriinoïdes en présence de prochloraze ou à l'action de ces pesticides sur des cibles secondaires comme les  $Ca^{2+}$ -ATPases exprimées à la surface des membranes cellulaires (Chalvet-Monfray *et al.* 1996).

Les travaux de Suchail *et al.* (2004a) se sont intéressés aux paramètres toxicocinétiques de l'imidaclopride chez des abeilles exposées oralement à une dose de 100 µg/kg d'abeille (proche de la DL50 de l'imidaclopride). Ils observent que la demi-vie de l'imidaclopride dans l'abeille est de 4 heures et qu'il est dégradé principalement en cinq métabolites. Il s'agit du 4,5-dihydroxy-imidaclopride, du 4/5-hydroxy-imidaclopride, et de l'oléfine qui se distribuent préférentiellement dans la tête, le thorax et l'abdomen de l'abeille, et du dérivé urée et l'acide 6-chloronicotinique retrouvés dans l'intestin moyen et l'ampoule rectale. La nature de ces métabolites suggère qu'ils sont principalement produits par des CYP et que les enzymes de transfert (ex : glutathion-S-transférase) ne participent pas à la métabolisation de l'imidaclopride car aucun métabolite conjugué n'a été détecté. Dans une autre étude, Suchail *et al.* (2004b) suggèrent que la formation, bien que minoritaire, de l'oléfine et du 5-hydroxyimidaclopride 4 heures après ingestion d'imidaclopride explique le pic de mortalité observé chez les abeilles exposées à l'imidaclopride.

Des travaux similaires conduits par Brunet *et al.* (2005) ont exploré les paramètres toxicocinétiques de l'acétamipride chez des abeilles exposées oralement à une dose de 100 µg/kg d'abeille (dose 1 500 fois inférieure à la DL50 de l'acétamipride). Après absorption, l'acétamipride est préférentiellement retrouvé dans la tête, l'abdomen et le thorax des abeilles mais il est rapidement métabolisé puisque 30 min après ingestion, il reste dans le corps des abeilles moins de 50 % de la dose ingérée. Il est métabolisé en sept métabolites dont les deux majoritaires sont l'acide 6-chloronicotinique et un métabolite non identifié (U1).

- Modulation du système de détoxification

Le système de détoxification des insectes fonctionne en continu mais son activité peut être régulée par voie transcriptionnelle. Généralement l'expression des enzymes de détoxification est induite par les substances qu'elles métabolisent, ce qui permet aux insectes de répondre au stress chimique de façon adaptée (Li *et al.* 2007). Toutefois, les travaux de Johnson *et al.* (2012) suggèrent que la

régulation du système de détoxification de l'abeille diffère de celle des autres insectes. Ils constatent en effet que le phénobarbital, un composé connu pour induire l'expression des CYP chez un grand nombre d'organismes, n'affecte pas l'expression des gènes chez l'abeille. Contrairement à leurs attentes, ils observent également que l'exposition des abeilles au phénobarbital augmente la sensibilité des abeilles au *tau*-fluvalinate, à la lambda-cyhalothrine et à l'aldrine. L'inefficacité du phénobarbital à induire l'expression des CYP ne veut pas dire pour autant que le système de détoxification de l'abeille n'est pas inductible. Les études précédemment citées dans ce chapitre ont démontré que des xénobiotiques sont en effet susceptibles de moduler l'expression de gènes de détoxification chez l'abeille.

#### 4.1.2 Interactions entre facteurs de stress recensés dans la bibliographie

L'activité de butinage des abeilles les expose simultanément à de nombreux facteurs de stress d'origine abiotique (contaminants chimiques...) ou biotique (agents infectieux...) pouvant entraîner des effets néfastes sur leur santé, leur durée de vie et la bonne organisation de la colonie. Des cas de mortalité d'abeilles sont parfois la conséquence de l'action d'un seul de ces facteurs. Cependant, à ce jour, aucun de ces facteurs ne peut expliquer à lui seul l'ensemble des pertes de colonies qui sont rapportées en France et au niveau mondial. Il semblerait donc que les causes de ces déclin puissent aussi être le résultat d'interactions entre plusieurs facteurs de stress (Nazzi et Pennacchio 2014; Neumann et Carreck 2010; Potts *et al.* 2010; vanEngelsdorp *et al.* 2009; vanEngelsdorp *et al.* 2010). En effet, les facteurs de stress peuvent être interdépendants et avoir des conséquences plus néfastes lorsqu'ils agissent ensemble (Johnson *et al.* 2009; Locke *et al.* 2012) en entraînant parfois une mortalité significativement plus élevée (Alaux *et al.* 2010a; Colin et Belzunces 1992; Doublet *et al.* 2014; Nazzi *et al.* 2012; Vidau *et al.* 2011). Parmi les facteurs de stress touchant l'abeille, un fort accent est mis sur les parasites et les pesticides (Neumann et Carreck 2010; Oldroyd 2007; Potts *et al.* 2010; Simon-Delso *et al.* 2015; vanEngelsdorp et Meixner 2010; vanEngelsdorp *et al.* 2010). Plusieurs études ont en effet mis en évidence la multiplicité et la prévalence importante des agents infectieux (Cox-Foster *et al.* 2007; Dainat *et al.* 2012b; Hedtke *et al.* 2011) et des pesticides (Bonmatin *et al.* 2015; Chauzat *et al.* 2009; Lambert *et al.* 2013; Mullin *et al.* 2010; Paradis *et al.* 2013; Pisa *et al.* 2015) retrouvés au sein des colonies, suggérant que des interactions pourraient avoir lieu entre ces facteurs. Or, la multitude de combinaisons possibles complique l'évaluation de l'impact de ces interactions pour les scientifiques, les apiculteurs et les autorités de régulation. Il existe également des mélanges associant un pesticide avec un agent biologique (exemple du brevet Bayer EP0627165 A1, 1994, qui associe insecticides, dont les pyréthrinoides, néonicotinoïdes, phénylpyrazoles, *etc.*, avec des microchampignons entomopathogènes). Ensuite, des études, de plus en plus nombreuses, indiquent que les interactions non volontaires entre pesticides ou entre agents infectieux peuvent avoir soit des effets additifs, soit un effet synergique sur la mortalité des abeilles et donc potentiellement affecter la santé des colonies d'abeilles. La synergie est définie lorsque l'effet de deux facteurs est supérieur à la somme des effets de ces mêmes facteurs pris individuellement (Holmstrup *et al.* 2010). Ainsi, les associations entre certains pesticides comme l'insecticide deltaméthrine et le fongicide prochloraze (Colin et Belzunces 1992), le fongicide chlorothalonil et l'acaricide *tau*-fluvalinate (Zhu *et al.* 2014) ou les acaricides coumaphos et *tau*-fluvalinate (Johnson *et al.* 2009) entraînent un effet synergique sur la mortalité des abeilles. Une synergie peut également avoir lieu lorsque l'abeille est exposée à deux agents biologiques, tels que l'acarien parasite *Varroa destructor* et le virus des ailes déformées DWV (Dainat *et al.* 2012a; Nazzi *et al.* 2012); une synergie pourrait résulter d'une exposition à *Nosema ceranae* et au CBPV (Toplak *et al.* 2013). Enfin, les interactions entre agents pathogènes et insecticides peuvent également avoir des effets néfastes sur la santé de certains pollinisateurs (González-Varo *et al.* 2013) et plusieurs études évaluant leur impact chez *A. mellifera* ont été récemment publiées (Alaux *et al.* 2010a; Aufauvre *et al.* 2012; Aufauvre *et al.* 2014; Di Prisco *et al.* 2013; Doublet *et al.* 2014; Pettis *et al.* 2013; Pettis *et al.* 2012; Retschnig *et al.* 2014a; Vidau *et al.* 2011; Wu *et al.* 2012). Un grand nombre de ces études concernent l'association entre le parasite intestinal *Nosema ceranae* et différents insecticides neurotoxiques, dont les néonicotinoïdes. Ce sont des facteurs de stress auxquels l'abeille mellifère est fréquemment exposée. Des études ont également révélé des

interactions virus-insecticides/acaricides (Boncristiani *et al.* 2012; Locke *et al.* 2012) mais aussi *Varroa*-pesticides (Gregorc *et al.* 2012).

#### 4.1.2.1 Entre agents biologiques

##### 4.1.2.1.1 Associations *Varroa* – virus

L'acarien parasite *Varroa destructor* est connu pour agir en synergie avec plusieurs virus qu'il est capable de transmettre aux abeilles (Ball 1983; Gisder *et al.* 2009; Nordström *et al.* 1999; Shen *et al.* 2005a; Shen *et al.* 2005b; Yue et Genersch 2005). De plus, cet acarien peut entraîner un affaiblissement du système immunitaire des abeilles, favorisant ainsi la prolifération des virus et rendant les abeilles plus vulnérables à des infections par d'autres agents infectieux (Amdam *et al.* 2004a; Bailey *et al.* 1983; Gregory *et al.* 2005; Yang et Cox-Foster 2007; Yang et Cox-Foster 2005). Yang et Cox-Foster (2005) ont montré que *Varroa* entraînait une baisse significative du taux d'expression de trois peptides antimicrobiens (abaécine, défensine et hyménoptécine) et de quatre enzymes liées à l'immunité (phénoloxydase, glucose déhydrogénase, glucose oxydase, et lysozyme), rendant ainsi les abeilles plus sensibles à l'infection par le virus des ailes déformées (DWV). Ces travaux montrent en effet que les abeilles infectées par *Varroa* et présentant un phénotype d'ailes déformées ont des charges virales  $10^6$  fois plus élevées que les abeilles ayant des ailes normales.

Une étude menée dans le sud-ouest de l'Angleterre (Highfield *et al.* 2009) a permis de montrer que la combinaison *Varroa*-DWV réduisait la durée de vie des abeilles d'hiver et que le virus DWV jouerait un rôle majeur dans les mortalités hivernales. Des études plus récentes confirment ces associations *Varroa*-DWV (Dainat *et al.* 2012a; Francis *et al.* 2013b; Hedtke *et al.* 2011; Martin *et al.* 2012; Nazzi *et al.* 2012; Ryabov *et al.* 2014). Hedtke *et al.* (2011) ont réalisé un suivi pendant une période de six ans (automne 2004 - printemps 2010) de 220 colonies provenant de 22 ruchers localisés dans le nord-est de l'Allemagne (sélection aléatoire de 10 colonies dans chaque rucher). Durant cette période, les pertes hivernales ont varié de 22,4 % (hiver 2005-2006) à 4,8 % (hiver 2008-2009), chaque colonie morte étant remplacée par une colonie du même rucher. Les différents paramètres mesurés étaient : le taux d'infestation par *Varroa* (deux mesures par an, juillet et octobre), la charge virale en octobre (virus KBV, ABPV, SBV, DWV et IAPV), la présence des bactéries responsables des loques (*P. larvae* et *M. plutonius*) en octobre, l'infection par *Nosema apis* et *Nosema ceranae* (octobre et mars) et les cas cliniques d'ascosphérose due au champignon *Ascospaera apis* (suivi de mai à septembre). Cette étude a permis de fournir des données sur la prévalence de chacun de ces agents biologiques sur les six années montrant notamment que : (1) la prévalence des *Nosema* est plus importante au printemps (*N. apis* étant plus fréquente que *N. ceranae*), (2) DWV est le virus avec la plus forte prévalence (> 26 %), (3) plus de 50 % des colonies présentent des *Varroa* malgré les traitements acaricides régulièrement réalisés, (4) les agents des loques européenne et américaine n'ont jamais été détectés. Ce travail a également permis d'analyser les interactions entre les différents agents biologiques recherchés. Les principales conclusions de l'étude sont :

- (i) l'existence d'une forte corrélation entre la présence de *Varroa* en été et du virus DWV en automne ;
- (ii) une infestation par *Varroa* en automne est suivie par une infection par *Nosema apis* au printemps de l'année suivante, ce qui n'est pas le cas avec *N. ceranae* ;
- (iii) des cas d'ascosphérose sont observés en été dans des colonies infestées par *Varroa* et qui étaient infectées par *N. ceranae* au printemps ;
- (iv) des cooccurrences très significatives sont observées entre certains virus DWV-ABPV et DWV-SBV en automne. Une corrélation plus faible est aussi trouvée entre le virus DWV et *Nosema apis* en automne.

Cette étude illustre bien la diversité et la complexité des interactions pouvant exister en conditions naturelles entre différents agents biologiques. La plupart des corrélations observées sont positives c'est-à-dire que les abeilles infectées par un parasite/agent infectieux deviennent plus sensibles à l'infection par un autre agent biologique, les effets pouvant être additifs ou synergiques.



Dainat *et al.* (2012a) ont mené une étude en Suisse sur 29 colonies qu'ils ont suivies pendant plusieurs mois (août 2007- avril 2008). Ces colonies ont été séparées en 2 groupes, un groupe comprenant 18 colonies qui ont reçu un traitement à base d'acides organiques contre *Varroa* et le 2<sup>ème</sup> groupe constitué de 11 colonies qui n'ont reçu aucun traitement anti-*Varroa*. Toutes les colonies avaient des populations similaires au début de l'expérimentation (environ 14 000 ouvrières en août 2007). Ces colonies ont été suivies durant l'hiver, des abeilles mortes ont été prélevées chaque jour et les charges en virus DWV et ABPV et en *Nosema ceranae* ont été évaluées. Les niveaux d'expression du gène de la vitellogénine ont été mesurés comme marqueur de longévité des abeilles. En avril 2008, les 11 colonies non traitées contre *Varroa* et deux colonies traitées étaient mortes. L'étude montre que les ouvrières provenant des colonies qui n'ont pas survécu pendant l'hiver avaient une durée de vie plus courte. Ces colonies présentaient des charges en *Varroa* et en virus DWV plus élevées que celles traitées contre *Varroa* qui avaient survécu. Cette étude démontre donc que l'association DWV-*Varroa* réduit la durée de vie des abeilles d'hiver, entraînant le dépérissement des colonies, ce qui pourrait contribuer au phénomène de déclin des abeilles dans le cas où les colonies n'ont pas eu de traitements acaricides. Cette étude ne montre par contre aucune corrélation entre *Varroa* et *N. ceranae*, ni entre *Varroa* et le virus ABPV.

Nazzi *et al.* (2012) ont étudié les relations entre l'infestation par *Varroa*, les défenses de l'hôte et le virus DWV au travers d'une étude métagénomique sur des colonies faiblement infestées (traitées par un acaricide) ou fortement infestées (non traitées) par *Varroa*. L'étude a porté sur 2 ruchers de 6 colonies chacun, l'un subissant un traitement à base de thymol contre *Varroa*, l'autre ne subissant aucun traitement acaricide. Un suivi de la dynamique de population a montré une forte diminution du nombre d'abeilles dans les colonies non traitées et qui étaient fortement infestées par *Varroa*. L'ensemble de ces colonies sont mortes à la fin de la saison ou au début du printemps suivant. Une recherche de différents agents infectieux (*Nosema ceranae*, BQCV, DWV, SBV) a révélé des charges plus importantes en DWV dans ces colonies par rapport à celles ayant reçu le traitement anti-*Varroa*. Cette augmentation de la charge en DWV liée à une forte infestation par *Varroa* et associée à une forte mortalité des abeilles a été confirmée par des expériences de laboratoire à partir de larves expérimentalement infestées par *Varroa*. Cette étude montre une interaction synergique lorsque l'abeille est exposée à ces 2 agents infectieux, *Varroa* activant la réplication du virus DWV qui devient ainsi plus virulent. Cette association est liée à un syndrome d'immunodépression dans les colonies fortement infestées par *Varroa*. Les auteurs démontrent en effet une dérégulation de 19 gènes impliqués dans l'immunité et en particulier d'un gène de la famille NF- $\kappa$ B qui joue un rôle central dans l'immunité des insectes mais aussi dans la réponse aux stress. Le virus DWV se comporterait ainsi comme un agent opportuniste profitant de l'affaiblissement des colonies fortement infestées par *Varroa*.

L'étude de Martin *et al.* (2012) a porté sur 293 colonies d'abeilles provenant de 35 ruchers localisés sur quatre îles principales d'Hawaii. Elle révèle que l'exposition récente des colonies d'abeilles à *Varroa* est corrélée à une très forte augmentation de la prévalence (de 10 à 100 %) et de la charge virale ( $10^6$  fois plus élevée) du virus DWV et à une diminution de la diversité des souches de ce virus, ce qui n'est pas le cas pour d'autres virus tels que IAPV, ABPV ou KBV. La propagation de *Varroa* à Hawaii a ainsi abouti à l'émergence du virus DWV, et notamment à la sélection d'un variant majoritaire, dont la prévalence était auparavant très faible.

Dans l'étude de Francis *et al.* (2013b), un suivi de la charge en *Varroa* et en virus (complexe AKI [ABPV, KBV et IAPV] et DWV) a été mené sur une année au Danemark à partir de 23 colonies (provenant de 15 ruchers) traitées ou non contre *Varroa* (11 colonies traitées avec des acides organiques, 9 colonies traitées à la fluméthrine et 3 colonies non traitées). Cette étude, menée d'avril 2011 à avril 2012, montre que les charges en virus augmentent de manière très importante dans les colonies non traitées pour le *Varroa*. Le nombre de copies virales est corrélé à la présence et au nombre de *Varroa* (de  $10^4$  copies dans les colonies sans *Varroa* à  $10^{10}$  copies dans les colonies les plus infestées). La plupart des colonies qui n'ont pas survécu lors de l'hiver présentaient des charges virales (AKI et DWV) significativement plus élevées que les colonies survivantes. Au total 7 colonies sont mortes au cours de l'hiver, incluant 4 traitées et les 3 non traitées.

Il est aussi important de signaler que dans les différentes études citées ci-dessus, aucun dosage de résidus de pesticides n'a été réalisé. De ce fait, les corrélations *Varroa*-virus ne peuvent pas être abordées sous l'angle de la présence ou de l'absence de résidus de xénobiotiques.

#### 4.1.2.1.2 Association *Nosema* – virus

Plusieurs études ont également mis en évidence des associations entre certains virus et les microsporidies *Nosema* spp, des microchampignons parasites de l'intestin des abeilles adultes (Bailey *et al.* 1983; Bromenshenk *et al.* 2010; Doublet *et al.* 2014; Toplak *et al.* 2013). Historiquement, le virus BQCV a été associé à l'espèce *Nosema apis* (Bailey *et al.* 1983). Ces deux agents pathogènes étaient en effet retrouvés dans des colonies qui s'effondraient durant l'hiver. De plus, il était observé une augmentation de la charge en BQCV en présence de *N. apis*, suggérant que ce champignon intracellulaire facilitait la réplication du virus chez l'abeille (Bailey *et al.* 1983).

Les travaux de Bromenshenk *et al.* (2010) suggèrent qu'un iridovirus (IIV) pourrait être associé au syndrome d'effondrement des colonies (CCD), la prévalence de ce virus ainsi que celle de *Nosema ceranae* étant plus importantes dans les colonies affectées par ce syndrome. De plus, des expériences de co-infections avec ces 2 agents pathogènes, en conditions de laboratoire, entraîneraient des taux de mortalité plus élevés.

Cette synergie *Nosema*-virus a été décrite plus récemment, en condition de laboratoire, au travers de co-infections expérimentales d'abeilles d'hiver par le virus de la paralysie chronique (CBPV) et *N. ceranae* (Toplak *et al.* 2013). En effet, un suivi par PCR quantitative de la charge virale indique une augmentation synergique de la réplication du CBPV chez des abeilles co-infectées par ce virus et par *N. ceranae*. De plus, ces abeilles co-infectées présentent des taux de mortalité très élevés.

En laboratoire, Doublet *et al.* (2014) ont récemment évalué les interactions entre *N. ceranae* et le virus BQCV ainsi qu'entre *N. ceranae* et l'insecticide thiaclopride. Dans les deux types d'association, un effet synergique sur la mortalité des abeilles adultes est observé. En effet, 11 jours après l'infection expérimentale, les auteurs observent un taux de mortalité de 50 % chez les abeilles co-infectées alors que les taux de mortalité ne sont que de 20 % pour les abeilles uniquement infectées par *N. ceranae* et de moins de 5% pour les abeilles uniquement infectées par le BQCV. De plus, cet effet synergique est plus important pour les abeilles co-infectées par les deux agents pathogènes que celles exposées à *N. ceranae* et au thiaclopride.

Si des effets additifs ou synergiques sont observés entre *Nosema* spp et certains virus, des études indiquent que ce n'est pas le cas pour tous les virus. L'étude de Cox-Foster *et al.* (2007) indique notamment qu'il n'existerait pas d'association entre *Nosema ceranae* et le virus IAPV. De la même manière, Martin *et al.* (2013) n'observent pas d'interactions positives entre *N. ceranae* et le virus DWV. Cette dernière étude, portant sur 322 colonies à Hawaii, démontre en effet qu'il n'existe aucun lien entre la charge en DWV et le nombre de spores de *N. ceranae*. Des interactions antagonistes ont même été observées entre *N. ceranae* et DWV (Costa *et al.* 2011; Doublet *et al.* 2015). Ainsi, les lésions provoquées par *N. ceranae* dans l'intestin réduiraient la capacité de réplication du virus DWV.

Il est à noter que des interactions antagonistes virus-microsporidies ont également été observées chez d'autres insectes (Bauer *et al.* 1998).

#### 4.1.2.1.3 Autres associations entre agents biologiques

- *Varroa destructor* - *Acarapis woodi*

Downey et Winston (2001) ont étudié l'impact de co-infestation des abeilles par les acariens parasites *Varroa destructor* et *Acarapis woodi*. Ils ont ainsi évalué l'impact de chaque acarien seul ou en association en suivant différents paramètres sur une période de 16 mois : mortalité des colonies, nombre d'abeilles et d'acariens, réserves disponibles. Si l'acarien des trachées ne semble pas avoir d'effet à lui seul, une interaction synergique est observée lorsqu'il est associé à *V. destructor*, 5 des 6 colonies co-infestées étant mortes après l'hiver (10 mois après le début de l'étude).

- Varroa – Ascospaera apis

Hedtke *et al.* (2011) montrent que la présence de *Varroa* dans les colonies d'abeilles en été favorise l'apparition de cas d'ascosphérose. Cette étude suggère aussi un rôle de *Nosema ceranae* dans la susceptibilité des colonies à *Ascospaera apis*.

- Crithidia mellificae - Nosema ceranae

Schwarz et Evans (2013) ont étudié, en condition de laboratoire, les réponses immunitaires de l'abeille dans le cas d'une infection avec le trypanosome *Crithidia mellificae*, la microsporidie *Nosema ceranae* et lorsque les deux agents sont inoculés simultanément. Ils ont suivi, par PCR quantitative, l'expression de gènes impliqués dans l'immunité à différents temps après les infections expérimentales. Leurs travaux montrent que l'infection concomitante par les deux agents infectieux altère significativement la transcription de gènes de l'immunité.

L'étude de Ravoet *et al.* (2013) montre aussi le rôle important que pourrait jouer *C. mellificae*. Dans cette étude menée en Belgique, ils ont recherché la présence de 18 agents biologiques dans 363 colonies en été afin d'évaluer leur lien potentiel avec les mortalités hivernales. Cette étude indique notamment que *N. ceranae* et *C. mellificae* sont des marqueurs prédictifs de mortalité hivernale. Un effet synergique sur le taux de mortalité hivernale est ainsi observé lorsque les deux agents sont présents au sein d'une même colonie.

- Nosema apis-Nosema ceranae

Des infections expérimentales en conditions de laboratoire ont été menées avec les espèces *N. apis* et/ou *N. ceranae* (Milbrath *et al.* 2015). Cette étude montre qu'une infection mixte entraîne une mortalité plus rapide des abeilles et un taux de mortalité plus élevé que lorsque les infections sont réalisées avec chaque espèce séparément. Le nombre de spores produites est également plus important lors d'infections mixtes. Par contre le nombre de spores de *N. apis* est supérieur ou équivalent à celui de *N. ceranae*, remettant en cause l'hypothèse que *N. ceranae*, qui est désormais l'espèce prédominante, aurait remplacé *N. apis* par compétition. Une autre étude très récente indique au contraire que l'ordre d'infection joue un rôle important dans la compétition entre agents infectieux. Ainsi une infection par *N. ceranae* suivie d'une infection par *N. apis* montre que la première espèce inhibe fortement le développement de la seconde (Natsopoulou *et al.* 2015).

- Varroa destructor - Nosema ceranae

Suite aux pertes importantes de colonies d'abeilles observées dans différentes régions de l'Espagne, des recherches ont été menées pour identifier les facteurs qui pourraient être impliqués. Bernal *et al.* (2011) montrent une prévalence très élevée de *Varroa destructor* et de *N. ceranae* et suggèrent que la combinaison de ces deux parasites augmenterait le risque de mortalité des colonies.

- Associations entre virus

Plusieurs études indiquent un portage important, souvent asymptomatique, d'agents infectieux et notamment des virus (*cf.* partie sur les agents biologiques). Hedtke *et al.* (2011) ont ainsi démontré des cooccurrences DWV-ABPV et DWV-SBV. Dans l'étude de Ravoet *et al.* (2013), une association entre les virus LSV (Lake Sinai Virus) et BQCV est également observée (suivi de 363 colonies en Belgique et recherche de 18 agents biologiques). Cette étude montre aussi l'existence d'une corrélation entre le nombre d'agents infectieux détectés et les mortalités hivernales. Plus le nombre d'agents infectieux est important, plus le taux de mortalités hivernales est important.

**En conclusion**, il convient de souligner :

- ✓ l'importance de *Varroa destructor* comme vecteur d'agents infectieux, notamment le DWV, et pour son rôle sur l'affaiblissement de l'immunité des abeilles ;
- ✓ la multiplicité des agents biologiques dans les colonies et, par conséquent, les multiples interactions à considérer ;

- ✓ l'utilisation de certaines cooccurrences comme facteurs de risque de mortalité hivernale ;
- ✓ le manque de données sur les mécanismes impliqués dans les interactions additives, synergiques et antagonistes entre les différents facteurs de stress, d'où une recommandation du groupe de travail pour que des projets de recherche soient orientés vers cette thématique.

#### 4.1.2.2 Entre facteurs chimiques

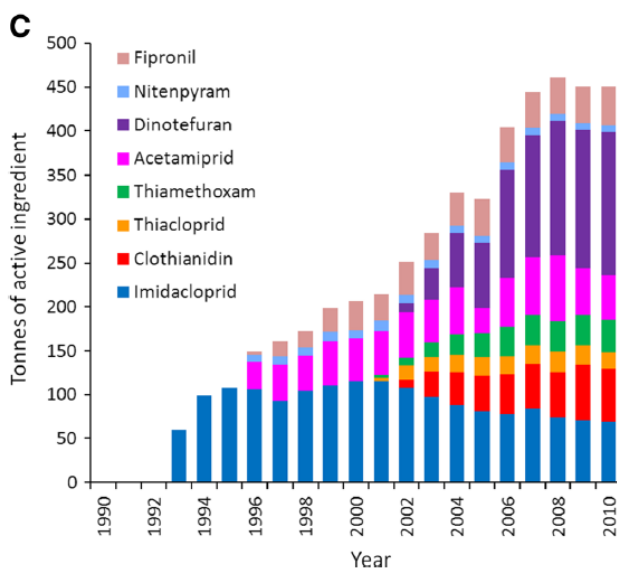
**La synergie entre les insecticides pyréthrinoïdes et les fongicides imidazoles** ou EBI (Ergosterol Biosynthesis Inhibitor) chez l'abeille domestique a fait l'objet de nombreux travaux dont la plupart ont été réalisés dans les années 90. Un mélange de pyréthrinoïde, la deltaméthrine et de fongicide imidazole, le prochloraze appliqué en laboratoire sur les ouvrières par pulvérisation en tour de Potter (respectivement aux doses recommandées en agriculture de 0,125 g/ha et 25 g/ha) provoque une mortalité corrigée de 67,5 % 24 h après traitement et 74,1 % à 50 h (Colin et Belzunces 1992). Ce dernier chiffre est réduit à 27,5 % lorsqu'un délai de 19 h est respecté entre l'application de la deltaméthrine et celle du prochloraze (23,8 % lorsque le prochloraze précède la deltaméthrine). Cet effet synergique n'a pas été reproduit chez des ouvrières d'hiver (Meled *et al.* 1998). Des effets sublétaux sont également mesurés sur la thermorégulation des ouvrières lorsque la deltaméthrine (0,5 et 1,5 ng/abeille) est associée au prochloraze ou au difenoconazole (850 ng/abeille), provoquant une hypothermie des individus (Vandame et Belzunces 1998). Toujours concernant les effets sublétaux, lorsque la deltaméthrine et le prochloraze sont combinés, la cardiotoxicité de l'insecticide est augmentée de plus de 100 fois, alors que celle du fongicide est multipliée par un facteur 10 (Papaefthimiou et Theophilidis 2001). Les auteurs supposent que ces molécules agissent sur la même cible biologique. Toutefois, le principal mécanisme rapporté comme pouvant sous-tendre la synergie entre les fongicides imidazoles et les insecticides pyréthrinoïdes est l'inhibition des enzymes de détoxification des xénobiotiques associées au cytochrome P450 (Johnson *et al.* 2013; Johnson *et al.* 2009; Johnson *et al.* 2006; Pilling *et al.* 1995). Pilling et Jepson (1993) ont testé deux fongicides de la famille des EBI (le propiconazole et le flutriafol) qui augmentent tous la toxicité de la lambda-cyhalothrine chez l'abeille. Le propiconazole est le produit provoquant l'effet synergique le plus élevé en réduisant la DL50 de lambda-cyhalothrine par un facteur de 16,2 (68,0 ng vs 4,2 ng/abeille). Ainsi, les auteurs calculent le quotient de risque lié à la pulvérisation de la lambda-cyhalothrine en conditions réelles à 110, mais ce quotient devient 366 dans le cas d'un mélange avec le flutriafol et 1786 avec le propiconazole.

En laboratoire, un net effet synergique entre le thiaclopride et le fongicide tébuconazole, de la famille des EBI (ergosterol biosynthesis inhibitors), a été mesuré (Schmuck *et al.* 2003b). L'effet synergique entre ce néonicotinoïde et d'autres fongicides EBI (triflumizole, propiconazole) a été confirmé (Iwasa *et al.* 2004). Ces mêmes auteurs ont trouvé également un fort effet de synergie entre l'acétamipride et les fongicides EBI (triflumizole, propiconazole, triadimefon, époxiconazole). Toutefois, cette synergie n'est pas confirmée après une application agronomique des spécialités commerciales à base de thiaclopride et de tébuconazole (respectivement Calypso et Folicur ; Schmuck *et al.* (2003b)) ou à base d'acétamipride et de triflumizole (Iwasa *et al.* 2004). Cependant, les résultats de l'expérimentation sous tunnel de Schmuck *et al.* (2003b) sont à considérer avec prudence car ils n'utilisent que trois colonies constituées de petites populations (3 000 à 8 000 ouvrières).

**La toxicité des acaricides**, utilisés couramment par les apiculteurs contre *Varroa* pour leur innocuité relative sur l'abeille domestique, peut augmenter lorsqu'ils agissent ensemble. Avec des expérimentations en laboratoire, Johnson *et al.* (2009) trouvent que l'impact du *tau*-fluvalinate chez de jeunes ouvrières (3 jours) est plus élevé lorsqu'elles ont été précédemment exposées au coumaphos. Le coumaphos appliqué après le *tau*-fluvalinate provoque uniquement une légère augmentation de la mortalité. Les acaricides anti-*Varroa* peuvent également influencer l'effet des insecticides.

Les ouvrières traitées à l'Apistan® ont montré une sensibilité plus grande à la bifenthrine que les ouvrières non traitées (Ellis *et al.* 1997). La toxicité de la bifenthrine a été augmentée par 1,9 lorsque les ouvrières ont été au préalable exposées à l'acaricide. Un tel effet n'est pas retrouvé avec deux autres insecticides, le carbaryl et le parathion-méthyl.

**Le cas des néonicotinoïdes** est particulièrement argumenté et a déjà été brièvement évoqué au paragraphe de la métabolisation des pesticides (*vide supra*). D'une part, le marché croissant de cette famille d'insecticides neurotoxiques couvre aujourd'hui plus d'un quart du marché mondial (Simon-Delso *et al.* 2015). Ceci s'explique par le nombre important d'applications proposées (enrobages de semences, pulvérisations, granulés du sol, injections dans les troncs, trempages, irrigation, *etc.*) et par l'utilisation prophylactique de ces molécules (traitements préventifs contre les ravageurs) sur plus d'une centaine de cultures (Bijleveld van Lexmond *et al.* 2015). De ce fait, les néonicotinoïdes constituent des contaminants chimiques de plus en plus présents dans les matrices apicoles (Bonmatin *et al.* 2015) et à des teneurs pouvant induire des effets létaux et/ou sublétaux importants chez les pollinisateurs (Pisa *et al.* 2015; van der Sluijs *et al.* 2015). D'autre part, la multiplicité des néonicotinoïdes utilisés va également de façon croissante comme le montre, à titre d'exemple, la **Figure 6**, qui concerne le Japon.



**Figure 6 : Evolution annuelle du marché des néonicotinoïdes (et fipronil) au Japon en tonnes de matières actives. Le graphe montre l'évolution qualitative et quantitative pour 7 néonicotinoïdes, notamment en termes de multiplicité des matières actives utilisées dès 1996. Ces données proviennent de l'Institut National Japonais pour les Etudes Environnementales. D'après Simon-Delso *et al.* (2015)**

En France, les données sont disponibles sur les progressions de vente entre 2009 et 2012 (*cf.* **Figure 7**). Les tonnages des produits pour les traitements de semences n'ont commencé à être intégrés à la banque nationale des ventes de produits phytopharmaceutiques réalisée par les distributeurs agréés qu'à partir de 2012. Les tonnages apportés par ces produits expliquent en partie la forte augmentation constatée entre 2011 et 2012.

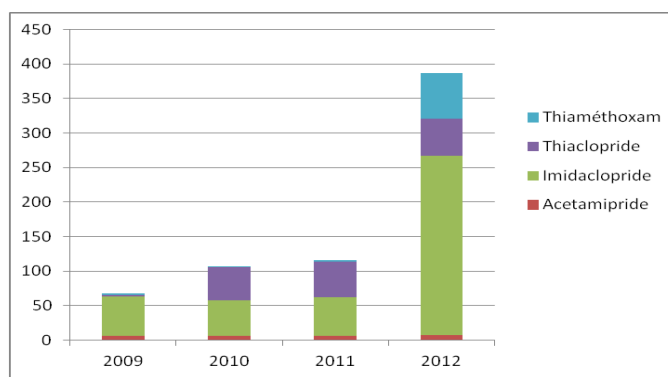


Figure 7 : Evolution des ventes de néonicotinoïdes entre 2009 et 2012 en France, en tonnes de substances actives (Source : Onema et Anses – Banque nationale des ventes de produits phytopharmaceutiques réalisées par les distributeurs agréés – BNV-D)

Enfin, les néonicotinoïdes sont reconnus pour agir en synergie entre eux. Le brevet de cette action en synergie a été déposé par Bayer CropSciences en 2010 (Andersch *et al.*, US patent 7745375 B2, 29/06/2010<sup>41</sup>) et il précise notamment les mélanges plus particulièrement mentionnés au titre de l'invention, dans le **Tableau 13** reporté ci-dessous. A elles seules, ces associations deux-à-deux représentent un large spectre de synergies.

Mixture No.	First active compound	Second active compound	Preferred mixing ratio	Particularly preferred mixing ratio
1	imidacloprid	clothianidin	100:1-1:100	10:1-1:10
2	imidacloprid	dinotefuran	"	"
3	imidacloprid	thiamethoxam	"	"
4	imidacloprid	thiacloprid	"	"
5	imidacloprid	acetamiprid	"	"
6	imidacloprid	nitenpyram	"	"
7	clothianidin	dinotefuran	"	"
8	clothianidin	thiamethoxam	"	"
9	clothianidin	thiacloprid	"	"
10	clothianidin	acetamiprid	"	"
11	clothianidin	nitenpyram	"	"
12	dinotefuran	thiamethoxam	"	"
13	dinotefuran	thiacloprid	"	"
14	dinotefuran	acetamiprid	"	"
15	dinotefuran	nitenpyram	"	"
16	thiamethoxam	thiacloprid	"	"
17	thiamethoxam	acetamiprid	"	"
18	thiamethoxam	nitenpyram	"	"
19	thiacloprid	acetamiprid	"	"
20	thiacloprid	nitenpyram	"	"
21	acetamiprid	nitenpyram	"	"

Tableau 13 : Table des synergies deux-à-deux entre néonicotinoïdes d'après le brevet Bayer (Andersch *et al.*, US patent 7745375 B2, 29/06/2010) pour de très nombreux ordres d'insectes (*Lepidoptera*, *Coleoptera*, *Hymenoptera*, *Diptera*, etc.)

Que ces mélanges de matières actives soient intentionnels (formulations) ou non intentionnels (contamination des matrices apicoles du fait d'aires de butinages variées), ils n'en demeurent pas moins une source de contamination pouvant se retrouver dans l'eau, le pollen et le nectar. On

<sup>41</sup> <http://patentimages.storage.googleapis.com/pdfs/US7745375.pdf>

remarquera que les rapports de mélange les plus efficaces vont de 100/1 jusqu'à 1/100, ce qui représente une très large gamme quantitative de synergies. La récente étude de Paradis *et al.* (2013) illustre la présence simultanée dans le nectar de 4 insecticides dont 3 néonicotinoïdes (acétamipride, thiaclopride et thiaméthoxam) et la deltaméthrine. Un autre mélange constitué de *tau*-fluvalinate (provenance externe à la ruche) et de 2 néonicotinoïdes (acétamipride et thiaclopride) a aussi été observé dans la même étude faite en Vendée. Une illustration supplémentaire est trouvée dans les données CETIOM-ITSAP (*cf.* chapitre 4.2) concernant les pollens de trappe (région Centre). Ici, ce sont l'imidaclopride, le thiaclopride et le thiaméthoxam qui sont retrouvés en 2012 et 2013 au chapitre des néonicotinoïdes. Ainsi, la co-exposition à plusieurs néonicotinoïdes est avérée *via* le pollen et le nectar sur le territoire français. Si l'effet synergique de deux molécules néonicotinoïdes ne fait aucun doute, la question est maintenant étendue aux effets synergiques de trois néonicotinoïdes (ou plus).

**Concernant les interactions entre antibiotiques et autres facteurs chimiques**, peu de données sont disponibles. Des essais en laboratoire basés sur les taux de mortalité des butineuses ont démontré des effets interactifs parmi les acaricides, entre acaricides et antibiotiques et entre acaricides et fongicides (Johnson *et al.* 2013). Ces auteurs ont montré que le *tau*-fluvalinate interagissait avec deux des trois antibiotiques testés (oxytétracycline-OTC, davantage avec la fumagilline, mais pas avec la tylosine). Le coumaphos, le thymol et l'amitrazé n'ont eu aucune interaction avec les antibiotiques. D'autres travaux antérieurs avaient déjà montré des interactions concernant l'OTC.

L'exposition simultanée du *tau*-fluvalinate et de l'OTC a augmenté la toxicité du *tau*-fluvalinate (Hawthorne et Dively 2011). L'OTC bloque les enzymes de transport, ce qui augmente la sensibilité des abeilles aux autres substances toxiques. L'OTC, en présence d'amitrazé, a entraîné la mort programmée des cellules dans l'intestin des abeilles (Gregorc et Bowen 2000). Hawthorne et Dively (2011) ont montré que des abeilles nourries avec de l'OTC étaient significativement plus sensibles au coumaphos et au *tau*-fluvalinate : l'antibiotique doit interférer avec l'excrétion ou le métabolisme normal de ces pesticides. L'OTC augmente significativement la mortalité des abeilles exposées au coumaphos et au *tau*-fluvalinate : (1) la mortalité des abeilles traitées avec 2 µg/µl de coumaphos a augmenté de 7 à 51 % après un nourrissage avec l'OTC et (2) traitées avec 3 µg/µl de *tau*-fluvalinate, la mortalité a augmenté de 5,6 à 39 % après un nourrissage avec l'OTC. En conclusion, la co-application de l'OTC et des acaricides a augmenté la probabilité d'intoxication par les acaricides contaminant les cires et les réserves de nourriture. Ces interactions de l'OTC avec des pesticides (coumaphos et *tau*-fluvalinate) contribuent à la perte hivernale de colonies (durant l'hiver ou au début du printemps). Dans leurs conditions expérimentales, ces auteurs ont montré que l'OTC augmentait la sensibilité des abeilles aux pesticides.

#### 4.1.2.3 Entre agents biologiques et agents chimiques

De nombreux pesticides d'origine agricole ou apicole sont maintenant présents de façon systématique dans l'environnement des abeilles et dans les matrices apicoles (cires, pollen, nectar). En outre, les abeilles sont entourées d'un cortège de parasites, prédateurs et agents infectieux. Les interactions entre ces agents infectieux et les pesticides sont donc potentiellement nombreuses et peuvent affecter la santé des abeilles. Parmi les différentes combinaisons d'interactions possibles, seul un nombre limité d'entre elles ont été étudiées, le plus souvent dans des conditions expérimentales de laboratoire (cagettes) qui sont, par nécessité, de plus ou moins bons modèles des conditions naturelles de la colonie. Ces interactions ont été décrites en partie dans le rapport scientifique du Defra par Thompson (2012).

##### 4.1.2.3.1 Conditions contrôlées

###### 4.1.2.3.1.1 *Nosema* - pesticides

La présence de *Nosema apis* chez les ouvrières d'*A. mellifera* artificiellement infectées augmente leur sensibilité à un insecticide organochloré, le DDT, interdit en France depuis les années 70 (Ladas 1972), ce qui suggère un lien entre les deux facteurs sur la survie des abeilles.

La synergie entre *N. ceranae* et l'imidaclopride a été démontrée sur des abeilles placées en conditions contrôlées de laboratoire (cagettes). De plus, l'interaction imidaclopride – *N. ceranae* induit un stress énergétique et une diminution significative de la glucose oxydase, un enzyme impliqué dans l'immunité sociale par son effet de stérilisation de la nourriture larvaire (Alaux *et al.* 2010a). Un résultat similaire a été mis en évidence par Vidau *et al.* (2011) qui ont montré, dans les mêmes conditions contrôlées de laboratoire, un effet synergique de doses sublétales de fipronil ou de thiaclopride sur la mortalité des abeilles lorsqu'elles sont parasitées par *N. ceranae*. Cet effet synergétique n'est pas fortement lié à une diminution du système de détoxication. Alors que le fipronil semble diminuer le nombre de spores de *Nosema* dans l'intestin des abeilles, le thiaclopride, à l'opposé, semble l'augmenter significativement. Cet effet de synergie aggravant de la co-exposition fipronil - *N. ceranae* a été confirmé par Aufauvre *et al.* (2012) sur la survie d'ouvrières élevées en laboratoire, et cela quel que soit l'ordre d'administration de ces deux stress. Les auteurs ont montré que, quel que soit le mode d'infestation par *Nosema ceranae*, séquentiel ou simultané avec l'insecticide, l'effet de synergie est conservé et plus fortement marqué lorsque les stresseurs sont appliqués à l'émergence de l'abeille. Dans une étude plus récente, les mêmes auteurs (Aufauvre *et al.* 2014) ont montré que la combinaison *N. ceranae*-exposition chronique d'insecticide (imidaclopride ou fipronil) entraîne des mortalités significativement plus importantes que les stresseurs seuls, mais ne montrent pas de synergie. L'étude globale (RNA-Seq) des profils d'expression génique des abeilles de chaque modalité ne montre pas d'effet significatif sur les gènes de détoxication mais un effet répresseur sur les gènes impliqués dans l'immunité. Les abeilles traitées avec *N. ceranae* seul ou en combinaison avec un des insecticides ont montré une forte altération de l'immunité du tube digestif et des modifications affectant la cuticule et le métabolisme du tréhalose. L'impact de ces traitements sur l'expression des gènes a augmenté au cours du temps démontrant une absence de rétablissement d'une activité normale, ce qui suggère un lien avec les fortes mortalités d'abeilles observées dans l'expérience.

Doublet *et al.* (2014) ont testé les effets des interactions de doses sublétales d'un néonicotinoïde, le thiaclopride, de *N. ceranae* et du virus BQCV sur des larves et des abeilles adultes dans des conditions de laboratoire. Les auteurs ont trouvé une interaction additive entre le BQCV et le thiaclopride sur la survie des larves d'abeilles probablement due aux charges virales élevées. Chez les abeilles adultes, les auteurs ont montré deux interactions synergiques sur la mortalité des abeilles, *N. ceranae* et BQCV, et *N. ceranae* et thiaclopride. La combinaison des deux agents infectieux a eu encore plus d'effet que celle *N. ceranae* - thiaclopride. Les deux pathogènes semblent être les stresseurs impactant le plus la survie des abeilles adultes et les doses sublétales de pesticides provoquent des effets délétères importants sur les larves et les adultes. Pour conclure, les auteurs posent la question des effets de ces facteurs de stress au niveau de la colonie. C'est un point important car la plupart des expérimentations sont réalisées en conditions contrôlées.

Retschnig *et al.* (2014a) ont également montré un effet de synergie entre des doses sublétales de thiaclopride et *Nosema ceranae* dépendant de la dose de thiaclopride. En outre, les auteurs ont montré un effet négatif de l'insecticide sur la reproduction des *Nosema*. Ce résultat démontre que ces types d'interactions peuvent être dynamiques et devraient être étudiées dans un contexte qui inclut un plus grand nombre de combinaisons.

Pettis *et al.* (2013) ont montré, en conditions contrôlées de cagettes, une augmentation significative de la probabilité d'infection par *Nosema* chez les abeilles qui ont consommé du pollen contenant des fongicides (chlorothalonil et pyraclostrobine).

Il est intéressant de noter que la combinaison insecticides et champignons pathogènes, déjà citée précédemment (brevet Bayer EP0627165 A1, 1994), est utilisée dans la lutte intégrée contre les ravageurs des cultures (Maredia *et al.* 2003) grâce aux effets synergiques démontrés de ces interactions sur la mortalité des insectes, notamment avec l'imidaclopride (Al Mazraáwi 2007; Purwar et Sachan 2006; Ramakrishnan *et al.* 1999; Santos *et al.* 2007). Il n'est donc pas surprenant de constater les mêmes effets sur les abeilles.



#### 4.1.2.3.1.2 DWV - Pesticides

Antérieurement aux résultats de Doublet *et al.* (2014) dans le cas des effets toxiques additifs du thiaclopride et de BQCV exposés ci-dessus (cf. 4.1.2.3.1.1.), les résultats de Di Prisco *et al.* (2013) ont montré que l'exposition des abeilles à la clothianidine était associée à un syndrome d'immunosuppression (et non avec le chlorpyrifos), plus précisément caractérisé par un effet sur l'expression du facteur de transcription NF- $\kappa$ B (dorsal-1A), et par une réplication accrue du (DWV). Di Prisco *et al.* (2013) ont étudié, en conditions contrôlées (cagettes), l'effet de la clothianidine et de l'imidaclopride sur la réponse immunitaire de l'abeille et la réplication des virus pathogènes. Ils ont montré que l'insecticide néonicotinoïde clothianidine modulait négativement la signalisation immunitaire du facteur de transcription NF- $\kappa$ B impliqué dans l'immunité des insectes et affectait les défenses antivirales contrôlées par ce facteur de transcription. Ils ont identifié un effet négatif sur la modulation de l'activation de NF- $\kappa$ B. L'exposition à la clothianidine, en augmentant la transcription du gène codant pour cet inhibiteur, réduit les défenses immunitaires et induit la réplication du virus des ailes déformées (DWV) chez l'abeille. Cette immunosuppression est induite également par l'imidaclopride, mais pas par le chlorpyrifos, qui n'affecte pas la signalisation NF- $\kappa$ B. L'effet de doses sublétales de cet insecticide sur la prolifération virale suggère que les néonicotinoïdes peuvent avoir un effet négatif sur les populations d'abeilles en conditions naturelles. Ces expérimentations en conditions contrôlées montrent une interaction négative forte entre virus, *Nosema* et les pesticides de nouvelle génération (néonicotinoïdes et fongicides) sur l'immunité des abeilles. La clothianidine, l'imidaclopride et le thiaclopride ont la capacité de réduire les réponses immunitaires des abeilles et donc de favoriser la réplication de virus comme DWV et BQCV.

#### 4.1.2.3.1.3 Virus de la paralysie chronique - pesticides

En analysant les facteurs faisant varier la toxicité aiguë des insecticides, Bendahou *et al.* (1997) ont trouvé une DL50 de la cyperméthrine (pyréthrianoïde) diminuée par un facteur 2,66 (0,06 contre 0,16 mg/abeille) lorsque les ouvrières émergentes d'abeilles domestiques étaient infestées par le virus de la paralysie chronique. L'administration combinée en laboratoire durant 7 jours de sirop contaminé avec la cyperméthrine (10 mg/L) et avec le virus, a réduit significativement la consommation des ouvrières et leur survie par rapport aux abeilles exposées à un seul stress.

#### 4.1.2.3.1.4 Loque américaine - pesticides

Alors que Morse *et al.* (1965) montrent une augmentation de larves infectées par la loque américaine après un traitement au carbaryl, dans leurs conditions expérimentales, Atkins *et al.* (1981) ne remarquent aucun changement de toxicité du carbaryl, du lindane et du malathion chez des abeilles atteintes par la loque américaine.

#### 4.1.2.3.2 Conditions naturelles, niveau de la colonie ou du rucher

Il s'agit de décrire ici les études relatives à la co-exposition en conditions naturelles et non les études décrivant les expositions simples (études monofactorielles visant à observer l'influence d'un paramètre d'exposition dans un contexte paysager particulier). Pettis *et al.* (2012) ont montré, une forte interaction entre l'imidaclopride et *Nosema*. Le nombre de spores de *Nosema* dans le tube digestif des ouvrières a augmenté très significativement lorsque la colonie a été exposée en conditions naturelles à des doses sublétales d'imidaclopride (5 ou 20  $\mu$ g/kg).

Des abeilles exposées à des rayons de couvain contaminés par des pesticides ont été davantage parasitées par *Nosema*, et à un plus jeune âge, que des abeilles ayant été moins exposées aux pesticides (Wu *et al.* 2012). Ces résultats suggèrent un effet des pesticides contenus dans les cires des cadres sur la sensibilité des abeilles à *Nosema*. Les mêmes auteurs ont montré en 2011 que l'exposition des abeilles immatures (larves et nymphes) aux pesticides contenus dans les cires des rayons retardait le développement des abeilles et favorisait ainsi la reproduction du *Varroa*. De plus, ils ont montré la capacité des résidus de pesticides à migrer d'un cadre à l'autre, mettant ainsi en évidence leur transport et la contamination des abeilles.

Une étude des effets d'une exposition sub létale à un insecticide, le chlorpyrifos, et à un produit à base de deux fongicides, le boscalide et la pyraclostrobine, sur l'émergence et les charges virales de reines d'*Apis mellifera* en conditions naturelles d'élevage et sous serre (DeGrandi-Hoffman *et al.* 2013) a révélé des effets de ces pesticides, seuls ou en association, sur la réduction de l'émergence des reines et l'augmentation des taux de DWV et de BQCV, avec un impact plus important lorsque les deux pesticides étaient appliqués en association aux colonies.

Une étude de l'effet de l'exposition chronique du pyréthrianoïde lambda (k)-cyhalothrine et ses interactions avec le parasite trypanosome *Crithidia bombi* a été réalisée sur des colonies de bourdons *Bombus terrestris* en laboratoire pendant 14 semaines (Baron *et al.* 2014). Alors que les colonies traitées par l'insecticide ont produit des individus dont la masse corporelle était plus faible, aucun effet de l'interaction pesticide - trypanosome n'a été montré. De même, il n'a pas été montré d'effet du pesticide sur la sensibilité des abeilles au trypanosome, ni sur l'intensité de l'infection parasitaire.

Concernant les traitements anti-*Varroa*, trois acaricides, le thymol, le coumaphos et l'acide formique, utilisés dans le contrôle de *Varroa*, ont été capables de modifier des réponses métaboliques de l'abeille en conditions naturelles (colonies), comme l'expression de 4 gènes impliqués dans la détoxification (CYP306, CYP6a514, pkar, pkac) et 2 gènes de l'immunité (DSC37 et BASK). L'étude a montré une tendance de réduction des pathogènes (autres que *Varroa*) avec ces acaricides (Boncristiani *et al.* 2012).

Le tau-fluvalinate utilisé dans la lutte contre *Varroa* a eu un effet sur le virus DWV en conditions naturelles (colonies). L'effet du traitement a tout d'abord conduit à une augmentation de la charge virale, probablement en modifiant la sensibilité de l'hôte. La charge virale de DWV a ensuite diminué, effet lié à la diminution du parasitisme de *Varroa* consécutif au traitement acaricide (Locke *et al.* 2012).

Une étude en conditions naturelles, réalisée sur des colonies, a révélé les effets négatifs du parasitisme de *Nosema ceranae* sur l'efficacité des traitements acaricides anti-*Varroa*, à base d'amitraze (Botías *et al.* 2012).

Il semble que la présence de certains pesticides dans les colonies puisse augmenter le parasitisme de *Nosema* en conditions naturelles et donc augmente les effets négatifs du parasite, ce qui confirme en partie les résultats obtenus en conditions contrôlées.

En conclusion sur les interactions entre agents infectieux et pesticides, le nombre d'interactions étudiées est faible par rapport au nombre d'agents infectieux et surtout de pesticides auxquels les abeilles sont exposées. Les travaux publiés s'intéressent plus particulièrement à des stress nouvellement identifiés (néonicotinoïdes, acaricides, *Nosema ceranae*, virus, *etc.*). Bien que les premiers travaux montrent des effets importants entre ces pesticides et agents infectieux de l'abeille, il y a très peu d'information compte tenu des multiples interactions potentiellement critiques.

### 4.1.3 Modulation des effets de facteurs chimiques ou biologiques par d'autres facteurs

#### 4.1.3.1 En fonction de facteurs intrinsèques aux abeilles

##### 4.1.3.1.1 Selon l'âge des ouvrières

L'âge des ouvrières est un facteur de variabilité de leur tolérance aux pesticides : les ouvrières nouvellement émergentes furent plus sensibles au DDT, à la dieldrine et au carbaryl que les individus plus âgés, alors que ces derniers ont été plus sensibles au malathion et au parathion-méthyl (Ladas 1972; Mayland et Burkhardt 1970). Cette forte sensibilité des ouvrières âgées pour les organosphosphorés a été confirmée par Bendahou *et al.* (1997) avec le fénitrothion. Mais ce fait n'est pas restreint à cette famille d'insecticides puisque Wahl et Ulm (1983) ont également mis en évidence que la tolérance des ouvrières à un fongicide à base d'oxyde de cuivre et à un herbicide à base de 2,4-D (sel d'amine) diminuait en fonction de leur âge. Cependant, les auteurs

ont montré que le taux d'infestation par *Nosema apis*, qui augmente avec l'âge chez les ouvrières, était un facteur confondant.

Chez des ouvrières âgées de 7 jours, le nombre d'essais pour observer l'extinction du réflexe d'extension du proboscis après une administration d'imidaclopride a été augmenté par rapport au témoin, alors qu'une administration similaire a provoqué un effet opposé chez des ouvrières plus âgées de seulement 24 h (Guez *et al.* 2001).

Bendahou *et al.* (1997) ont montré que la DL50 de la cyperméthrine chez des ouvrières âgées de moins d'un jour était significativement différente de celle calculée pour des ouvrières plus âgées (respectivement 0,16 et 0,21 mg/abeille), de même pour le fénitrothion (respectivement 9,27 et 0,42 mg/abeille).

#### 4.1.3.1.2 Selon le poids des ouvrières

La toxicité létale et aiguë des pesticides diminue avec le poids des abeilles exposées. Cela a été montré chez l'abeille domestique (Gerig 1975; Ladas 1972) et particulièrement chez l'abeille africanisée pour le paraquat (Nogueira Couto *et al.* 1996). Il faut noter que le poids des ouvrières mesuré en conditions de laboratoire peut être différent de celui des ouvrières en conditions réelles de par l'apport d'alimentation et l'incapacité qu'ont les individus à vider leur ampoule rectale.

#### 4.1.3.1.3 Selon l'expérience des abeilles

Henry *et al.* (2012) ont montré que la graduation des effets négatifs du thiaméthoxam administré par ingestion à la dose de 1,3 ng/abeille sur le retour à la ruche des butineuses dépendait de l'expérience qu'ont les butineuses du parcours à réaliser. La différence avec les performances de retour des butineuses témoins s'accroît lorsque les butineuses traitées ont été relâchées à des points choisis aléatoirement autour de leur ruche.

#### 4.1.3.1.4 Selon la génétique des abeilles

Les facteurs génétiques ne sont pas des facteurs de stress à proprement parler mais sont potentiellement impliqués dans la modulation des effets de différents stress. Cette partie traite donc des facteurs pouvant affecter la diversité génétique populationnelle et coloniale ainsi que son rôle dans la résilience au stress.

- **Diversité génétique populationnelle**

Les processus de domestication s'accompagnent souvent de profonds changements sur la variabilité génétique chez les animaux et les plantes (Brudford *et al.* 2003). Les abeilles ont été utilisées par les humains depuis au moins 7 000 ans avant JC à la fois pour le miel, la production de cire et la pollinisation (Jaffe *et al.* 2010). Dans le contexte de déclin des abeilles, une des causes avancées est la réduction de la diversité génétique dans le management des abeilles avec le risque d'utiliser des abeilles non adaptées aux conditions locales (Oldroyd 2007; Sheppard 2012; vanEngelsdorp et Meixner 2010), dans la mesure où l'apiculture favorise la distribution de sous espèces à valeur commerciale, à forte production en miel et en pollen, en dehors de leur zone d'origine. Cependant, deux études relativement récentes sur l'histoire évolutive des abeilles à miel ont apporté le doute sur le fait que le management des abeilles réduit la diversité génétique (Whitfield *et al.* 2006; Zayed et Whitfield 2008).

Bien que les abeilles ne soient pas domestiquées au sens strict du terme (Oxley et Oldroyd 2010) et soient sujettes à de nombreuses contraintes environnementales, elles sont activement sélectionnées. Une conséquence directe serait une diminution de la diversité génétique. Cependant, une étude visant à comparer les populations sauvages avec les populations domestiques d'Europe et d'Amérique du Nord a récemment montré que l'action de l'homme (apiculture) a pour effet d'augmenter la diversité génétique en provoquant des croisements avec des individus d'origines différentes entre l'est et l'ouest de l'Europe (Harpur *et al.* 2012). Une autre étude a montré qu'aux îles Canaries, des introductions continues de sous-espèces d'abeilles étrangères n'augmentent pas la diversité génétique des populations locales (Munoz *et al.* 2012). Pourtant, des hybridations entre les abeilles locales et importées se sont produites et ont conduit à des variations dans la composition génétique décrites comme faibles et pouvant conduire à un

risque de perte d'identité génétique, c'est-à-dire une perte des caractéristiques locales (Munoz *et al.*, 2012). De plus, il semblerait que les abeilles commercialisées au Canada soient des hybrides présentant plus de variabilité que leurs ancêtres en Europe. Ces résultats semblent en contradiction avec le fait que les pratiques apicoles à travers l'homogénéisation génétique à grande échelle des populations mélangées/croisées pourrait conduire à une perte conséquente des adaptations locales (De la Rua *et al.* 2013). En effet, c'est en Afrique que l'on trouve la plus large population d'abeilles sauvages, avec peu ou pas d'impact des pratiques humaines sur les populations (Dietemann *et al.* 2009) et que se trouvent les populations d'abeilles avec la plus forte diversité génétique (Harpur *et al.* 2012; Jaffe *et al.* 2010).

Des croisements délibérés et l'utilisation d'abeilles non natives en apiculture favorisent la création de populations mixtes, lesquelles vont atteindre les populations natives. Les abeilles hybrides présenteront une diversité génétique plus importante, mais risqueront de perdre certains traits issus de la sélection naturelle qui les rendaient particulièrement bien adaptées à leur environnement local (Costa *et al.* 2012; Strange *et al.* 2007).

Très peu d'éleveurs ont les moyens d'effectuer un contrôle strict utilisant des îles comme zone d'accouplement ou bien l'insémination artificielle. En France, le programme Feaga a financé pendant plusieurs années des recherches sur cette question qui ont permis de conclure qu'il était possible de maintenir une sous-espèce ou un écotype dans des conditions définies. Plusieurs conservatoires ont ainsi été mis en place dans plusieurs régions. Ils visent la conservation, la sauvegarde et le développement de l'abeille noire *Apis mellifera mellifera*, et, en particulier, la sélection et la production de reines et d'essaims. La plupart de ces conservatoires bénéficient d'un soutien scientifique, dans le cadre d'un programme Feaga. Certains apiculteurs accouplent les abeilles natives de leur région, ou vont être impliqués dans des programmes de conservation visant à éviter les croisements entre des populations domestiquées ou sauvages (Bouga *et al.* 2011; Chapman *et al.* 2008). Ces programmes permettent de conserver différentes populations locales ou écotypes et ainsi une certaine diversité, à plus grande échelle. Ceci permet de préserver les écotypes adaptés à leur environnement. La sélection ciblant des phénotypes avantageux pour l'apiculture, par exemple la résistance au *Varroa* (Harbo et Harris 1999; Spivak et Reuter 2001b), peut sembler être une solution de choix pour améliorer la santé du cheptel. Cependant, la sélection ciblée peut conduire à une réduction de la diversité génétique du cheptel. De plus, elle peut se faire au détriment d'autres caractères important pour la colonie ou l'apiculture, comme la production de miel.

- **Diversité génétique intra-coloniale**

Les spermatozoïdes utilisés pour la fécondation sont stockés dans la spermathèque et contiennent un mélange de semences issues d'une douzaine de mâles en moyenne (Winston 1987). Les reines s'accouplent pendant leur vol de fécondation, un choix potentiel des mâles par la reine n'ayant pas été démontré à ce jour. De nombreuses études ont montré, de façon convaincante, l'importance des accouplements multiples ou polyandrie à différents niveaux. La qualité de l'accouplement est une étape clé dont les effets auront un impact sur, à la fois, la physiologie de la reine et les interactions avec les ouvrières seulement quelques jours après l'accouplement (Kocher *et al.* 2009; Kocher *et al.* 2008). De même, la qualité et la quantité de semence utilisée pour l'insémination artificielle affectera les interactions reine-ouvrières et la physiologie de la reine (Richard *et al.* 2011; Richard *et al.* 2007).

La diversité génétique intra-coloniale confère des avantages adaptatifs significatifs incluant une meilleure stabilité thermique (Jones *et al.* 2004; Mattila et Seeley 2007; Oldroyd et Fewell 2007), une réduction des risques d'atteintes par des agents infectieux, principalement sur le couvain (Palmer et Oldroyd 2003; Seeley et Tarpay 2007; Tarpay 2003; Tarpay et Seeley 2006), et s'accompagne d'une meilleure performance pour les différentes tâches liées à une meilleure division du travail (Mattila *et al.* 2008; Smith *et al.* 2008), l'ensemble conduisant à une meilleure productivité (plus de miel) et à de meilleures chances de survie (Mattila et Seeley 2007; Tarpay *et al.* 2013). En effet, il a été récemment montré que les reines accouplées avec plus de sept mâles avait eu 2,86 fois plus de chance de survivre durant les 10 mois d'activité apicole de l'étude (Tarpay *et al.* 2013).

Toutefois, il n'a pas encore été possible d'établir un lien direct entre les bénéfices de la diversité génétique et le déclin des populations d'abeilles, même s'il existe un lien entre une faible diversité génétique et la prévalence des maladies du couvain. Les colonies génétiquement diversifiées (où la reine a effectué des accouplements multiples) montrent une probabilité moins importante de contracter des infections sévères liées aux maladies du couvain comparées à des colonies où la reine n'a été fécondé que par un seul mâle (Palmer et Oldroyd 2003; Seeley et Tarry 2007; Tarry 2003; Tarry et Seeley 2006). Si ces études montrent une plus faible virulence dans les colonies (principalement le couvain plâtré à *Ascosphaera apis* et la loque américaine à *Paenibacillus larvae*), elles n'ont pas mis en évidence de différences claires sur la *fitness*<sup>42</sup> entre ces deux types de colonies et donc cela reste à démontrer pour les maladies affectant les adultes. Par exemple, la diversité génétique intra-coloniale (nombre de mâles contribuant à l'insémination de la reine) ne semble pas influencer les charges en *Varroa* au sein de la colonie (Neumann et Mortiz 2000). En revanche, une réduction de la diversité génétique à l'échelle de la population augmenterait les risques de consanguinité et donc la production de mâle diploïdes à l'origine d'un « couvain lacunaire », ce qui aurait des conséquences désastreuses sur les colonies d'abeilles (Cook et Crozier 1995; Harpur *et al.* 2013).

En conclusion, il n'existe pas d'évidence d'une baisse de la diversité génétique chez l'abeille domestique et de son rôle dans le déclin des populations, du moins à l'échelle mondiale.

- **Implication de facteurs génétiques dans la modulation de facteurs chimiques**

Il convient de noter que les travaux sur la toxicité différentielle de pesticides selon la race, cités ci-après, ne présentent pas de caractérisation génétique rigoureuse du matériel biologique utilisé.

Après une administration orale d'imidaclopride, la DL50 chez *Apis mellifera mellifera* et *Apis mellifera caucasica* a été calculée à 5 ng/abeille (Suchail *et al.* 2000). Par contre, l'administration par contact de ce même insecticide a induit une DL50 de 24 ng/abeille pour *A. m. mellifera* et de seulement 14 ng/abeille pour *A. m. caucasica*. Laurino *et al.* (2010) ont trouvé une toxicité comparable de l'imidaclopride, de la clothianidine et du thiaméthoxam sur trois souches d'*Apis mellifera*. Toutefois, les effectifs utilisés par les auteurs ont été très faibles (10 butineuses par dose) et ils ne présentent pas d'analyse génétique des souches, mais se basent uniquement sur des critères morphologiques.

#### 4.1.3.1.5 Selon le type d'abeilles

Les effets sublétaux de l'imidaclopride sur les performances d'apprentissage olfactif en laboratoire ont été enregistrés à partir de concentrations inférieures chez les ouvrières d'été que celles provoquant les mêmes effets chez des ouvrières élevées en hiver dans un rucher chauffé (12 µg/kg vs 48 µg/kg) (Decourtye *et al.* 2003).

### 4.1.3.2 En fonction de facteurs extrinsèques aux abeilles

#### 4.1.3.2.1 Influence de l'alimentation

Wahl et Ulm (1983) ont montré que la quantité et la qualité du pollen consommé par les jeunes ouvrières influencent leur sensibilité ultérieure aux pesticides. Six préparations commerciales (2,4-D Na, Dicopur, Cupravit, Maneb Cela-Merck, Maneb BASF, ZnSO<sub>4</sub>) sur sept ont présenté une DL50 plus faible lorsque les abeilles ont reçu une alimentation déficiente en protéines (pollen de pissenlit réputé pauvre en acides aminés ; Loper et Cohen (1987)). Les substituts de pollen testés ont augmenté la toxicité des pesticides chez les ouvrières. Les colonies maintenues en cage et ayant à leur disposition de riches ressources en pollen ont été moins sensibles aux pesticides. Les auteurs ont conclu que les ouvrières les plus sensibles aux toxiques étaient celles survivant à l'hiver et qui devaient assurer les soins des premières larves de la saison. Les auteurs ont basé la qualité nutritionnelle des pollens uniquement sur le taux de protéines, ce qui était trop restrictif (Brodschneider et Crailsheim 2010; Di Pasquale *et al.* 2013). Une étude récente démontrant le rôle

<sup>42</sup> ou valeur adaptative : capacité d'un individu à se reproduire, mesurée par le nombre de descendants viables et fertiles

positif de l'alimentation pollinique sur l'expression de gènes codant pour des enzymes détoxification pourrait expliquer ce phénomène (Schmehl *et al.* 2014).

En conditions de laboratoire, une carence pollinique peut altérer le métabolisme protéinique, lipidique et énergétique des abeilles (Alaux *et al.* 2011a), induire des effets délétères sur l'immunocompétence (glucose oxydase et taille des corps gras, site de l'immunité humorale) (Alaux *et al.* 2010b), une augmentation de charges virales DWV (Degrandi-Hoffman *et al.* 2010) et une sensibilité accrue à la loque américaine (Rinderer *et al.* 1974), aux infections microsporidiennes (*Nosema*) (Di Pasquale *et al.* 2013; Rinderer et Elliott 1977) et aux pesticides (Wahl et Ulm 1983). Il a même été démontré une diminution de l'élimination du couvain parasité par le *Varroa* au sein de colonies ayant peu de réserve de pollen (Janmaat et Winston 2000b). En outre, les parasites et agents infectieux peuvent augmenter les besoins métaboliques des individus, qui ne pourront y répondre s'il existe un stress nutritionnel. Par exemple, les abeilles infectées par le parasite *Nosema ceranae* augmentent leur consommation de glucides afin de compenser les pertes énergétiques induites par le parasite puisant dans les ressources de l'hôte pour pouvoir se multiplier (Alaux *et al.* 2010a; Mayack et Naug 2009). En revanche, la présence ou l'absence de pollen n'a pas d'effet sur la tolérance au *Varroa* au niveau individuel, le pouvoir pathogène du *Varroa* n'étant pas compensé par une riche alimentation pollinique (Alaux *et al.* 2011a; van Dooremalen *et al.* 2013).

#### 4.1.3.2.2 Selon la saison

Lors d'expérimentations en laboratoire réalisées en été, Meled *et al.* (1998) ont montré un effet synergique sur la mortalité des abeilles domestiques entre la deltaméthrine (pyréthrine) et le prochloraz (imidazole) dès la dose de 31,25 mg/ha, alors que pendant l'hiver cette synergie n'est pas confirmée et cela même à des doses 4 ou 8 fois supérieures. Cela peut probablement s'expliquer par le fait que la toxicité de la deltaméthrine augmente lorsque la température augmente (Bos et Masson 1983).

#### 4.1.3.2.3 Selon la formulation

Une seule étude, à notre connaissance, porte sur la toxicité différentielle d'un insecticide selon la formulation qui le contient (Bendahou *et al.* 1997). La DL50 de la cyperméthrine et celle du fénitrothion sous forme de substance active (respectivement 0,16 et 0,27 mg/abeille) ont été significativement inférieures à celles des formulations Cymbush (0,26 mg/abeille) (100 g de cyperméthrine par litre d'éther de pétrole) et Folithion (0,38 mg/abeille) (550 g de fénitrothion par litre d'éther de pétrole). Toutefois, un co-formulant peut avoir une toxicité intrinsèque comme celle du N-méthyl-2-pyrrolidone (NMP) sur les larves d'abeilles (Zhu *et al.* 2014). Plus généralement, les co-formulants sont notamment reconnus pour pouvoir augmenter la biodisponibilité des matières actives ou leur efficacité sur leurs cibles. La récente étude sur 9 pesticides majeurs (glyphosate, isoproturon, fluroxypyr, pirimicarbe, imidaclopride, acétamipride, tebuconazole, époxiconazole et prochloraz) a montré que, pour 8 d'entre eux, la toxicité des formulations pour les cellules humaines pouvait être plus élevée de plusieurs ordres de grandeur que celle des matières actives seules (Mesnage *et al.* 2014). Seule la formulation sans adjuvant et constitué d'isoproturon, a donné les mêmes résultats lors des comparaisons entre matière active et formulation dans cette étude. Dans le cas particulier de l'imidaclopride et de sa formulation Confidor, l'augmentation de toxicité sur les cellules humaines est due au co-formulant NMP (Mesnage *et al.* 2014), ce qui conforte les observations de Zhu *et al.* (2014) sur l'action toxique directe sur les larves d'abeilles de la matière NMP, pourtant dite « inerte ».

## 4.2 Analyse de données disponibles sur les co-expositions des abeilles aux facteurs biologiques et chimiques en France

### 4.2.1.1 Réalité des co-expositions aux dangers biologiques et/ou chimiques.

Dans les jeux de données où il y a observation simultanée d'agents infectieux et de résidus chimiques sur les mêmes ruches ou les mêmes ruchers, on observe (qu'il y ait ou non symptômes) :

- ✓ des coinfections par plusieurs agents infectieux (un exemple étude ADARA **Figure 8**) ;
- ✓ des cooccurrences de résidus chimiques (deux exemples études Oniris et ADARA **Figure 10** et **Figure 11**) ;
- ✓ des cooccurrences de plusieurs résidus chimiques et plusieurs agents infectieux, en un même lieu à une même date, ou en un même lieu à des dates différentes (un exemple suivi CETIOM-ITSAP
- ✓ **Tableau 15**).

#### 4.2.1.1.1 Cooccurrences d'agents infectieux

- **Colonies avec troubles**

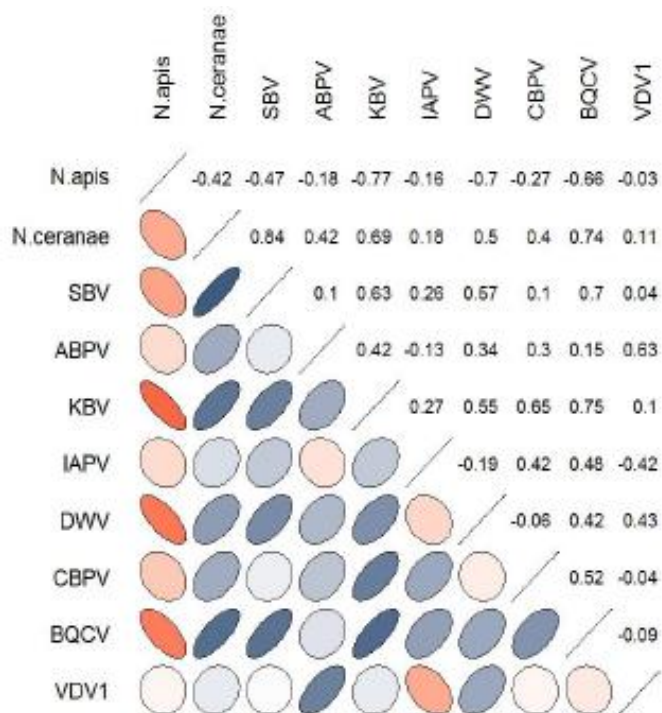


Figure 8 : Exemple de co-infections par plusieurs agents infectieux dans 13 cas cliniques de troubles (étude ADARA)

Les symboles représentent la corrélation deux à deux de la présence des AI dans le jeu de données. Les ovales sont d'autant plus étroits que la corrélation est forte, la couleur bleue représente des présences simultanées. La couleur rouge représente des exclusions réciproques *i.e.* l'agent A est absent quand l'agent B est présent et vice-versa.

Dans le jeu de données ADARA, la recherche de résidus n'a pas été faite de façon systématique, ni identique dans tous les ruchers, c'est la raison pour laquelle il n'est pas possible d'ajouter les dangers chimiques et les calculs de corrélation pour les résidus dans ce schéma, ni de conclure sur le fait de savoir si les troubles ont été causés par ces agents infectieux ou par d'autres facteurs.

• **Colonies sans troubles visibles**

Un graphe similaire a pu être réalisé pour les agents infectieux de l'étude Oniris (sur ruchers sans troubles) (**Figure 9**). Les associations sont moins marquées. On observe des coinfections par les virus du complexe AKI. Les outils moléculaires utilisés ont été conçus pour être spécifiques de chacun des virus du complexe AKI, ceci ne serait donc pas lié à une confusion de la méthode entre génotypes apparentés. Cependant, il est possible que cette coinfection donne lieu à des recombinaisons entre ces différents virus (de Miranda *et al.* 2010). Plusieurs projets de recherche sont en cours pour mieux connaître la biologie de ce complexe viral et explorer sa dynamique micro-évolutive.

On observe aussi sur ce même jeu de données des coinfections entre le virus CBPV et *Nosema ceranae* et *N. apis*. Une explication possible est un effet neurologique du virus CBPV sur le comportement hygiénique des ouvrières (olfaction, mémoire, activité motrice) pour éliminer les larves infectées par *Nosema*, qui proliféreraient alors dans la colonie. Mais une cause commune immunodépressive pourrait aussi être à l'origine de la prolifération des deux agents infectieux. Sur ces ruchers, il n'y avait pas de symptômes en saison, ni d'effet quantifiable sur la survie hivernale (voir le détail dans Mouret *et al.* (2013)).

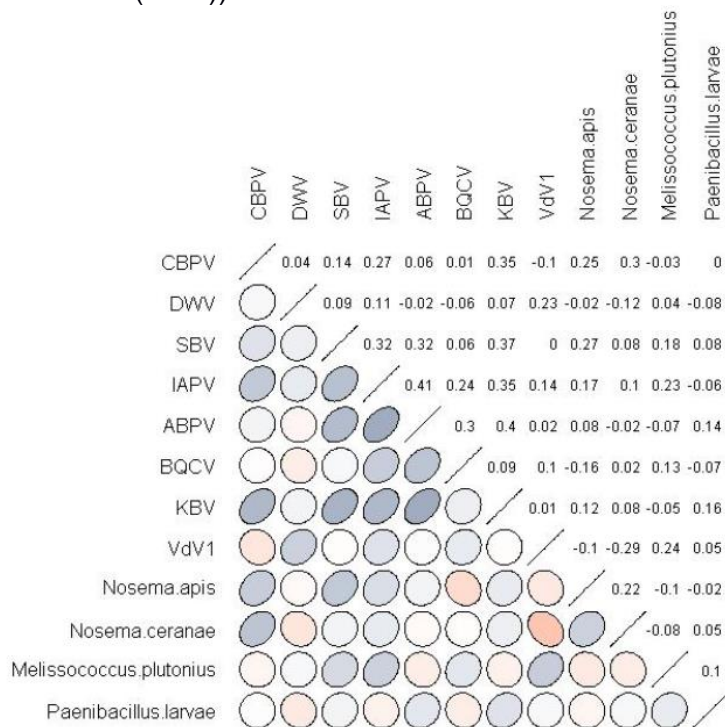


Figure 9 : Exemple de co-infections par plusieurs agents infectieux dans l'étude ONIRIS

4.2.1.1.2 Cooccurrences de dangers chimiques

• **Colonies sans troubles visibles**

Dans l'étude Oniris, qui visait en premier lieu à mettre en relation les résidus trouvés dans les matrices apicoles et les dangers chimiques présents dans l'environnement, 28 substances différentes ont été détectées par une analyse multi-résiduelle (Lambert *et al.* 2013).

L'analyse comparative des profils de contamination a été faite entre les 18 ruchers sur la matrice miel (données de détection moyennées sur les 2 années d'étude, pour chaque rucher). La **Figure 10** montre un arbre de similarité entre les ruchers (plus les profils des substances détectées se ressemblent entre 2 ruchers, plus ceux-ci seront proches dans le graphique).



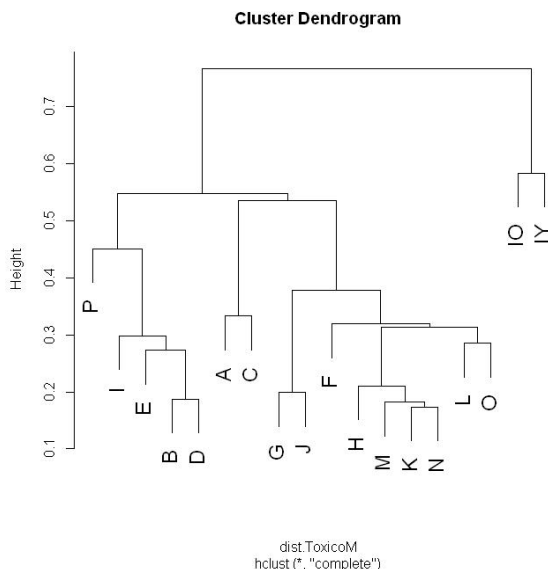


Figure 10 : Représentation des indices de Bray-Curtis permettant de comparer les profils de 18 ruchers pour la matrice miel, sous forme de dendrogramme (méthode du lien complet) (source : rapport Oniris)

Dans le **Tableau 14**, les coefficients de corrélation des substances deux à deux dans l'étude Oniris montrent qu'il y a effectivement des co-expositions insecticides / fongicides, ou acaricides / acaricides.

Tableau 14 : Coefficients de corrélation les plus élevés (supérieurs à 0,40) parmi les 28 résidus détectés au moins une fois (étude Oniris)

Résidus	Coefficient de corrélation	p-value
Diéthofencarbe – chlorpyrifos-méthyl	0,70	2,2e-16
Prochloraze – Fénoxycarbe	0,70	2,2e-16
Chlorpyrifos-méthyl – Pyriproxifène	0,63	2,2e-16
Diéthofencarbe – Pyriproxifène	0,44	4,498e-08
Amitraze I – Tau-fluvalinate	0,44	5,987e-08
Prochloraze – Flusilazole	0,40	1,026e-08
Carbofuran – Flusilazole	0,40	1,026e-08

• **Colonies avec troubles**

Ceci apparaît également dans les observations faites sur 12 cas cliniques de ruchers avec troubles, dans la région Rhône-Alpes (étude ADARA), bien que la structure des données ne permette pas de calculer des indices de similarité ou des corrélations 2 à 2 pour détecter d'éventuelles associations préférentielles. La **Figure 11** montre le nombre de ruchers testés où les substances ont été détectées.

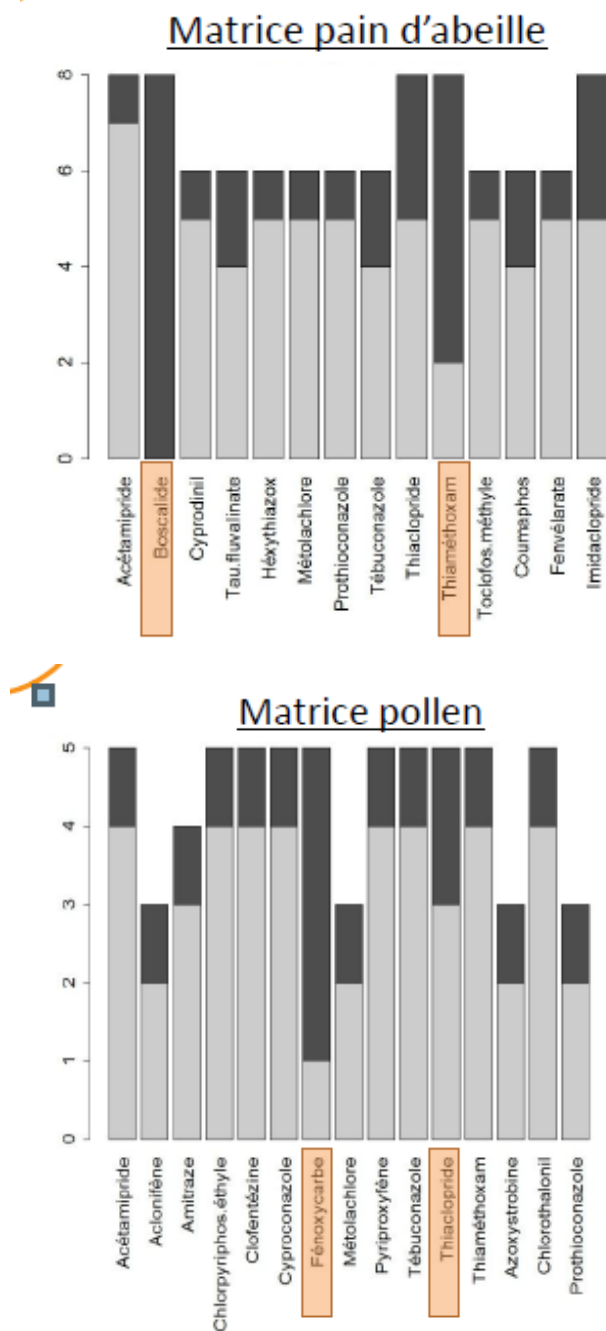


Figure 11 : Exemples de détection conjointe de produits phytosanitaires dans le pain d'abeilles et le pollen de 13 cas cliniques de troubles (étude ADARA).  
 En ordonnée, le nombre de ruchers où chaque résidu a été recherché  
 (gris foncé = détecté ; gris clair = non détecté)

L'étude ADARA est un recueil de cas cliniques signalés spontanément au réseau de surveillance des mortalités importantes, et investigués de façon plus approfondie dans la région Rhône-Alpes. Comme les résidus n'ont pas été recherchés de façon comparable, ni sur tous les ruchers, il n'est pas possible de quantifier les associations de pesticides observées. On notera ici une association fongicide - néonicotinoïde (boscalide + thiaméthoxam) dans six ruchers sur huit où la matrice pain d'abeilles a été analysée. Ces substances pourront être présentes dans la nourriture des ouvrières et celles des larves. Cette association fongicide - néonicotinoïde est susceptible de synergie par les mécanismes de détoxication (Johnson *et al.* 2013), d'autant plus que le thiaméthoxam est métabolisé en clothianidine.

#### 4.2.1.1.3 Cooccurrences de dangers biologiques et chimiques

La plupart des jeux de données examinés par le groupe de travail présentaient un défaut de standardisation pour la mesure conjointe des dangers biologiques et chimiques qui empêche d'en avoir une image quantitative fiable. Néanmoins, des observations ponctuelles présentent un intérêt d'étude de cas. Par exemple, le

**Tableau 15** reprend les observations conjointes de substances phytosanitaires et d'agents infectieux sur 4 ruchers en grande culture.

**Tableau 15 : Exemple de co-occurrences dans un même lieu, à une même date ou à des dates différentes, de résidus chimiques et d'agents infectieux, lors d'un suivi de 4 ruchers en zone de grande culture. Ici les résultats obtenus sur des abeilles mortes devant la ruche, en présence/absence (1/0), ou en quantité relative, pour jour donné sur un rucher (étude CETIOM/ITSAP)**

A, B, C et D sont les 4 ruchers suivis dans l'étude CETIOM-ITSAP

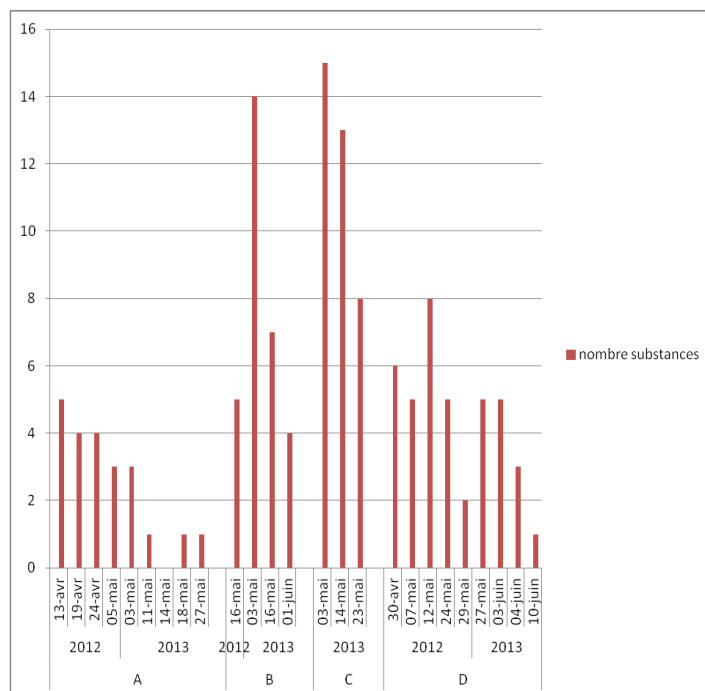
Site	Année	Date	azoxystrobine	boscalide	chlorpyrifos_ethyl	diphenylamine	metconazole	SBV	BQCV	CBPV	IAPV	CBPV_quantifi	Nosema sp.	Troubles
A	2012	19-avr	0	1	0	0	1	NA	NA	1	NA	3,99e+06	4,32e+06	1
A	2012	24-avr	0	1	0	0	1	1	1	1	NA	3,05e+11	1,70e+06	1
A	2013	11-mai	0	0	0	0	0	1	1	1	NA	55100	<1e+06	1
A	2013	27-mai	0	0	0	0	0	1	1	1	NA	2,29e+06	NA	1
B	2012	16-mai	1	0	0	1	0	1	1	1	NA	3,49e+12	NA	1
B	2013	31-mai	0	0	0	0	0	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1
C	2013	23-mai	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1,48e+06	0
D	2012	07-mai	0	1	1	0	1	1	1	1	1	5,88e+09	3,34e+06	1

Dans la même étude (suivi en fin de printemps 2012 et 2013 de 4 ruchers situés en zone de grande culture), les analyses toxicologiques sur le pollen entrant dans la ruche font état de 1 à 15 substances différentes pour un même échantillon à une date donnée, et entre 0 et 5 substances dans le miel nouveau (parmi 30 substances recherchées). A titre d'exemple, sur le pollen de trappe d'un site, le 3 mai 2013, les 15 substances suivantes ont été détectées : boscalide, chlorothalonil, chlorpyrifos-éthyl, cyproconazole, fluazifop P, flurochloridon, metholachlor S, pencycuron, pendiméthaline, phenmédiphame, prosulficarbe, desthioprothioconazole, imidaclopride, thiaclopride, thiaméthoxam.

Le détail des détections des 30 substances dans le pollen de ces 4 ruchers à différentes dates figure dans le **Tableau 16** à l'annexe 2.

La **Figure 12** montre le nombre de substances détectées à différentes dates d'une même année de suivi, pour chacun des 4 ruchers. Les substances sont à la fois diversifiées et détectées de façon répétée dans le temps.

Figure 12 : Nombre de substances détectées à différentes dates d'une même année de suivi, pour chacun des quatre ruchers (A, B, C et D sont les quatre ruchers suivis dans l'étude CETIOM-ITSAP)



Au bilan, la cooccurrence d'agents infectieux et de résidus chimiques semble être la règle, bien qu'elle ne soit pas décrite de façon satisfaisante quand les agents et substances recherchés ne sont pas comparables d'un rucher à l'autre, avec des méthodes standardisées et ayant une sensibilité toujours pertinente.

#### 4.2.1.2 Lien entre la présence d'agents infectieux et de résidus chimiques et l'état des colonies

##### 4.2.1.2.1 Bilan de l'examen des jeux de données

De nombreux critères d'état de la colonie sont recensés dans les jeux de données étudiés, avec un degré de détail dans le renseignement des variables très différent d'une étude à l'autre :

- étude Oniris : 13 critères mesurés (variables de force de la colonie en absence de symptômes) ;
- étude Epilobee France : définition de cas de mortalité ou suspicion de maladie infectieuse ;
- étude ADARA : 16 troubles des abeilles adultes, 11 troubles du couvain ;
- étude CETIOM/ITSAP-Institut de l'abeille : présence/absence de troubles, mortalité, gain de poids ;
- étude Cruiser : signes cliniques divers et variables de force de la colonie (remplissage de cadres) ;
- DGAL bilan des investigations du réseau des troubles des abeilles en 2013 : désignation de symptômes sur abeilles adultes et couvain, mortalité, colonies « fortes/moyennes/faibles ».

##### 4.2.1.2.2 Essai de quantification du lien entre présence/absence des dangers et variables d'état des colonies

Lorsque les données étaient suffisantes et comparables au sein d'un même jeu de données, des associations statistiques univariées ont pu être calculées entre la détection de dangers et la présence de troubles, ou les variables d'état des colonies. Il s'agissait ici de décrire les cooccurrences de dangers avec certaines variables d'état (études de cas, études de prévalence)

et pas d'une recherche de relation de cause à effet. En effet les conditions de représentativité n'étaient pas remplies.

Dans l'étude Oniris par exemple (variables de force des colonies en l'absence de troubles avérés), une corrélation a été observée entre la présence de CBPV, SBV, KBV et la présence d'abeilles mortes devant la ruche. Le carbendazime dans le pollen et le cyproconazole dans le miel étaient associés avec une activité accrue. Les résidus de coumaphos et d'amitrazé étaient associés à des réserves en pollen plus élevées (en tendance pour le coumaphos). Ces observations ne peuvent être interprétées au premier degré comme des mécanismes favorables ou défavorables au bon état des colonies. Il s'agit plutôt du reflet de la complexité du fonctionnement de la colonie, dans toutes ses composantes, y compris la gestion des traitements anti-*Varroa* par l'apiculteur.

Dans l'étude Cruiser, les données étaient suffisamment renseignées seulement pendant la floraison du maïs (alors que l'étude était aussi censée explorer l'influence éventuelle de l'exposition aux poussières de semences lors du semis, ainsi que des effets plus tard en saison). La caractérisation des variables d'état a été très disparate d'une région à l'autre.

Pendant la période de floraison du maïs (ressource pollinifère), les ruchers de la catégorie « surfaces importantes en Cruiser dans la zone de butinage rapprochée » présentaient un pourcentage inférieur de colonies fortes dans les ruchers. Cette corrélation n'était pas significative, mais devenait plus probable ( $p=0,08$ ) si l'interaction avec la contamination effective des matrices pollen et pain d'abeilles par le thiaméthoxam et la clothianidine était prise en considération. Ceci est à rapprocher avec l'observation d'une contamination par le thiaméthoxam et/ou la clothianidine de 50 % des colonies, qu'elles soient situées ou non dans une zone de butinage « Cruiser ».

Par ailleurs, il a été observé une liaison négative entre agressivité des ouvrières et détection de *Nosema* >  $10^6$  spores, entre agressivité et détection de CBPV et entre symptômes de maladies infectieuses sur le couvain et détection de *Nosema* >  $10^6$  spores.

Ces observations peuvent être interprétées en considérant plutôt l'agressivité comme un trait comportemental que comme un symptôme de maladie infectieuse ou d'intoxication. L'agressivité est liée génétiquement avec un comportement hygiénique et défensif de la ruche augmenté. Il se peut donc que les ouvrières plus agressives rejettent plus fréquemment les abeilles infectées et que la pression infectieuse diminue ainsi dans la ruche. A l'inverse, des abeilles moins agressives, ou paralysées, ou présentant des troubles de l'olfaction, peuvent laisser proliférer des infections par ailleurs peu pathogènes. Ici encore, les variables observées peuvent traduire des mécanismes sous-jacents plus complexes.

Dans cette étude, le degré d'infestation par *Varroa* et les taux de contamination par les acaricides d'usage apicole ne sont pas connus.

Au bilan, le faible nombre d'observations comparables et les biais de sélection rendent ces résultats difficiles à interpréter, même au sein d'une même étude. Une diversité de dangers en relation avec des troubles sont mis en évidence, mais la réalité de la cooccurrence de dangers décrite plus haut conduit de toute façon à s'interroger sur l'utilité d'analyser les dangers un par un.

#### 4.2.1.3 Conclusions et recommandations

##### 4.2.1.3.1 Conclusions

L'analyse approfondie des observations fournies au GT révèle une très grande diversité de présence des dangers biologiques et chimiques dans les ruchers, bien que la plupart des jeux de données souffrent d'un manque de standardisation des mesures de détection, d'effectifs faibles et d'un grand nombre de données manquantes. Dans la partie 3.2, il a été montré que la variation quantitative au cours d'une saison apicole est forte.

Dans la plupart des jeux de données, il y a trois faiblesses majeures dans la démarche de comparaison des troubles avec la présence de dangers :

- l'absence de prise en compte des dynamiques saisonnières dans l'analyse,

- la confusion des échelles rucher et colonie, alors qu'il y a à la fois des facteurs de risque communs et une grande variabilité des détections au sein d'un même rucher,
- un *a priori* sur la causalité monofactorielle des troubles et le caractère immédiat attendu des troubles observables, ce qui conduit à privilégier la recherche de tel ou tel danger, sans s'interroger sur les interactions entre ceux-ci et les délais nécessaires à l'apparition de troubles.

#### 4.2.1.3.2 Recommandations

Dans la structure des données, la date précise et le lieu de prélèvement devront être renseignés d'une façon standardisée, afin de pouvoir regrouper les observations par lieu, par date ou par saison et de calculer aisément des bilans et des séries temporelles.

L'échelle colonie et l'échelle rucher devront être distinctes mais l'information sur le rucher d'appartenance de chaque colonie doit être connue. Le nombre de ruchers et de colonies suivis devra être suffisant pour estimer précisément les fréquences d'infection ou de contamination. En effet, plus les effectifs sont faibles, plus la marge d'incertitude est grande.

De plus, il est nécessaire de tenir compte des facteurs confondants, pratiques apicoles (notamment l'historique du parcours des colonies), climat, données météorologiques de température, pluie et vent dans les 15 jours précédant le prélèvement, contexte de paysage et usages agricoles, densité locale de ruchers.

Plutôt que des dangers deux à deux, ce sont des profils d'agents et de substances détectés qui devraient être comparés d'une situation à l'autre, par exemple par des méthodes de classification hiérarchique ascendante. Il serait ainsi possible d'identifier des associations ou des cumuls de facteurs qui aient un sens, d'un point de vue des mécanismes biologiques sous-jacents. Par exemple, la co-exposition à plusieurs substances d'une même classe (inhibiteurs du complexe cytochrome P450 par exemple) est fréquente, et influe sur le degré de toxicité d'autres substances susceptibles d'être présentes également. Pour pouvoir tirer des conclusions statistiques en présence de multiples facteurs, il est nécessaire d'étudier un grand nombre d'échantillons. Plus le nombre de variables étudiées est important, plus la taille de l'échantillon doit être élevée, ce qui impose des choix méthodologiques *a priori*, en fonction de la question posée.

Une meilleure standardisation de mesure de l'état des colonies est nécessaire, incluant le renseignement de variables d'état dans les colonies asymptomatiques et le niveau de formation et d'information des vétérinaires cliniciens et des techniciens sanitaires apicoles (information peu disponible dans les protocoles en général). L'élaboration d'un atlas illustré de pathologie clinique et diagnostique des abeilles contribuerait à la formation des vétérinaires et des techniciens sanitaires apicoles, et ainsi à la standardisation de ces mesures.

Pour le diagnostic de troubles aigus, il est nécessaire de mettre en œuvre des méthodes quantitatives sensibles multi-agents infectieux, quels que soient les symptômes observés, et de les associer avec la détection d'une batterie de résidus chimiques correspondant aux usages agricoles du secteur et de la saison. La présence de médicaments vétérinaires, y compris les antibiotiques (OTC, certains macrolides, *etc.*), et produits homologués susceptibles d'aboutir dans l'environnement devra également être recherchée.

## 4.3 Conclusions / recommandations

### • Bilan des mécanismes d'action suspectés ou démontrés entre facteurs de stress

Les hypothèses de travail qui découlent de la revue bibliographique sur les interactions sont listées ci-dessous (liste non-exhaustive). Ces différents mécanismes peuvent agir simultanément. Leurs effets dépendent de la saison. Ils peuvent être seulement observables après un temps de latence. Les pratiques apicoles peuvent les compenser ou les amplifier.

- ✓ *Varroa* agit comme immunodépresseur, par la spoliation des abeilles parasitées en protéines et par des facteurs biochimiques propres visant à son maintien sur l'abeille. L'acarien a donc un potentiel d'amplification des infections en général, même celles qui ne sont pas transmises par l'acarien (cf. paragraphe 3.1.1.2.4.1.).
- ✓ *Varroa* agit comme amplificateur de l'infection par certains virus qu'il transmet par l'hémolymphe : DWV, les virus du complexe AKI et SBV. DWV est plus fortement amplifié par *Varroa*, car l'acarien est également un hôte multiplicateur du DWV (cf. paragraphes 3.1.1.2.2.1. et 3.1.1.2.2.5.).
- ✓ Plusieurs agents infectieux peuvent interagir sur les mêmes cibles fonctionnelles, par exemple le système nerveux de l'adulte, le tube digestif de la larve et de l'adulte, la fonction de reproduction de la reine.
- ✓ Tous les facteurs qui agissent sur l'olfaction, les phéromones et le niveau d'activité peuvent avoir un effet sur la cohésion de la colonie et le comportement hygiénique des ouvrières (élimination des individus malades ou morts), et donc sur les risques infectieux et le parasitisme par *Varroa*. C'est notamment le cas des virus à tropisme nerveux (ex. CBPV) (cf. paragraphe 4.1.1.1.2.2.).
- ✓ Certaines substances, par exemple les néonicotinoïdes et certains acaricides, agissent également sur l'olfaction, les phéromones et le niveau d'activité. Elles peuvent donc avoir un effet indirect sur l'amplification des infections ou du parasitisme (cf. paragraphe 3.1.2.2.).
- ✓ Certaines substances ont des effets immunodépresseurs sur l'abeille, et contribuent également dans l'absolu à l'amplification des infections et parasites (cf. paragraphe 3.1.2.2.).
- ✓ La phénologie saisonnière des végétaux et les conditions météorologiques influencent conjointement le niveau trophique de la colonie (ressources disponibles, conditions météorologiques favorables au butinage). En particulier, des carences protéiques ponctuelles peuvent être à l'origine d'une immunodépression passagère. Des conditions météo défavorables influencent également les vols de propreté des ouvrières, et donc la quantité d'agents infectieux dans la ruche. La colonie fait face à ces fluctuations grâce à ses réserves. L'historique de butinage a donc une importance, tout comme le prélèvement de réserves par l'apiculteur (cf. paragraphe 3.1.3.).
- ✓ Le niveau d'infection de la colonie à l'entrée de l'hiver dépend de l'interaction entre l'ensemble de ces facteurs pendant la période de butinage.
- ✓ Certaines substances chimiques (pyréthrinoïdes, néonicotinoïdes, etc.) ont un impact sur le comportement de butinage, la mémorisation des ressources et le retour à la ruche. Elles ont donc une influence sur le niveau trophique de la ruche. La perte d'abeilles butineuses peut être compensée par d'autres abeilles ouvrières, aux dépens du bon fonctionnement de la colonie (hygiène, réserves) (cf. paragraphe 4.1.3.).
- ✓ Plusieurs substances (insecticides, acaricides, fongicides, etc.) peuvent avoir des effets sur la même cible fonctionnelle chez les abeilles, par exemple le système nerveux ou le tube digestif. Leur impact peut se cumuler et s'ajouter à celui des agents infectieux ayant la même cible (cf. paragraphe 3.1.2.).
- ✓ Plusieurs substances peuvent perturber les mécanismes de détoxication, ce qui peut modifier la sensibilité des abeilles à d'autres substances (cf. paragraphe 4.1.1.2.).
- ✓ Les carences nutritionnelles, notamment protéiques, peuvent également avoir un effet dépresseur sur la fonction de détoxication.

**• Recommandations sur la surveillance des agents infectieux et des agents chimiques**

- ✓ Les agents infectieux et chimiques, y compris les acaricides dans les cires, doivent être recherchés de manière concomitante, lors de surveillance active comme lors d'apparition de troubles dans les colonies.
- ✓ Ces dangers devraient être surveillés de façon comparable pour une même étude et entre études. Dans le cadre de la surveillance programmée, il est pertinent d'utiliser des méthodes validées selon les normes en vigueur (AFNOR, ISO, OIE) et, si possible, harmonisées (ce qui permet la bonne comparaison des résultats), avec une sensibilité suffisante en fonction des objectifs visés.
- ✓ La surveillance active programmée des agents infectieux devra être faite par des méthodes quantitatives ciblant plusieurs agents, qu'il y ait ou non des signes cliniques. Elle devra toujours être faite conjointement avec une quantification du degré d'infestation par *Varroa*, qui conditionne fortement la dynamique des infections qu'elle transmet, mais aussi l'état immunitaire des abeilles.
- ✓ La surveillance des agents infectieux devra permettre de fournir des données, qualitatives et quantitatives, sur le portage asymptomatique dans les colonies, données insuffisantes à l'heure actuelle.
- ✓ La surveillance des facteurs toxiques devra être principalement ciblée sur les substances appliquées dans les territoires concernés, par exemple au vu des quantités utilisées. Cependant ces quantités ne reflètent pas le niveau de risque toxique, qui dépend de chaque substance, association de substances ou formulation. Les méthodes multi-résidus seront préférables, pour autant que leur sensibilité soit suffisante pour l'objectif visé. Pour les pesticides très toxiques (toxicité aiguë, chronique et effets sublétaux), des analyses mono-résidu (substance active et ses métabolites toxiques chez l'abeille) seront indispensables.
- ✓ Pour la surveillance de problèmes émergents et pour la toxicovigilance des produits vétérinaires et phytosanitaires (évaluation ex-post), il est également en premier lieu nécessaire de standardiser et centraliser les observations de troubles et de standardiser les méthodes d'analyse multi-dangers mises en œuvre.

**• Recommandations sur les futures études et recueils de données visant à répondre à la question des interactions en situation naturelle**

Les conditions de validité statistique pour les études épidémiologiques en apiculture ont récemment fait l'objet d'une revue complète (vanEngelsdorp *et al.* 2013a) en distinguant études descriptives (constat) et explicatives (lien causal).

L'épidémiosurveillance, à visée descriptive, nécessite une standardisation du recueil des données, indispensable pour permettre l'analyse des données. Cette standardisation implique notamment une coordination centrale assurant le respect des protocoles, la formation des enquêteurs, la remontée d'information, la redescende d'information, le traitement statistique pertinent, basé sur des effectifs suffisants. Il existe des règles d'échantillonnage qui permettent d'atteindre la précision souhaitée en fonction de la question posée. Sur ces critères, les dispositifs de surveillance actuels sont insuffisants ; la réflexion engagée pour l'observatoire des mortalités et des alertes devrait aller dans le sens de ces recommandations. Des observatoires régionaux sont en place dont le but est d'avoir des ruchers qui servent de référence aussi bien pour la production habituelle que pour l'exposition régulière aux facteurs de risques propres à la région.

Au vu de la multiplicité des expositions concomitantes, les études visant à identifier des facteurs de risque doivent recourir à des méthodes permettant de comparer des profils d'exposition aux facteurs de risque (en diversité et en quantité), entre unités épidémiologiques (cas et témoins) et leur éventuelle répétition dans le temps. Même pour des études plus particulièrement axées sur des maladies infectieuses ou des intoxications, il est nécessaire de mesurer les autres facteurs, qui sont susceptibles d'influencer de façon majeure les conséquences pathologiques. Les pratiques apicoles doivent être prises en compte dans les facteurs influençant la santé de la colonie. Les variables d'état des colonies mesurées doivent intégrer la disponibilité de réserves et la structure



démographique à l'intérieur de la colonie, la taille de la population, etc. L'échantillonnage doit prendre en compte la structuration en ruchers (par exemple un échantillonnage en grappe pour des études de cohorte). Il est très important de conserver l'information du lien entre l'échelle de la colonie et celle du rucher, et de faire les traitements statistiques en tenant compte de cette structuration. Il faut également tenir compte des facteurs saisonniers et géographiques, qui conditionnent fortement la biologie de la colonie.

Les phénomènes décrits par les protocoles d'épidémiosurveillance peuvent être explorés de façon plus détaillée par des études épidémiologiques à visée explicative. Dans ce cas, le protocole d'enquête doit être conçu pour permettre une comparaison des cas avec une population de référence (témoin ou population non-exposée). Compte tenu de la complexité des phénomènes impliqués dans les troubles des abeilles, la plus grande rigueur est indispensable pour l'élaboration comme pour la réalisation des protocoles d'enquête épidémiologique, de façon à assurer la qualité et la comparabilité des données, ainsi que leur collecte effective. Les protocoles existants souffrent de trop nombreuses données manquantes, ou non comparables entre elles.

## 5 Question de la prise en compte des interactions dans l'évaluation des risques liés aux produits phytopharmaceutiques

L'objectif de ce chapitre est de voir si l'élaboration de méthodes prenant en compte, dans l'évaluation des produits phytopharmaceutiques, les interactions éventuelles entre agents infectieux et facteurs toxiques serait pertinente et réalisable, notamment de manière standardisée.

### 5.1 Rappels sur l'évaluation réglementaire des produits phytopharmaceutiques

Dans cette saisine, la question des évolutions en matière d'évaluation réglementaire a été *a priori* circonscrite aux produits phytopharmaceutiques. Il convient toutefois de noter que les substances pesticides retrouvées dans les matrices de la ruche peuvent aussi provenir de l'emploi de produits biocides (exemple : insecticide pour la lutte anti-vectorielle) ou de produits antiparasitaires (exemple : produits de traitement contre *Varroa destructor* ou plus généralement produits antiparasitaires vétérinaires destinés à d'autres espèces animales). Dans le présent paragraphe, les réglementations concernant les produits biocides et antiparasitaires et en particulier leurs exigences relatives à l'évaluation des dangers et des risques pour les abeilles ne seront pas présentées.

Les produits phytopharmaceutiques sont utilisés par les professionnels et les particuliers pour détruire, repousser ou rendre inoffensifs les organismes nuisibles. L'Anses est chargée d'évaluer ces produits, ainsi que les fertilisants et supports de culture, avant leur mise sur le marché par les autorités sanitaires.

Cette évaluation se décompose en deux étapes :

1. La première étape, réalisée au niveau européen, porte sur l'évaluation des dangers et des risques liés aux substances actives entrant dans la composition des produits phytopharmaceutiques. Cette phase est coordonnée au niveau européen par l'Autorité Européenne de Sécurité Alimentaire (EFSA) qui s'appuie sur l'évaluation collective réalisée par les Etats membres (l'Anses pour la France) ;

2. La seconde étape, réalisée au niveau des Etats-membres, consiste à évaluer les intérêts et les risques liés aux préparations commerciales.

L'approbation des substances actives et la mise sur le marché de produits phytosanitaires sont assorties d'une durée légale à l'issue de laquelle un renouvellement est requis. Ce renouvellement fait l'objet d'un nouveau dossier répondant aux exigences en vigueur les plus récentes.

Les produits phytopharmaceutiques sont des préparations destinées à protéger les végétaux et les produits de culture. Régie depuis 1993 par la directive européenne 91/414/CEE, l'évaluation des produits et substances phytopharmaceutiques a évolué en juin 2011 avec l'entrée en vigueur du règlement (CE) n° 1107/2009<sup>43</sup>. Ce règlement fait partie, d'un ensemble de textes législatifs, appelé « Paquet pesticide » adopté en octobre 2009.

Ce cadre réglementaire définit les données nécessaires pour évaluer les dangers et les risques des substances actives, de leurs produits de dégradation et des produits phytopharmaceutiques dans les conditions d'utilisation conformes aux principes des bonnes pratiques agricoles. Cette

<sup>43</sup> <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:309:0001:0050:FR:PDF>

évaluation inclut des recommandations d'emploi visant à maîtriser les risques identifiés à un niveau acceptable dont les critères sont définis dans le règlement (UE) n° 546/2011<sup>44</sup>

Pour évaluer les dangers et les risques pour les abeilles, les données exigibles sont définies dans les règlements d'exécution (UE) n° 283/2013<sup>45</sup> pour les substances actives et (UE) n° 284/2013<sup>46</sup> pour les produits phytopharmaceutiques, ainsi que de communications de la Commission dans le cadre de la mise en œuvre de ces règlements d'exécution<sup>47</sup>.

Sauf lorsque les produits phytopharmaceutiques contenant la (ou les) substance(s) active(s) sont exclusivement destinés à être utilisés dans des situations où l'exposition des abeilles est improbable<sup>48</sup>, les rapports des essais suivant doivent être transmis pour les substances actives<sup>49</sup> et les préparations :

- essai de toxicité orale aiguë ;
- essai de toxicité par contact ;
- essai de toxicité chronique ;
- essai sur les effets sur le développement des abeilles mellifères et sur les autres phases de la vie des abeilles mellifères.

Les deux derniers essais sont exigibles à partir du 1<sup>er</sup> janvier 2014 pour les nouvelles substances actives et les substances actives en renouvellement d'approbation et à partir du 1<sup>er</sup> janvier 2016 pour les produits contenant au moins une substance active approuvée avec les nouvelles exigences.

Des essais peuvent être requis pour analyser les effets sublétaux, tels les effets sur le comportement et la reproduction, chez les abeilles et, le cas échéant, chez les colonies.

Lorsque des effets aigus ou chroniques sur la survie et le développement des colonies ne peuvent être écartés, des essais supplémentaires sont requis (essais en cage ou en tunnel, essais au champ avec des abeilles mellifères). Ces essais sont conduits en exposant des colonies aux cultures traitées avec des préparations commerciales.

Les méthodes d'essai et les documents-guides sont décrits dans les communications 2013/C 95/01<sup>50</sup> et 2013/C 95/02<sup>51</sup> de la Commission :

Effets sur les abeilles	Documents-Guide
	EU Guidance Document on Terrestrial Ecotoxicology (SANCO/10329/2002 rev 2
	EPPO Standard PP 3/10 (3) Environmental risk assessment scheme for plant protection products. Chapter 10: honeybees.
Effets sublétaux	OECD Guidance Document 75 on the honeybee ( <i>Apis mellifera</i> L) brood test under semi-field conditions
	<b>Méthodes d'essai</b>
Toxicité orale aiguë	EPPO Standard PP1/170 (4): Test methods for evaluating the side- effects of plant protection products on honeybees. OECD Test Guideline 213: Honeybees, Acute Oral Toxicity Test OECD test Guideline 237: Honeybees larvae, Acute Oral Toxicity Test
Toxicité aiguë par contact	EPPO Standard PP1/170 (4): Test methods for evaluating the side- effects of plant protection products on honeybees. OECD Test Guideline 214: Honeybees, Acute Contact Toxicity Test
Toxicité chronique pour les abeilles	Aupinel <i>et al.</i> (2007): A new larval in vitro rearing method to test effects of pesticides on honey bee brood. <i>Redia</i> <b>XC</b> : 87-90 Oomen PA, de Ruijter A and van der Steen J, 1992. Method for honeybee brood feeding tests with

<sup>44</sup> <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:155:0127:0175:FR:PDF>

<sup>45</sup> <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2013:093:0001:0084:FR:PDF>

<sup>46</sup> <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2013:093:0085:0152:FR:PDF>

<sup>47</sup> <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/PDF/?uri=OJ:C:2013:095:FULL&from=EN>

<sup>48</sup> à savoir: a) l'entreposage des denrées alimentaires en espace clos; b) les préparations non systémiques à appliquer au sol, à l'exception des granulés; c) les traitements non systémiques par trempage des plants et bulbes repiqués; d) les traitements de cicatrization; e) les appâts rodenticides non systémiques; f) l'utilisation sous serre sans abeilles en tant que pollinisateurs.

<sup>49</sup> Les essais conduits au laboratoire peuvent être requis pour des métabolites de la substance active.

<sup>50</sup> [http://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/PDF/?uri=CELEX:52013XC0403\(02\)&from=FR](http://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/PDF/?uri=CELEX:52013XC0403(02)&from=FR)

<sup>51</sup> <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:C:2013:095:0021:0037:EN:PDF>

	insect growth - regulating insecticides. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 22, 613-616.
Effets sur le développement des abeilles mellifères et sur les autres stades de la vie des abeilles mellifères	Aupinel <i>et al.</i> (2007): A new larval in vitro rearing method to test effects of pesticides on honey bee brood. <i>Redia</i> <b>XC</b> : 87-90
Effets sublétaux	Oomen PA, de Ruijter A and van der Steen J, 1992. Method for honeybee brood feeding tests with insect growth - regulating insecticides. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 22, 613-616.
Tests en cages et sous tunnel	EPPO Standard PP1/170 (4): Test methods for evaluating the side-effects of plant protection products on honeybees.
Tests en plein champ avec des abeilles	EPPO Standard PP1/170 (4): Test methods for evaluating the side-effects of plant protection products on honeybees

L'EFSA a publié en 2013 un nouveau document-guide pour évaluer les dangers et les risques pour les abeilles domestiques, les bourdons et abeilles solitaires (EFSA 2013d). Toutefois, ce document n'est pas pris en note par le SCoFCAH<sup>52</sup> et n'est donc pas applicable à ce jour (février 2015).

En France, deux arrêtés concernant les abeilles sont en vigueur. Ces arrêtés visent à imposer des pratiques en vue de mieux protéger les abeilles indépendamment d'une évaluation dédiée des dangers, de l'exposition et des risques :

- **l'arrêté du 28 novembre 2003** relatif aux conditions d'utilisation des insecticides et acaricides à usage agricole en vue de protéger les abeilles et autres insectes pollinisateurs<sup>53</sup>. L'article 2 de cet arrêté prévoit qu'« *en vue de protéger les abeilles et autres insectes pollinisateurs, les traitements réalisés au moyen d'insecticides et d'acaricides sont interdits durant toute la période de floraison, et pendant la période de production d'exsudats, quels que soient les produits et l'appareil applicateur utilisés, sur tous les peuplements forestiers et toutes les cultures visitées par ces insectes* ».

L'article 3 de l'arrêté du 28 novembre 2003 prévoit que « *Lorsque des plantes en fleurs ou en période de production d'exsudats se trouvent sous les arbres ou à l'intérieur d'une zone agricole utile destinée à être traitée par des insecticides ou des acaricides, leurs parties aériennes doivent être détruites ou rendues non attractives pour les abeilles avant le traitement.* »

L'article 4 prévoit que : « *Par dérogation aux dispositions des articles 2 et 3, seuls peuvent être utilisés durant la ou les périodes concernées mentionnées à l'article 2, les insecticides et les acaricides dont l'autorisation de mise sur le marché /.../ porte l'une des mentions suivantes :*

- ✓ « *Emploi autorisé durant la floraison, en dehors de la présence des abeilles* » ;
- ✓ « *Emploi autorisé au cours des périodes de production d'exsudats, en dehors de la présence des abeilles* » ;
- ✓ « *Emploi autorisé durant la floraison et au cours des périodes de production d'exsudats, en dehors de la présence des abeilles* ».

La dérogation est attribuée à un produit pour un (ou des) usage(s) et pour des conditions d'emploi définies sous réserve que les risques évalués pour les abeilles et les colonies d'abeilles soient considérés comme acceptables au sens du règlement (CE) n°546/2011.

L'attribution d'une dérogation fait l'objet d'un examen par l'Anses d'un dossier de demande de dérogation déposé par le pétitionnaire<sup>54</sup>.

<sup>52</sup> Standing Committee on the Food Chain and Animal Health

<sup>53</sup>[http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do;jsessionid=F3CC9A3EF5D13E4268BBD926781D31BA.tpdjo08v\\_3?cidTexte=JORFTEXT000000799453&dateTexte=20140912](http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do;jsessionid=F3CC9A3EF5D13E4268BBD926781D31BA.tpdjo08v_3?cidTexte=JORFTEXT000000799453&dateTexte=20140912)

<sup>54</sup> Demande motivée par une marque dans la case appropriée (49A) du document administratif Cerfa n° 11906\*02 qui peut être réalisée en même temps qu'une demande d'AMM ou bien après l'obtention d'une AMM.

Le renouvellement des dérogations est nécessaire lors du renouvellement décennal de l'autorisation de mise sur le marché du produit ou du réexamen suite à l'approbation (ou ré approbation) au sens du règlement (CE) n°1107/2009 d'une substance active qu'il contient.

Un projet de révision de l'arrêté du 28 novembre 2003 a été présenté à la consultation publique en décembre 2014<sup>55</sup>. Ce projet d'arrêté découle du plan de développement durable de l'apiculture (Pdda) de février 2013 qui prévoit de modifier l'arrêté du 28 novembre 2003 (action 2 du plan, point 2.3) afin de préciser les heures de traitements réalisés au moyen d'insecticides et d'acaricides, pour éviter tout risque pour les abeilles et déterminer, après expertise, les mesures à la fois pertinentes pour la protection des abeilles et applicables par les agriculteurs.

- ***l'arrêté du 7 avril 2010*** relatif à l'utilisation des mélanges extemporanés de produits visés à l'article L. 253-1 du Code rural<sup>56</sup>. L'article 8 de cet arrêté prévoit que « *durant la floraison ou au cours des périodes de production d'exsudats, au sens de l'article 1er de l'arrêté du 28 novembre 2003 susvisé, un délai de vingt-quatre heures doit être respecté entre l'application d'un produit contenant une substance active appartenant à la famille chimique des pyréthrinoïdes et l'application d'un produit contenant une substance active appartenant aux familles chimiques des triazoles ou des imidazoles. Dans ce cas, le produit de la famille des pyréthrinoïdes est obligatoirement appliqué en premier.* »

## 5.2 Pertinence de la prise en compte des interactions dans l'évaluation des produits phytopharmaceutiques

Les scientifiques n'ont pas identifié un stress capable d'expliquer à lui seul toutes les mortalités d'abeilles dans le monde, et n'adhèrent pas à l'hypothèse d'une cause unique ou universelle. Au contraire, ils pensent que la conjugaison de plusieurs stress peut expliquer un certain nombre de cas, bien que, dans d'autres cas, un seul stress puisse être à l'origine de mortalités (*Varroa*, pesticide...). La littérature scientifique identifie principalement trois types de facteurs de stress : les parasites (par exemple *Varroa*), les agents infectieux (par exemple des virus) et les pesticides (par exemple les insecticides).

Actuellement, il n'existe pas de méthode prenant en compte les interactions lors de l'évaluation des PPP pour les abeilles. Même si la réglementation, qui relève de l'Union européenne, a évolué, les interactions ne sont pas prises en compte. Cette réglementation vise surtout à améliorer l'évaluation en exposition simple (ex : prise en compte des effets sublétaux, des effets chroniques). L'homologation des produits fait l'objet d'un processus de reconnaissance mutuelle des Etats membres, la tendance actuelle évoluant vers une restriction du nombre de PPP.

Or les abeilles (larves, nymphes et adultes) sont exposées en permanence à de nombreux facteurs biologiques dont l'impact sur la santé des colonies a été démontré. Elles sont aussi exposées à de nombreux PPP et/ou à leurs métabolites toxiques présents dans les matrices apicoles et l'environnement des colonies. De plus en plus, la notion d'effets-cocktails (action de plusieurs stress, auxquels les abeilles sont exposées au même moment, sur leur santé) est évoquée puisqu'elle correspond à la réalité objective de la situation en plein champ. L'impact de l'exposition multiple aux xénobiotiques devient de plus en plus argumenté alors que les études disponibles sur les mélanges montrent les effets négatifs de combinaisons de ces facteurs de stress sur l'abeille. Il est donc pertinent de prendre en compte les principales interactions pour évaluer les PPP, comme cela avait été décrit dans l'avis de l'Anses 2011-SA-0233 (Anses 2012a). Il faudrait évidemment savoir lesquelles privilégier.

Pour les PPP, il est impossible de réglementer toutes les interactions possibles. Mais lorsqu'un accident de terrain lié à une co-exposition se produit, l'information peut remonter et déboucher, le cas échéant, sur des mesures de gestion concernant la pratique à l'origine de cet accident. Il

<sup>55</sup> <http://agriculture.gouv.fr/Consultation-publique-protection-abeilles>

<sup>56</sup> [http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do;jsessionid=F3CC9A3EF5D13E4268BBD926781D31BA.tpdjo08v\\_3?cidTexte=JORFTEXT000022098258&dateTexte=20140912](http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do;jsessionid=F3CC9A3EF5D13E4268BBD926781D31BA.tpdjo08v_3?cidTexte=JORFTEXT000022098258&dateTexte=20140912)

conviendra donc de distinguer la phase d'autorisation du produit et la phase post-AMM, relevant de la phytopharmacovigilance. Il peut aussi être pertinent d'évaluer les PPP *a priori* dans certains cas bien identifiés (exemple d'interactions connues entre familles de pesticides) et suivant la mise sur le marché, ce qui soulignerait l'importance du protocole de suivi post-AMM.

Enfin, pour tester des interactions, il peut être pertinent d'utiliser des tests existants et d'y ajouter un ou plusieurs facteurs de stress parmi les plus courants (parasitisme moyen, présence d'agents infectieux). Des tests existent pour étudier les interactions entre facteurs chimiques ; les tests sont moins formalisés pour les interactions pathogène-pesticide.

La recherche appliquée peut apporter des méthodes tandis que la recherche fondamentale peut décoder les mécanismes mis en jeu.

## 5.3 Choix d'interactions à prendre en compte

La probabilité que deux molécules se rencontrent dans une colonie est liée à leur usage et leur accumulation dans la ruche. Il existe des mélanges plus fréquemment rencontrés. Pour les agents infectieux, la présence de certains d'entre eux est plus fréquente. Les interactions pesticides-pesticides sont importantes, néanmoins il semble pertinent de prendre également en compte les agents infectieux (*Nosema*, DWV par exemple).

### 5.3.1 Interactions pesticides-pesticides

Les données recensées dans ce rapport prouvent, d'une part, que les abeilles sont couramment exposées à plusieurs molécules et, d'autre part, que la dangerosité d'une molécule peut être augmentée en présence d'une seconde. Elles posent avant tout la question des méthodes d'évaluation des molécules potentiellement toxiques que sont les pesticides. L'évaluation de la toxicité d'un pesticide chez l'abeille avant sa mise sur le marché n'intègre pas à ce jour de modalité expérimentale testant l'impact d'une co-exposition avec un autre pesticide. Or, le groupe de travail recommande que la procédure d'évaluation de la toxicité d'un pesticide réalisée préalablement à sa mise sur le marché intègre des tests pour mesurer l'effet d'une co-exposition chimique. Lors de tests en laboratoire, par exemple les ouvrières adultes seraient exposées simultanément par voie orale ou topique à deux molécules (dont l'une est à tester) de façon chronique (ex : 10 jours). Pour détecter un éventuel effet de potentialisation, de synergie, voire d'antagonisme, les deux molécules devront également être testées séparément. Trois modalités de co-exposition sont à envisager, l'une utilisant une molécule acaricide couramment employée par les apiculteurs pour lutter contre *Varroa*, l'autre utilisant une molécule fongicide homologuée et connue pour inhiber les mécanismes de détoxification des pesticides chez l'abeille (par exemple, un fongicide de la famille des imidazoles ou des EBI, *Ergosterol Biosynthesis Inhibitors*). Il est en effet reconnu qu'une exposition à un acaricide (Ellis *et al.* 1997; Johnson *et al.* 2009) ou à un fongicide de la famille des imidazoles ou des EBI (Colin et Belzunces 1992; Iwasa *et al.* 2004; Pilling *et al.* 1995; Pilling et Jepson 1993; Schmuck *et al.* 2003a; Vandame et Belzunces 1998) peut aggraver l'effet toxique d'un pesticide. Enfin, une troisième modalité concerne les pesticides en interaction avec un insecticide, particulièrement si le pesticide proposé est un insecticide d'une famille déjà souvent présente dans les matrices apicoles. Par exemple, il peut s'agir d'un néonicotinoïde nouveau, étudié en interaction avec un néonicotinoïde déjà régulièrement détecté dans les matrices apicoles et présent sur le marché national (imidaclopride, thiaclopride, *etc*). Il peut également s'agir d'un insecticide d'une famille nouvelle, étudié en interaction avec un insecticide parmi les plus utilisés et/ou les plus toxiques (thiaméthoxam, lambda-cyhalothrine, deltaméthrine, par exemple). Des tests en conditions semi-naturelles ou naturelles associant une exposition des abeilles à la molécule étudiée et à une autre molécule acaricide (colonies traitées ou non contre *Varroa*) ou fongicide (parcelle traitée ou non avec un fongicide) ou encore insecticide (environnement traité ou non avec une famille d'insecticide), seraient pertinents. Ces nouvelles méthodes devront faire l'objet de l'élaboration de lignes directrices standardisées nécessitant la réalisation de tests circulaires inter laboratoires.

En termes de recherche, les futurs travaux sur les risques écotoxicologiques liés aux expositions multiples aux pesticides devront contribuer à :

- concevoir des outils opérationnels d'assimilation des données sur l'exposition, qui sont aujourd'hui nombreuses mais dispersées ;
- mieux comprendre le rôle de l'exposition des colonies d'abeilles à plusieurs pesticides dans les phénomènes de surmortalité, d'affaiblissement et de baisse de production ;
- évaluer les effets des mélanges de substances, notamment à long terme ;
- développer des méthodes d'évaluation du risque en considérant la co-exposition aux pesticides, notamment à faibles doses, ainsi que les effets en cascade à l'échelle de la population.

### 5.3.2 Interactions agents biologiques – pesticides

Il existe de plus en plus d'évidences de co-expositions entre agents infectieux et pesticides dans les ruches, ce qui apparaît même comme une normalité. Cependant, encore peu d'informations sont disponibles sur les co-expositions représentant un danger potentiel pour les colonies. Certaines de ces co-expositions ont ainsi commencé à être analysées en laboratoire et ont permis de mettre en évidence des phénomènes allant d'un simple effet additif à des effets synergétiques. Toutefois, face à la multitude des co-expositions, venant principalement de la grande diversité de pesticides pouvant être rencontrées dans l'environnement, il est important d'établir une hiérarchie au niveau de leur prévalence. Il deviendra alors pertinent de caractériser les effets des co-expositions les plus fréquentes et d'accumuler des connaissances sur les mécanismes d'interactions.

Dans un premier temps, il s'agira de déterminer en laboratoire les effets de ces co-expositions sur la mortalité des abeilles, si possible en fonction de la caste et de l'âge des individus. Seules les co-expositions aboutissant à des effets interactifs devront être retenues pour décrire dans un deuxième temps leurs mécanismes d'interactions et éprouver les effets sur le terrain (au niveau de la ruche). Ceci concerne ainsi les co-expositions induisant des synergies, potentialisations ou antagonismes au niveau de la mortalité des abeilles. Celles se traduisant par de simples effets additifs ne pourront pas être considérées comme interagissant.

Au-delà de leurs interactions avec les agents infectieux, les pesticides peuvent augmenter leur prévalence au sein de la colonie (ex. virus des ailes déformées et *Nosema ceranae*). Ces amplifications des charges en agents infectieux peuvent ainsi aboutir à de nouvelles interactions pesticides / agents infectieux comme décrit préalablement. Il s'agit donc d'un phénomène qui mérite d'être étudié plus en détails, plus particulièrement en ciblant les différentes classes de pesticides (ex. néonicotinoïdes, Di Prisco *et al.* (2013)) et leur impact sur les agents infectieux. Encore une fois, les études épidémiologiques apporteront des indices sur l'identité des pesticides ayant tendance à modifier la prévalence de certains agents infectieux.

L'accumulation de données de laboratoire et de terrain sur les co-expositions agents infectieux/pesticides permettra d'alimenter le développement de modèles mathématiques visant à prédire le développement et la survie des colonies en présence de stress. De plus, ce type de modèle présente un intérêt pour déterminer l'issue de ces interactions dans différents contextes paysagers (ressources alimentaires), populationnels (taille des colonies) et climatiques.

Enfin dans le cadre de l'homologation de produits phytopharmaceutiques (PPP), il serait pertinent de réaliser des tests en laboratoire en coexposant le PPP avec des agents infectieux ayant une forte prévalence et avec une pathogénicité « relativement faible » (ex : *Nosema*, certains virus) et ainsi déterminer l'occurrence éventuelle d'effets additifs, synergétiques, potentialisant ou antagonistes. La co-exposition avec des agents biologiques très délétères comme le *Varroa* n'a que peu d'intérêt car seul il réduit très fortement la longévité des abeilles. Cependant, la co-exposition avec le *Varroa* reste pertinente dans le cas de colonies d'abeilles peu parasitées par cet acarien, situation courante en France métropolitaine. Les effets du PPP sur la prévalence ou le profil d'agents infectieux des colonies peuvent directement être déterminés avant et après exposition des colonies.

## 5.4 Méthodes envisageables pour la prise en compte des interactions dans les méthodes d'évaluation des produits phytopharmaceutiques

### 5.4.1 Méthodes expérimentales au laboratoire, en conditions semi-naturelles, en plein champ

Il n'existe pas de méthode spécifique pour tester les interactions. Ainsi, toutes les méthodes listées dans ce document peuvent potentiellement être utilisées, avec comme première limite le contrôle de l'exposition. La maîtrise du contrôle d'exposition est optimale dès lors qu'un test est réalisé sur des individus en laboratoire et décroît lorsqu'on s'intéresse aux effets sur des colonies et qu'on s'approche des conditions de plein champ. La nature du facteur de stress module également cette maîtrise dans la mesure où il est plus facile de contrôler un niveau d'exposition à un agent chimique (pesticide) pour sa relative stabilité dans le temps comparé à un agent biologique (infectieux et parasitaire) pour les raisons inverses, même si des procédures d'exposition de colonies en plein champ ont été décrites à des fins de recherche pour le *Varroa*, la loque américaine et l'ascosphérose (Beebook, 2013<sup>57</sup>). Concernant ces derniers, il faut également, selon le type d'agent infectieux ou parasite, tenir compte des risques de dissémination ou de contagion en cas de manipulation à l'extérieur.

### 5.4.2 Utilisation de la modélisation pour l'étude des effets de stress multiple chez l'abeille

Un modèle traduit, sous une forme abrégée, une réalité plus complexe et détaillée. Construit à partir des éléments essentiels de cette réalité, il permet de la simuler mais sans jamais la reproduire exactement. Les performances d'un modèle dépendront donc du bon choix de ses éléments constitutifs représentés par un algorithme et ses données, exprimées sous la forme de variables et de constantes dont le nombre doit être optimisé suivant le principe de parcimonie. La capacité d'un modèle à accepter des transformations dépendra également des choix faits pour ses éléments constitutifs.

Le fonctionnement d'une colonie d'abeilles étant très complexe, de nombreux modèles ont été proposés (Devillers *et al.* 2014) pour reproduire et étudier un aspect spécifique de leur biologie ou de leur comportement (ex : essaimage, danse, butinage), pour mieux comprendre un processus de contamination par un pathogène (ex : *Varroa*) ou un xénobiotique (ex : tau-fluvalinate), ou pour simuler la dynamique de la colonie en relation avec son environnement. Le processus à modéliser est appréhendé dans sa globalité sous la forme d'un nombre limité d'équations qui obligatoirement simplifient considérablement les phénomènes ou à l'inverse au travers de sous-modèles permettant une description détaillée des phénomènes étudiés. Dans la première catégorie, on va trouver par exemple les modèles de Martin (2001), Thompson *et al.* (2005), Thompson *et al.* (2007) ou Houry *et al.* (2011) représentés par un nombre limité d'équations alors que dans la deuxième, on trouvera par exemple le modèle HoPoMo (Schmickl et Crailsheim 2007) constitué de 65 équations réparties en sous-modèles interconnectés. Si les premiers types de modèles trouvent des applications dans l'étude de stress chimiques ou biologiques uniques (*i.e.* une manifestation de stress par exercice de simulation), les seconds sont plus adaptés à la prise en compte simultanée de différents stress qui peuvent agir à plusieurs niveaux d'organisation de la colonie et/ou à différentes échelles. Cependant, la structure et le fonctionnement particulier d'une colonie d'abeilles et la volonté que les modèles décrivent le plus précisément possible les phénomènes observés ont conduit à l'utilisation de la modélisation individu-centrée pour simuler le fonctionnement normal ou perturbé de colonies d'abeilles.

En effet, dans une colonie, en permanence des milliers d'abeilles, par leur activité individuelle, ajoutent simultanément de petits éléments comportementaux qui interagissent pour constituer le comportement collectif de la colonie. La résultante totale est supérieure à la somme des

<sup>57</sup> <http://www.coloss.org/beebook>



possibilités de chacune des catégories d'abeilles prises individuellement. Cette définition se rapproche conceptuellement de la modélisation individu-centrée dans laquelle le modèle porte sur un niveau d'organisation particulier, les individus, mais où la simulation de l'ensemble ou partie de ces individus va conduire à l'apparition d'une action globale et collective. Avec ce type de modélisation stochastique et à temps discret, un système est modélisé comme une collection d'entités autonomes, les agents ayant leurs caractéristiques propres. Ils vivent dans un environnement avec lequel ils interagissent. Ils sont flexibles et peuvent modifier leur comportement à partir de l'expérience facilitant l'émergence de nouveaux phénomènes, ce qui est une caractéristique propre de ce type de modélisation (Devillers *et al.* 2010). On parle souvent de modélisation "bottom-up" au sens où les modèles sont définis "par le bas" et que les simulations s'observent au niveau "haut". On les oppose aux modèles déterministes classiques qui sont qualifiés de "top-down" (Bonabeau 2002; Topping *et al.* 2009).

La modélisation individu-centrée est donc particulièrement bien adaptée à la simulation des activités des abeilles. De ce fait, des modèles individu-centrés ont été proposés pour simuler les différentes tâches des abeilles au sein de la ruche et/ou à l'extérieur de celle-ci (ex : de Vries et Biesmeijer (1998), de Vries et Biesmeijer (2002), Thenius *et al.* (2005), Dornhaus *et al.* (2006), Fehler *et al.* (2007), Schmickl et Crailsheim (2008), Johnson (2009), List *et al.* (2009), Johnson et Nieh (2010), Becher *et al.* (2014), Devillers *et al.* (2014)). Les catégories d'abeilles peuvent être autant de types d'agents avec leurs variables et constantes propres. Selon le phénomène modélisé et le niveau d'organisation considéré, cela peut représenter des dizaines de milliers d'agents qui vont interagir entre eux et avec leur environnement représenté par la ruche et/ou le milieu extérieur, les deux pouvant être spatialisés. Le couplage possible à un SIG (système d'information géographique) permet de travailler sur un environnement réel et ses composantes temporelle et spatiale. Dans ces conditions, les modèles individu-centrés simulant la dynamique d'une colonie d'abeilles dans sa ruche et en relation avec le milieu extérieur, sont les plus réalistes d'un point de vue écologique et sont bien adaptés ou facilement adaptables à l'étude de stress multiples. C'est le cas de SimBeePop qui a montré son intérêt pour étudier les effets de stress multiples, chez les larves et les adultes, de concentrations létales et sublétales de fénoxycarbe (Devillers et Devillers 2013) et de pyriproxifène (Devillers *et al.* 2014). C'est aussi le cas de BEEHAVE (Becher *et al.* 2014) qui permet à la fois d'étudier les effets de stress chimiques mais également ceux induits par un pathogène (*Varroa destructor*).

La modélisation de stress multiples nécessite d'une part que les perturbations étudiées puissent être simulées directement par le modèle ou indirectement après modification de celui-ci et d'autre part que la réponse obtenue soit la plus réaliste possible. Même si cette deuxième condition est difficile à garantir *a priori*, elle aura d'autant plus de probabilité d'être satisfaite que le modèle reproduira le plus fidèlement possible la dynamique de population d'abeilles. C'est pourquoi les modèles individu-centrés prenant en compte les traits biologiques et écologiques des abeilles, du fait de leur flexibilité et de leur capacité à faciliter l'émergence de phénomènes nouveaux, sont les plus adaptés à l'étude des stress multiples.

## 5.5 Conclusions / recommandations

La présence de nombreux facteurs de stress dans les colonies, les matrices apicoles et à l'extérieur des ruches est reconnue. Leur impact individuel sur la santé des abeilles est démontré pour beaucoup d'entre eux. L'impact de l'exposition multiple des abeilles aux xénobiotiques et aux agents infectieux est argumenté par des études qui montrent les effets négatifs des combinaisons de certains de ces facteurs de stress. En raison de la multiplicité des facteurs de stress et de leurs associations potentielles, il est illusoire de prendre en considération toutes les interactions possibles. Cependant, il est pertinent de prendre en compte certaines interactions pour (ré)évaluer les produits phytopharmaceutiques (PPP), et des stratégies peuvent être développées pour cela, en distinguant la phase d'autorisation du produit et le suivi post-homologation. L'évaluation des PPP *a priori* en interaction avec un ou plusieurs facteurs de stress, chimiques et/ou infectieux, parmi les plus courants et les plus pertinents pourra être réalisée en utilisant des tests existants. Dans le cadre de la pharmacovigilance, le suivi post-AMM de nouvelles molécules devra permettre de rechercher et d'évaluer les interactions possibles lors de troubles observés sur le terrain alors que ces molécules auront été utilisées.

**Pour la prise en compte d'interactions entre PPP**, le groupe de travail recommande que la procédure d'évaluation de la toxicité d'un pesticide, préalablement à sa mise sur le marché, intègre des tests pour mesurer l'effet d'une co-exposition chimique par voie orale ou topique à deux molécules (l'une à tester, la deuxième susceptible d'interagir) de façon chronique.

Il conviendrait également d'identifier le(s) mécanisme(s) d'action d'une nouvelle molécule, ce qui pourrait permettre d'envisager des interactions possibles/probables avec des molécules ayant des modes d'action similaires ou antagonistes.

La co-exposition du PPP devrait être testée deux-à-deux avec une molécule acaricide anti-*Varroa*, une molécule fongicide connue pour inhiber les mécanismes principaux de détoxification des pesticides chez l'abeille, et un insecticide ayant un même mode d'action et connu pour être présent dans les matrices apicoles.

**Concernant la prise en compte d'interactions entre agents infectieux et PPP**, il faudrait, dans un premier temps, réaliser des tests en laboratoire en exposant les abeilles à un PPP avec des agents infectieux ayant une forte prévalence et une pathogénicité « relativement faible » pour déterminer l'occurrence éventuelle d'effets additifs, synergétiques, potentialisant ou antagonistes et décrire les mécanismes d'interactions. Il faudrait ensuite éprouver les effets sur le terrain au niveau de la colonie. Les effets du PPP sur la prévalence ou le profil d'agents infectieux des colonies devront être déterminés en les comparant avant et après exposition des colonies.

Des études épidémiologiques devront être conduites afin d'apporter des informations sur l'identité des pesticides susceptibles de modifier la prévalence de certains agents infectieux.

L'acquisition de données de laboratoire et de terrain sur les co-expositions agents infectieux/pesticides permettra en outre de contribuer au développement de modèles mathématiques visant à prédire le développement et la survie des colonies en présence de stress dans différents contextes paysagers, populationnels et climatiques.

**Concernant les méthodes envisageables pour la prise en compte d'interactions** dans l'évaluation des PPP, il existe déjà des méthodes au laboratoire, en conditions semi-naturelles et en plein champ. D'autres méthodes devraient être développées, en s'attachant notamment à la maîtrise du contrôle de l'exposition et à la description des niveaux de portage infectieux et de contamination des matrices dans les colonies testées, en début et en fin d'expérimentation. Le développement de nouvelles méthodes intégrant ces interactions et standardisées, nécessitant la réalisation d'essais inter laboratoires, pourrait ensuite contribuer à l'évolution des lignes directrices pour l'évaluation des PPP.

Les modèles mathématiques individu-centré, prenant en compte les traits biologiques et écologiques des abeilles, devraient être développés pour étudier les effets des facteurs de stress multiples et quantifier les effets additifs, voire synergiques.

**En termes de recherche**, il conviendra de poursuivre :

- dans le domaine de la recherche appliquée, le développement de méthodes intégrant ces interactions ;
- dans le domaine de la recherche fondamentale, la mise en place d'études visant à mieux comprendre les mécanismes impliqués dans ces interactions.

Les travaux de recherche sur les risques écotoxicologiques liés aux expositions multiples aux PPP devront en outre contribuer à :

- concevoir des outils opérationnels de mesure et d'enregistrement des données sur l'exposition ;
- comprendre le rôle de l'exposition des colonies d'abeilles à plusieurs pesticides dans les phénomènes de surmortalité, d'affaiblissement, de troubles de la reproduction et de baisse de production ;
- évaluer les effets de mélanges de pesticides, notamment à long terme ;
- développer des méthodes d'évaluation du risque en considérant la co-exposition aux pesticides, notamment à faibles doses, ainsi que les effets en cascade à l'échelle de la population ;
- développer les recherches sur les effets des fongicides en association avec d'autres pesticides (notamment insecticides) ;
- développer des modèles mathématiques permettant d'estimer les effets additifs et synergiques, principalement des pesticides.

**Du fait de la multiplicité des interactions possibles, il est nécessaire d'établir une hiérarchie des différents facteurs de stress chimiques et infectieux basée sur des critères tels que leur prévalence et leurs effets, en caractérisant les effets des co-expositions les plus fréquentes.**

## 6 Synthèse, conclusions et recommandations du groupe de travail

Suite à plusieurs rapports et travaux mettant en évidence les interactions entre facteurs de stress chez l'abeille, l'Anses s'est autosaisie en 2012 sur la question des co-expositions des abeilles aux facteurs de stress et des interactions entre facteurs de stress. La compréhension des phénomènes observés par les apiculteurs de surmortalité et d'affaiblissement des colonies d'abeilles, ainsi que de baisse de production, nécessitait l'étude de ces co-expositions et de leurs effets.

Le groupe de travail chargé du traitement de cette autosaisine a d'abord étudié la santé des abeilles et colonies d'abeilles en définissant autant que possible l'état de santé « normal » d'une colonie d'abeilles, en décrivant les outils d'évaluation de la santé des abeilles et colonies d'abeilles et en proposant des indicateurs de santé utilisables par l'apiculteur, le vétérinaire et le chercheur.

Il s'est ensuite attaché à présenter, sans les hiérarchiser, les principaux facteurs de stress, rapportés dans la bibliographie, auxquels peuvent être exposées les abeilles et susceptibles d'induire des interactions : facteurs biologiques, chimiques, alimentation, pratiques apicoles, conditions météorologiques, facteurs physiques. Des co-expositions et interactions entre ces facteurs de stress rapportées dans la littérature, ont ensuite été étudiées, après un rappel des mécanismes de l'immunité et de détoxification des abeilles dont certains sont impliqués dans les interactions observées.

Pour compléter ce travail bibliographique, le groupe de travail a discuté les résultats d'analyses statistiques de neuf jeux de données relatives à l'état sanitaire de ruchers en France métropolitaine (obtenues par différentes instances nationales).

Les experts ont enfin examiné l'intérêt de prendre en compte certaines interactions entre facteurs de stress dans les demandes d'autorisation des produits phytopharmaceutiques.

### 6.1 Conclusions

#### 6.1.1 Sur l'état des colonies et des outils d'évaluation de la santé des colonies d'abeilles

Les constats effectués, sur la base des données disponibles, ont mis en évidence un nombre important d'agents infectieux et parasitaires affectant les colonies d'abeilles et de nombreux xénobiotiques présents dans les matrices apicoles. Ces éléments définissent aujourd'hui le contexte dans lequel vivent les colonies d'abeilles, dont le cycle biologique annuel doit aussi s'adapter aux autres facteurs environnementaux.

Dans ce contexte, il est apparu nécessaire de définir l'état de santé des colonies d'abeilles et de mieux déterminer ce qu'est une situation normale ou anormale. Les outils actuellement disponibles pour évaluer la santé des abeilles doivent, pour certains, être rénovés et adaptés à ce nouveau contexte ; cette évolution est en cours pour certains outils. Ils doivent répondre à des objectifs distincts (examen ponctuel, suivi temporel), à des échelles différentes (abeille individuelle, colonie, région, etc.) et à des niveaux d'étude variables (moléculaires, cellulaires, comportementaux, etc.).

Les experts ont souligné la difficulté à comparer les données sur la santé et la force des colonies, du fait de la variabilité des facteurs géographiques, climatiques, floristiques ou agronomiques qui influent largement sur le cycle biologique annuel des colonies. Ces données devraient être comparées à des référentiels et prendre en compte la notion d'évolution temporelle.

### 6.1.2 Sur les facteurs de stress

La diversité des facteurs de stress auxquels les abeilles peuvent être exposées, de manière concomitante ou successive, apparaît très importante. Pour chaque facteur, il peut exister une grande variabilité d'un rucher à l'autre, voire d'une colonie à l'autre. Il en résulte souvent une difficulté à déterminer le rôle attribuable à l'un ou l'autre de ces facteurs lors de troubles dans les colonies, ou leurs effets conjoints, et à pouvoir effectuer des comparaisons entre ruchers. Ces différents facteurs de stress concourent à l'affaiblissement et aux troubles des colonies, même si, dans certains cas, un seul type de facteur peut être mis en cause.

Pour de nombreux agents biologiques, la connaissance du pouvoir pathogène reste, dans certains cas, à approfondir, au laboratoire et sur les colonies d'abeilles. Le portage asymptomatique d'agents infectieux et parasitaires est très répandu dans les colonies d'abeilles et il convient de le distinguer de la maladie clinique. Le maintien en équilibre des populations microbiennes est lié à des facteurs intrinsèques à la ruche et environnementaux, dont l'altération peut conduire à l'apparition de troubles. Il est important de s'intéresser au caractère prédictif du portage pour l'apparition de troubles ultérieurs, notamment par une approche intégrant des données démographiques dans la colonie, ainsi que des données géographiques et temporelles au cours des saisons apicoles.

Le nombre et la diversité des facteurs chimiques sont très élevés. Il existe une grande diversité des substances retrouvées dans les matrices apicoles et auxquelles les abeilles sont exposées à l'extérieur et à l'intérieur de la colonie. Dans le cadre du présent travail, les substances d'intérêt ont été les insecticides, les fongicides et les acaricides varroacides. Un certain nombre de substances impliquées dans des troubles d'abeilles, parfois à des doses sublétales ont déjà été identifiées (e.g. néonicotinoïdes, fipronil). Certaines études ont décrit des troubles et identifié des mécanismes explicatifs. Les études en laboratoire sont plus nombreuses que les études sous tunnel et/ou en plein champ, à cause des difficultés de réalisation et d'interprétation de ces dernières. L'exposition des abeilles au champ n'est pas comparable à l'exposition contrôlée en laboratoire et les résultats pour une même substance peuvent différer, principalement du fait du mode et du contrôle de l'exposition (nature, nombre de substances et leur quantité).

L'abondance et la diversité de l'alimentation et des ressources environnementales jouent un rôle important dans la reproduction, le développement et le maintien des colonies d'abeilles. Elles influencent la santé et la tolérance des abeilles à d'autres facteurs de stress (chimiques et biologiques). Des études, réalisées principalement en laboratoire, ont mis en évidence des effets négatifs de carences nutritionnelles sur le métabolisme et l'immunité. Il est important de savoir si les effets observés sont transposables en conditions naturelles.

Certaines pratiques apicoles peuvent générer un stress susceptible de s'ajouter à d'autres facteurs et induire l'apparition de troubles. L'impact négatif possible peut être inhérent à la pratique elle-même ou relever de pratiques inadaptées ou non réalisées.

Le groupe de travail souligne l'intérêt du respect de bonnes pratiques apicoles, fondées sur une formation approfondie à l'apiculture et un suivi régulier des colonies pour le maintien de la santé des ruchers.

L'intensité et la durée des phénomènes météorologiques peuvent modifier l'équilibre physiologique et la dynamique des populations d'abeilles d'une colonie et entraîner un affaiblissement naturel.

Dans ce contexte, le groupe de travail souligne l'intérêt d'utiliser et de maintenir des populations d'abeilles adaptées aux conditions locales.

### 6.1.3 Sur les co-expositions et interactions entre facteurs de stress

Les ruchers sont co-exposés à de multiples combinaisons de facteurs, dont le parasite *Varroa*, des bactéries, virus, microsporidies et des xénobiotiques (tels que des insecticides, fongicides et acaricides) constituent les éléments de stress identifiés.

Le bilan du rôle suspecté / avéré des interactions entre facteurs de stress a mis en évidence que plusieurs agents infectieux et/ou chimiques pouvaient interagir sur les mêmes cibles fonctionnelles

de la larve et de l'abeille adulte et induire des effets additifs ou synergiques. Les substances chimiques peuvent en outre perturber les mécanismes de détoxification, et ainsi modifier la sensibilité des abeilles à d'autres substances. De plus, certains agents biologiques (*Varroa*) et certaines substances ont des effets immunodépresseurs et contribuent à l'amplification des infections/infestations en général. *Varroa* agit également comme amplificateur de l'infection par certains virus qu'il transmet. Enfin, certaines substances, comme des néonicotinoïdes et des acaricides, peuvent avoir un effet sur la cohésion de la colonie et le comportement hygiénique des ouvrières, et donc sur les risques infectieux et parasitaires. Ainsi, en particulier, les interactions entre *Varroa* et virus (DWV, virus du complexe AKI), néonicotinoïdes et *Nosema*, fipronil et *Nosema*, néonicotinoïdes et virus (DWV et BQCV), fongicides et insecticides, montrent des effets de synergie menaçant le bon état de santé des colonies.

Ces différents mécanismes peuvent agir simultanément. Leurs effets dépendent de la saison. Le niveau d'infection de la colonie à l'entrée de l'hiver dépend de l'interaction entre l'ensemble de ces facteurs pendant la période de butinage. Ils peuvent être seulement observables après un temps de latence. Les pratiques apicoles peuvent les compenser ou les amplifier.

Cette analyse est partagée par d'autres spécialistes, comme le montre la très récente revue de Goulson *et al.* (2015). Les auteurs font ressortir que les trois principaux facteurs (listés sans ordre hiérarchique) sont : les parasites et agents infectieux, en particulier non-natifs/exotiques, les cocktails de pesticides (principalement les insecticides et fongicides) et le manque de diversité florale. Ces facteurs interagissent entre eux et les auteurs suggèrent en conséquence plusieurs actions, notamment augmenter la richesse florale disponible, réduire l'usage des pesticides et mieux gérer les échanges d'abeilles non-natives entre pays/continents (Goulson *et al.* 2015).

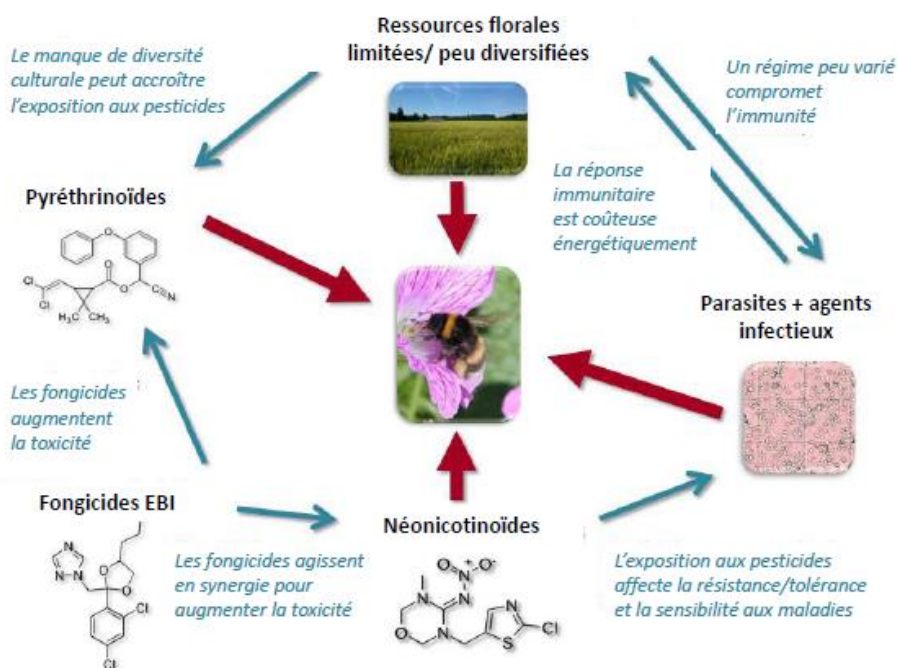


Figure 13 : d'après Goulson *et al.*, Science, février 2015 : « les abeilles gérées et sauvages sont soumises à un nombre significatif de facteurs de stress en interaction. Par exemple, l'exposition à certains fongicides peut fortement augmenter la toxicité des insecticides (références 110 à 112) tandis que l'exposition aux insecticides réduit la résistance aux maladies (références 115-123 et 115-126). Le facteur de stress alimentaire diminue probablement la capacité des abeilles à faire face aux agents toxiques et pathogènes (références 127-129).

Photo credit: Beth Nicholls; Flickr Commons, AJC1 (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.0/legalcode> )”

#### 6.1.4 Sur les résultats de l'analyse des données (aspects monofactoriels et interactions)

Les résultats de l'analyse des jeux de données confirment le nombre important et la diversité des dangers biologiques et chimiques détectés dans les colonies d'abeilles en France. Ils n'ont pas permis de conclure sur la prévalence des dangers biologiques ou chimiques dans les ruchers en France, les conditions de représentativité des échantillons n'étant pas réunies, seules certaines de ces études ayant été conçues pour une recherche systématique et calibrée de dangers biologiques et chimiques.

Ces observations permettent d'indiquer certains dangers à rechercher, donnent des indications et soulignent les besoins quant aux matrices à prélever et les méthodes à utiliser.

Dans ce contexte de co-exposition des abeilles à de nombreux facteurs de stress, associé à une forte variabilité, qualitative et quantitative, des expositions et interactions pouvant en résulter, le groupe de travail souligne la difficulté à déterminer l'état de santé et de « normalité » d'une colonie d'abeilles, ainsi que le rôle attribuable à chaque cofacteur identifié dans une colonie d'abeilles présentant des troubles. Les troubles observés peuvent résulter de co-expositions concomitantes, mais également successives, à des facteurs de stress. Un facteur peut induire des effets, par exemple sur l'immunité, dont les conséquences apparaîtront de manière différée, alors même que ce facteur peut ne plus être présent dans la ruche.

#### 6.1.5 Sur la question de la prise en compte des interactions dans l'évaluation des produits phytopharmaceutiques

S'il est illusoire de prendre en compte toutes les interactions possibles, le groupe de travail a estimé pertinente la prise en compte de certaines d'entre elles pour évaluer les produits phytopharmaceutiques (PPP), en distinguant la phase d'autorisation du produit et la phase post-AMM. L'évaluation des PPP *a priori* en interaction avec un ou plusieurs facteurs de stress parmi les plus courants et les plus pertinents devrait être réalisée en utilisant des tests existant au laboratoire. Le suivi post-AMM de nouvelles molécules permettrait de rechercher et d'évaluer les interactions possibles lors de troubles observés sur le terrain alors que ces molécules auront été utilisées.

Les différentes conclusions issues de l'analyse de la bibliographie et des résultats d'analyse des jeux de données ont conduit le groupe de travail à formuler des recommandations.

## 6.2 Recommandations

Ce chapitre reprend les recommandations énoncées dans les chapitres précédents. Le GT, dans sa diversité disciplinaire, a souhaité souligner les recommandations prioritaires en gras, sans occulter l'intérêt des autres recommandations.

### 6.2.1 Sur les outils d'évaluation de la santé des colonies d'abeilles

En préambule, il convient de souligner la nécessité de définir des outils de caractérisation en termes de paramètres physiques, chimiques et biologiques de l'état « normal » moyen d'une colonie d'abeilles, dans son environnement.

Le groupe de travail recommande de :

- distinguer les outils à destination des apiculteurs et ceux destinés à la recherche et/ou au diagnostic ;
- soutenir le développement de méthodes et de dispositifs innovants et validés pour mieux appréhender la santé et la force des colonies d'abeilles. En termes cliniques et pathologiques, l'élaboration d'un atlas illustré de pathologie de l'abeille constituerait un appui utile au diagnostic ;
- **développer des dispositifs validés et harmonisés pour la mesure des troubles des colonies (pertes des butineuses, ponte de la reine, etc.).**

Les experts recommandent en outre la création de ruchers de référence, réunis en réseau pour constituer un maillage le plus complet possible du territoire français. Ces ruchers permettraient, sur la base d'une collecte standardisée de données de population et de production, de définir des référentiels régionaux pour les différents acteurs. Un acteur national identifié devrait rassembler ces données, les compiler et les rendre aisément disponibles à tous les acteurs de la filière.

### 6.2.2 Sur les facteurs de stress

Pour les agents infectieux et parasitaires, le groupe de travail recommande la poursuite d'études :

- visant à définir les prévalences et différences régionales des agents infectieux dans des colonies avec et sans symptômes ;
- visant à préciser les facteurs de virulence d'agents infectieux et parasitaires (notamment *Nosema ceranae* et certains virus), au laboratoire et à l'échelle des colonies ;
- pour déterminer les mécanismes physiopathologiques impliqués dans la sensibilité des individus-hôtes, à l'échelle de la colonie et de l'individu ;
- sur le caractère prédictif des quantités d'agents infectieux présents dans l'apparition de troubles ultérieurs, en lien ou non avec la présence de facteurs de stress chimiques.

Pour les agents chimiques, il conviendra de poursuivre des études :

- visant à développer des outils analytiques adaptés pour mesurer les (co)expositions réelles lors d'expérimentations de terrain ;
- visant à mieux décrire et préciser les expositions et les effets toxiques des molécules chimiques auxquelles les colonies sont exposées ;
- sur les effets directs ou en interaction des fongicides et insecticides, compte tenu de la fréquence et de la multiplicité de l'exposition à ces substances ;
- pour déterminer les mécanismes de toxicité impliqués, à l'échelle de l'abeille-individu, aux différents stades de développement (larve, nymphe et adulte), et de la colonie ;
- sur le caractère multiple et répété de ces expositions au cours du temps et de leurs effets en co-exposition avec d'autres facteurs. L'étude de l'évolution des substances chimiques dans les différentes matrices apicoles, y compris les abeilles et la cire, est importante.

De plus, le groupe de travail :

- recommande la mise en place d'études qui permettraient d'évaluer les effets de carences nutritionnelles en conditions naturelles ;
- souligne l'intérêt, d'une part, du respect de bonnes pratiques apicoles pour le maintien de la santé des ruchers, notamment les mesures de biosécurité et de lutte contre les agents infectieux, et, d'autre part, d'utiliser et de maintenir des populations d'abeilles adaptées aux conditions locales ;
- souligne l'importance de la formation des vétérinaires et des techniciens sanitaires apicoles face à la complexité de survenue des troubles chez l'abeille ;
- note l'intérêt d'études sur les processus physiologiques de réponse des colonies au changement climatique.

### 6.2.3 Sur les études épidémiologiques et recueils de données visant à répondre à la question des interactions *in situ*

Les difficultés à déterminer l'état de santé des colonies et à identifier la(les) cause(s) de troubles ont conduit les experts à recommander la poursuite et le développement d'une surveillance des ruchers, notamment des agents infectieux, parasitaires et des agents chimiques. Le groupe de travail souligne que les agents infectieux, parasitaires et chimiques, y compris les acaricides dans les cires, doivent être recherchés de manière concomitante, lors de surveillance active comme lors d'apparition de troubles dans les colonies (*i.e.* surveillance événementielle ou passive).



Pour les études d'épidémiologie observationnelle dans la filière apicole visant à identifier des facteurs de risque d'infections particulières, il est indispensable, de recourir à des méthodes permettant de comparer des profils d'exposition aux facteurs de risque (en diversité et en quantité), entre unités épidémiologiques cas et témoins et dans le temps. Les variables d'état des colonies mesurées doivent intégrer la disponibilité de réserves, la structure démographique à l'intérieur de la colonie, la taille de la population et l'activité de butinage.

L'échantillonnage doit prendre en compte la structuration en ruchers. Il est très important de conserver l'information du lien entre l'échelle de la colonie et celle du rucher, et de faire les traitements statistiques en tenant compte de cette structuration. Il faut également tenir compte des facteurs saisonniers et géographiques, qui conditionnent fortement la biologie de la colonie.

L'épidémiosurveillance nécessite une standardisation du recueil des données. Cette standardisation implique notamment une coordination centrale assurant le respect des protocoles, la formation des enquêteurs, la remontée d'information, la redescende d'information, le traitement statistique pertinent, basé sur des effectifs suffisants. Il existe des règles d'échantillonnage qui permettent d'atteindre la précision souhaitée en fonction de la question posée. Sur ces critères, la plupart des dispositifs de surveillance actuels sont insuffisants ; la réflexion engagée pour l'observatoire des mortalités et des alertes devrait aller dans le sens de ces recommandations. Des observatoires régionaux sont à développer dans le but d'avoir des ruchers qui servent de référence aussi bien pour la production habituelle que pour l'exposition régulière aux facteurs de risques propres à la région.

La réalisation d'études épidémiologiques à visée explicative de phénomènes décrits par la surveillance repose sur un protocole permettant une comparaison des cas avec une population de référence. Compte tenu de la complexité des phénomènes impliqués dans les troubles des abeilles, la plus grande rigueur est indispensable pour l'élaboration comme pour la réalisation des protocoles d'enquête épidémiologique.

Le GT souligne l'importance d'une réflexion transdisciplinaire approfondie avant la mise en place des enquêtes, afin de s'assurer de l'adaptation des outils analytiques, de l'échantillonnage, des données recueillies par questionnaire et des traitements statistiques avec les questions posées, sans en oublier la faisabilité.

**La surveillance active programmée des agents infectieux et parasitaires devra être faite par des méthodes spécifiques, sensibles et quantitatives, validées et standardisées. Les principaux agents potentiellement pathogènes en France devront être recherchés de façon concomitante, qu'il y ait ou non des symptômes. Cette recherche devra être réalisée conjointement avec une quantification du degré d'infestation par *Varroa*, qui conditionne fortement la dynamique des infections qu'il transmet et l'état immunitaire des abeilles et les principaux facteurs toxiques (*a minima* ceux dont les effets sublétaux peuvent influencer l'immunité, individuelle ou sociale). Cette surveillance devra permettre de fournir des données, qualitatives et quantitatives, sur le portage asymptomatique dans les colonies, données insuffisantes à l'heure actuelle. Elle permettra de comparer les niveaux d'agents infectieux présents dans les ruches asymptomatiques avec les niveaux observés dans le cadre de la surveillance événementielle, et ainsi contribuer à préciser le rôle de tel ou tel agent infectieux dans l'apparition de troubles.**

Les stratégies de détection de pesticides devraient avoir les caractéristiques suivantes :

- viser un panel de substances connues pour être utilisées dans la région ;
- en fonction de la question posée, tenir compte des traitements multiples appliqués sur la zone de butinage dans le temps et cibler la(les) matrice(s) à analyser ;
- utiliser des méthodes quantitatives validées (existantes ou à venir) dont les seuils de détection/quantification sont compatibles avec des études portant sur la potentialisation de molécules et leurs effets adverses sur les colonies d'abeilles. Les méthodes multi-résidus seront préférables, pour autant que leur sensibilité soit suffisante pour l'objectif visé. Pour les pesticides très toxiques, des analyses mono-résidu (substance active et ses métabolites toxiques) seront indispensables sur les matrices d'intérêt (pollen,

nectar, cires, abeilles, pain d'abeilles). Pour la surveillance de problèmes émergents et pour la toxicovigilance des produits vétérinaires et phytosanitaires (évaluation post-AMM), il est nécessaire de standardiser et centraliser le recueil des observations lors de troubles et de standardiser les méthodes multi-résidus mises en œuvre.

En outre, l'évolution des substances chimiques (cinétique de dégradation, accumulation, etc.) dans les différentes matrices apicoles, y compris les abeilles, devra faire l'objet de recherches qui contribueront au choix des matrices à prélever lors de troubles, de préciser les possibles co-expositions et interactions, concomitantes et successives, à des agents chimiques.

**Il convient de souligner la nécessité d'avoir des méthodes de quantification validées et harmonisées, pour les agents infectieux et parasitaires et les agents chimiques. La validation des méthodes de diagnostic va permettre de conduire la surveillance avec des outils adaptés, dont la sensibilité, la spécificité et la reproductibilité, la répétabilité ainsi que les limites de détection et de quantification sont déterminées et dont l'utilisation est harmonisée entre les laboratoires de référence afin de conduire des études avec des résultats comparables.**

#### 6.2.4 Sur la prise en compte des interactions dans l'évaluation des produits phytopharmaceutiques

Concernant les interactions pesticides-pesticides, le GT recommande que la procédure d'évaluation de la toxicité d'un PPP intègre des tests pour mesurer l'effet d'une co-exposition chimique par voie orale ou topique à une autre molécule (choisie pour son potentiel à interagir) de façon chronique. La co-exposition du PPP à évaluer devrait notamment être testée avec :

- une molécule acaricide anti-*Varroa* ;
- une molécule fongicide et connue pour inhiber les mécanismes de détoxification des abeilles ;
- un insecticide ayant un même mode d'action et connu pour être présent dans les matrices apicoles.

De nouvelles méthodes devraient faire l'objet de l'élaboration de lignes directrices standardisées nécessitant la réalisation de tests circulaires inter-laboratoires.

En termes de recherche, les travaux sur les risques écotoxicologiques liés aux expositions multiples aux pesticides devraient contribuer à :

- concevoir des outils opérationnels d'assimilation des données sur l'exposition ;
- **comprendre le rôle de l'exposition des colonies d'abeilles à plusieurs pesticides dans les phénomènes de surmortalité, d'affaiblissement et de baisse de production ;**
- évaluer les effets des mélanges de pesticides, notamment à long terme ;
- développer des méthodes d'évaluation du risque en considérant la co-exposition aux pesticides, notamment à faibles doses, ainsi que les effets en cascade à l'échelle de la population ;
- développer des recherches sur les effets des fongicides en association avec d'autres pesticides, notamment des insecticides ;
- **développer des modèles mathématiques permettant d'estimer les effets additifs et synergiques, principalement des pesticides.**

Du fait de la multiplicité des facteurs de stress potentiels, il serait intéressant, malgré la difficulté que cela représente, **d'établir une hiérarchisation des substances à tester en interaction**, sur la base de critères tels que leur prévalence et leurs effets (incluant leur mode d'action), en caractérisant les effets des co-expositions les plus fréquentes.

**Concernant les interactions agent infectieux et parasitaires-pesticides**, il faudra déterminer en laboratoire les effets de ces co-expositions induisant des synergies, potentialisations ou antagonismes sur la mortalité des abeilles, affaiblissements de colonie ou perturbation des

processus de reproduction, décrire les mécanismes d'interactions puis éprouver les effets sur le terrain au niveau de la colonie.

Des études épidémiologiques apporteront des indices sur l'identité des pesticides ayant tendance à modifier la prévalence de certains agents infectieux et parasitaires ou la réponse des individus hôtes, pouvant entraîner l'émergence de souches plus virulentes.

L'accumulation de données de laboratoire et de terrain sur les co-expositions agents infectieux/pesticides permettra d'alimenter le développement de modèles mathématiques de type individu-centré prenant en compte les traits biologiques et écologiques des abeilles et permettant de prédire le développement et la survie des colonies en présence de facteurs de stress dans différents contextes paysagers, populationnels et climatiques.

Dans le cadre de l'homologation de PPP, il sera pertinent de réaliser des tests en laboratoire en co-exposant le PPP avec des agents infectieux et parasitaires ayant une forte prévalence et une pathogénicité « relativement faible » pour déterminer l'occurrence éventuelle d'effets additifs, synergiques, potentialisant ou antagonistes.

Pour l'étude de ces interactions, certaines méthodes déjà existantes peuvent déjà être utilisées dans ce but au laboratoire, en conditions semi-naturelles, en plein champ pour prendre en compte les interactions dans les méthodes d'évaluation des PPP. D'autres méthodes seraient à développer pour mieux contrôler l'exposition et l'état d'infection des colonies expérimentales, en début et fin d'expérimentation.

### 6.3 Perspectives

La co-exposition de l'abeille domestique à de nombreux facteurs de stress est une réalité indéniable. La gestion des risques sanitaires, qu'ils soient chimiques et/ou biologiques, doit aujourd'hui s'adapter à cette réalité et le rapport montre à quel point les mécanismes d'apparition des troubles sont complexes et interdépendants.

Devant le constat de la multiplicité et de l'ampleur de l'exposition aux substances chimiques utilisées en santé des plantes et des animaux d'élevage, il est impératif d'œuvrer de toutes les manières possibles pour une diminution globale des intrants.

Il s'agit de minimiser les traitements, ou au moins leurs effets adverses, notamment l'apparition de résistances et la présence de résidus. Ceci nécessite une approche intégrée combinant en priorité les leviers agro-écologiques et zootechniques utilisables et, si nécessaire, des traitements chimiques à bon escient. Concernant plus spécifiquement la santé de l'abeille, les experts souhaitent encourager le dialogue entre les recherches qui sont en cours dans d'autres filières animales et la recherche apicole, en tenant compte de ses caractéristiques propres, en particulier de son lien très fort au territoire.

**Date de validation du rapport d'expertise collective par le groupe de travail et par le comité d'experts spécialisé Santé animale : 20 mars 2015 et 07 avril 2015**

## 7 Bibliographie

### 7.1 Publications

Abrol DP (2009) Plant-pollinator interactions in the context of climate change - an endangered mutualism. *Journal of Palynology* **45**, 1-25.

Adamczyk S, Lazaro R, Perez-Arquillué C, Conchello P, Herrera A (2005) Evaluation of residues of essential oil components in honey after different anti-*Varroa* treatments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**(26), 10085-90.

Adams SJ, Fussell RJ, Dickinson M, Wilkins S, Sharman M (2009) Study of the depletion of lincomycin residues in honey extracted from treated honeybee (*Apis mellifera* L.) colonies and the effect of the shook swarm procedure. *Analytica Chimica Acta* **637**(1-2), 315-320.

Adler LS (2000) The ecological significance of toxic nectar. *Oikos* **91**, 409-420.

AFSCA (2010) Limite d'action pour la concentration en hydroxyméthylfurfural (HMF) dans la nourriture pour abeilles. Avis 32-2010 du Comité Scientifique de l'Agence Fédérale pour la Sécurité de la Chaîne Alimentaire. Belgique. 12p.

Afssa (2009) Rapport "Mortalités, effondrements et affaiblissements des colonies d'abeilles" (novembre 2008, actualisé en avril 2009) <https://www.anses.fr/sites/default/files/documents/SANT-Ra-MortaliteAbeilles.pdf>.

Ahn K, Xie X, Riddle J, Pettis J, Huang Z (2012) Effects of Long Distance Transportation on Honey Bee Physiology. *Psyche* **2012**, 9.

Ai H, Yan X, Han R (2012) Occurrence and prevalence of seven bee viruses in *Apis mellifera* and *Apis cerana* apiaries in China. *Journal of invertebrate pathology* **109**(1), 160-164.

Akca I, Tuncer C, Guler A, Saruhan I (2009) Residual Toxicity of 8 Different Insecticides on Honey Bee (*Apis mellifera* Hymenoptera: Apidae). *Journal of Animal and Veterinary Advances* **8**(3), 436-440.

Al-Waili N, Salom K, Al-Ghamdi A, Ansari MJ (2012) Antibiotic, Pesticide, and Microbial Contaminants of Honey: Human Health Hazards. *The Scientific World Journal* **2012**, 9.

Al Mazraáwi M (2007) Interaction effects between *Beauveria bassiana* and imidacloprid against *Thrips tabaci* (Thysanoptera: Thripidae). *Communications in agricultural and applied biological sciences* **72**(3), 549-55.

Alaux C, Brunet JL, *et al.* (2010a) Interactions between *Nosema* microspores and a neonicotinoid weaken honeybees (*Apis mellifera*). *Environ Microbiol* **12**(3), 774-82.

Alaux C, Dantec C, Parrinello H, Le Conte Y (2011a) Nutrigenomics in honey bees: digital gene expression analysis of pollen's nutritive effects on healthy and varroa-parasitized bees. *BMC Genomics* **12**, 496.

Alaux C, Ducloz F, Crauser D, Le Conte Y (2010b) Diet effects on honeybee immunocompetence. *Biol Lett* **6**(4), 562-5.

Alaux C, Folschweiller M, McDonnell C, Beslay D, Cousin M, Dussaubat C, Brunet JL, Le Conte Y (2011b) Pathological effects of the microsporidium *Nosema ceranae* on honey bee queen physiology (*Apis mellifera*). *J Invertebr Pathol* **106**(3), 380-5.

Alaux C, Kemper N, Kretschmar A, Le Conte Y (2012) Brain, physiological and behavioral modulation induced by immune stimulation in honeybees (*Apis mellifera*): A potential mediator of social immunity? *Brain Behavior and Immunity* **26**, 1057-1060

- Alghamdi A, Dalton L, Phillis A, Rosato E, Mallon EB (2008) Immune response impairs learning in free-flying bumble-bees. *Biol Lett* **4**(5), 479-81. [In eng]
- Aliano N, Ellis M (2008) Bee-to bee contact drives oxalic acid distribution in honey bee colonies. *Apidologie* **39**, 481-487.
- Aliferis KA, Copley T, Jabaji S (2012) Gas chromatography–mass spectrometry metabolite profiling of worker honey bee (*Apis mellifera* L.) hemolymph for the study of *Nosema ceranae* infection. *Journal of Insect Physiology* **58**(10), 1349-1359.
- Aliouane Y, El Hassani A, Gary V, Armengaud C, Lambin M, Gauthier M (2009) Subchronic exposure of honeybees to sublethal doses of pesticides effects on behaviour. *Environmental Toxicology and Chemistry* **28**(1), 113-122.
- Alippi AM, Albo GN, Leniz D, Rivera I, Zanelli ML, Roca AE (1999) Comparative study of tylosin, erythromycin and oxytetracycline to control American foulbrood of honey bees. *J. Apic. Res.* **38** (3-4), 149-158.
- Allen MF, Ball BV (1995) Characterisation and serological relationships of strains of Kashmir bee virus. *Annals of Applied Biology* **126**(3), 471-484.
- Allen MF, Ball BV (1996) The incidence and world distribution of honey bee viruses. *Bee World* **77**(3), 141-162.
- ALP (2006) Toxic effects of essential oils and some of their components on *Varroa destructor* Oud. and *Apis mellifera* L. under laboratory conditions. ALP science, Nr. 495. Accessed on 24 February 2014  
[http://www.agroscope.admin.ch/publikationen/02121/03152/index.html?lang=it&sort\[2\\_0\]=0&dir\[2\\_0\]=asc&page\[2\\_0\]=1](http://www.agroscope.admin.ch/publikationen/02121/03152/index.html?lang=it&sort[2_0]=0&dir[2_0]=asc&page[2_0]=1).
- Amdam G, Hartfelder K, Norberg K, Hagen A, Omholt S (2004a) Altered physiology in worker honey bees (Hymenoptera: Apidae) infested with the mite *Varroa destructor* (Acari: Varroidae): a factor in colony loss during overwintering? *Journal of Economic Entomology* **97**, 741-747.
- Amdam GV (2011) Social context, stress, and plasticity of aging. *Aging Cell* **10**(1), 18-27.
- Amdam GV, Aase ALTO, Seehuus S-C, Kim Fondrk M, Norberg K, Hartfelder K (2005) Social reversal of immunosenescence in honey bee workers. *Experimental Gerontology* **40**(12), 939-947.
- Amdam GV, Norberg K, Hagen A, Omholt SW (2003) Social exploitation of vitellogenin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(4), 1799-802.
- Amdam GV, Simões ZLP, Hagen A, Norberg K, Schrøder K, Mikkelsen Ø, Kirkwood TBL, Omholt SW (2004b) Hormonal control of the yolk precursor vitellogenin regulates immune function and longevity in honeybees. *Experimental Gerontology* **39**(5), 767-773.
- Ament SA, Chan QW, Wheeler MM, Nixon SE, Johnson SP, Rodriguez-Zas SL, Foster LJ, Robinson GE (2011) Mechanisms of stable lipid loss in a social insect. *Journal of Experimental Biology* **214**(Pt 22), 3808-21. [In eng]
- Amir OG, Peveling R (2004) Effect of triflumuron on brood development and colony survival of free-flying honeybee, *Apis mellifera* L. *Journal of Applied Entomology* **128**(4), 242-249.
- Amiri E, Meixner M, Büchler R, Kryger P (2014) Chronic Bee Paralysis Virus in Honeybee Queens: Evaluating Susceptibility and Infection Routes. *Viruses* **6**(3), 1188-1201.
- Ammor MS, Gueimonde M, Danielsen M, Zagorec M, van Hoek AHAM, de los Reyes-Gavilán CG, Mayo B, Margolles A (2008) Two Different Tetracycline Resistance Mechanisms, Plasmid-Carried tet(L) and Chromosomally Located Transposon-Associated tet(M), Coexist in *Lactobacillus sakei* Rits 9. *Applied and environmental microbiology* **74**(5), 1394-1401.
- Amorena M, Visciano P, et al. (2009) Monitoring of levels of polycyclic aromatic hydrocarbons in bees caught from beekeeping: remark 1. *Veterinary Research Communications* **33**(1), 165-167.
- Anderson DL (1991) Kashmir bee virus - a relatively harmless virus of honey bee colonies. *American Bee Journal*(131), 767-770.
- Anderson DL (1993) Pathogens and queen bees. *Australasian Beekeeper* (94), 292-296.

- Anderson DL, Trueman JW (2000) *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) is more than one species. *Exp Appl Acarol* **24**(3), 165-89.
- Anderson J, Wojtas M (1986) Honey bees (Hymenoptera : Apidae) contaminated with pesticides and polychlorinated biphenyls. *Journal of Economic Entomology*(79), 1200-1205.
- Anderson KE, Sheehan TH, Eckholm BJ, Mott BM, DeGrandi-Hoffman G (2011) An emerging paradigm of colony health: microbial balance of the honey bee and hive (*Apis mellifera*). *Insectes Sociaux* **58**, 431-444.
- Anses (2012a) Avis de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail du 25 avril 2012 relatif à la prise en compte des conclusions d'une publication scientifique dans le contexte multifactoriel de dépopulation des colonies d'abeilles <https://www.anses.fr/sites/default/files/documents/SANT2011sa0233.pdf>.
- Anses (2012b) Avis de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif à la publication de l'article de Vidau et al. portant sur les effets d'une exposition d'abeilles infectées par *Nosema ceranae* à des doses sublétales de fipronil et de thiaclopride <https://www.anses.fr/sites/default/files/documents/DPR2011sa0333.pdf>.
- Anses (2012c) Avis de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif à une demande d'appui scientifique et technique dans la perspective de la publication de l'article "A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees" <https://www.anses.fr/sites/default/files/documents/DPR2012sa0092.pdf>.
- Anses (2013) Surveillance de la santé des abeilles en France : résultats du programme pilote conduit dans le département de la Drôme en 2011-2012. *Bulletin Epidémiologique Santé Animale-Alimentation*(56), 36p.
- Antunez K, Anido M, Garrido-Bailon E, Botias C, Zunino P, Martinez-Salvador A, Martin-Hernandez R, Higes M (2012) Low prevalence of honeybee viruses in Spain during 2006 and 2007. *Res Vet Sci* **93**(3), 1441-5.
- Antúnez K, D'Alessandro B, Corbella E, Ramallo G, Zunino P (2006) Honeybee viruses in Uruguay. *Journal of invertebrate pathology* **93**(1), 67-70.
- Antunez K, Harriet J, Gende L, Maggi M, Eguaras M, Zunino P (2008) Efficacy of natural propolis extract in the control of American Foulbrood. *Vet Microbiol* **131**(3-4), 324-31. [In eng]
- Antúnez K, Martín-Hernández R, Prieto L, Meana A, Zunino P, Higes M (2009) Immune suppression in the honey bee (*Apis mellifera*) following infection by *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Environmental microbiology* **11**(9), 2284-2290.
- Arca M, Papachristoforou A, et al. (2014) Defensive behaviour of *Apis mellifera* against *Vespa velutina* in France: Testing whether European honeybees can develop an effective collective defence against a new predator. *Behavioural Processes* **106**(0), 122-129.
- Ardia DR, Gantz JE, Schneider BC, Strebel S (2012) Costs of immunity in insects: an induced immune response increases metabolic rate and decreases antimicrobial activity. *Functional Ecology* **26**(3), 732-739. [In English]
- Ares AM, Nozal MJ, Bernal JL, Martín-Hernández R, M.Higes, Bernal J (2012) Liquid chromatography coupled to ion trap-tandem mass spectrometry to evaluate juvenile hormone III levels in bee hemolymph from *Nosema* spp. infected colonies. *Journal of Chromatography B* **899**(0), 146-153.
- Aronstein K, Murray K, Saldivar E (2010) Transcriptional responses in Honey Bee larvae infected with chalkbrood fungus. *BMC Genomics* **11**(1), 391.
- Aronstein KA, Murray KD (2010) Chalkbrood disease in honey bees. *J Invertebr Pathol* (103 Suppl 1), S20-29.
- Aronstein KA, Murray KD, de León JH, Qin X, Weinstock GM (2007) High mobility group (HMG-box) genes in the honeybee fungal pathogen *Ascosphaera apis*. *Mycologia* **99**(4), 553-561.

- Ashour B, Tribe M, Whittaker P (1980) The effect of chloramphenicol, ethidium bromide and cycloheximide on mortality and mitochondrial protein synthesis of adult blowflies. *Journal of Cell Science* **41**(1), 273-289.
- Atkins E (1992) Injury to honey bees by poisoning. In 'The hive and the honey bee.' Ed. H-IDA Sons) pp. 1324 p.)
- Atkins L, Kellum D, Atkins KW (1981) Reducing pesticide hazards to honey bees. University of California Division of Agricultural Sciences Leaflet 2883.
- Aufauvre J, Biron D, *et al.* (2012) Parasite-insecticide interactions: a case study of *Nosema ceranae* and fipronil synergy on honeybee. *Sci. Rep.* **2**.
- Aufauvre J, Misme-Aucouturier B, Viguès B, Texier C, Delbac F, Blot N (2014) Transcriptome Analyses of the Honeybee Response to *Nosema ceranae* and Insecticides. *PLoS ONE* **9**(3), e91686.
- Aupinel P, Fortini D, Michaud B, Marolleau F, Tasei J-N, Odoux J-F (2007a) Toxicity of dimethoate and fenoxycarb to honey bee brood (*Apis mellifera*), using a new in vitro standardized feeding method. *Pest Management Science* **63**(11), 1090-1094.
- Aupinel P, Medrzycki P, Fortini D, Michaud B, Tasei J, Odoux J (2007b) A new larval *in vitro* rearing method to test effects of pesticides on honey bee brood. *Redia*(90), 91-94.
- Azzami K, Ritter W, Tautz J, Beier H (2012) Infection of honey bees with acute bee paralysis virus does not trigger humoral or cellular immune responses. *Arch Virol* **157**(4), 689-702. [In eng]
- Babendreier D, Kalberer N, Romeis J, Fluri P, Bigler F (2004) Pollen consumption in honey bee larvae: a step forward in the risk assessment of transgenic plants. *Apidologie* **35**(3), 293-300.
- Babendreier D, Kalberer NM, Romeis J, Fluri P, Mulligan E, Bigler F (2005) Influence of Bt-transgenic pollen, Bt-toxin and protease inhibitor (SBTI) ingestion on development of the hypopharyngeal glands in honeybees. *Apidologie* **36**(4), 585-594.
- Babendreier D, Reichhart B, Romeis J, Bigler F (2008) Impact of insecticidal proteins expressed in transgenic plants on bumblebee microcolonies. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **126**(2), 148-157.
- Badiou-Bénéteau A, Carvalho SM, Brunet J-L, Carvalho GA, Buleté A, Giroud B, Belzunces LP (2012) Development of biomarkers of exposure to xenobiotics in the honey bee *Apis mellifera*: Application to the systemic insecticide thiamethoxam. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **82**, 22-31.
- Baggio A, Arculeo P, Nanetti A, Marinelli E, Mutinelli F (2004) Field Trials with Different Thymol-based Products for the Control of Varroosis. *American Bee Journal* (144), 395-400.
- Bailey L (1953) Effect of Fumagillin upon *Nosema apis* (Zander). *Nature* **171**(4344), 212-213.
- Bailey L (1958) The epidemiology of the infestation of the honeybee, *Apis mellifera* L., by the mite *Acarapis woodi* Rennie and the mortality of infested bees. *Parasitology* **48**, 493-506.
- Bailey L (1961) The natural incidence of *Acarapis woodi* (rennie) and the winter mortality of honeybee colonies. *Bee world* **42**(4), 96-100.
- Bailey L (1965) Paralysis of the honey bee, *Apis mellifera* Linnaeus. *Journal of invertebrate pathology* **7**(2), 132-140.
- Bailey L (1967) The incidence of virus diseases in the honey bee. *Annals of Applied Biology* **60**(1), 43-48.
- Bailey L (1968) The multiplication of sacbrood virus in the adult honeybee. *Virology* **36**(2), 312-3.
- Bailey L, Ball BV (1991) 'Honey bee pathology.' 2nd edn. (Academic Press: London)
- Bailey L, Ball BV, Perry JN (1981) The prevalence of viruses of honey bees in Britain. *Annals of Applied Biology* (97), 109-118.
- Bailey L, Ball BV, Perry JN (1983) Association of viruses with two protozoal pathogens of the honey bee. *Ann. Appl. Biol.* **103**, 13-20.

- Bailey L, Ball BV, Woods RD (1976) An Iridovirus from Bees. *Journal of General Virology* **31**(3), 459-461.
- Bailey L, Carpenter JM, Woods RD (1979) Egypt Bee Virus and Australian Isolates of Kashmir Bee Virus. *Journal of General Virology* **43**(3), 641-647.
- Bailey L, Gibbs AJ (1964) Acute infection of bees with paralysis virus. *Journal of insect pathology* (6), 395-407.
- Bailey L, Gibbs AJ, Woods RD (1963) Two viruses from adult honey bees (*Apis mellifera* Linnaeus). *Virology* **21**(3), 390-395.
- Bailey L, Gibbs AJ, Woods RD (1964) Sacbrood virus of the larval honey bee (*Apis mellifera* Linnaeus). *Virology* **23**(3), 425-429.
- Bailey L, Gibbs AJ, Woods RD (1968) Purification and Properties of Chronic Bee-paralysis Virus. *Journal of General Virology* **2**(2), 251-260, NP.
- Bailey L, Milne RG (1969) The Multiplication Regions and Interaction of Acute and Chronic Bee-paralysis Viruses in Adult Honey Bees. *Journal of General Virology* **4**(1), 9-12, NP1-NP2, 13-14.
- Bailey L, Woods RD (1977) Two More Small RNA Viruses from Honey Bees and Further Observations on Sacbrood and Acute Bee-Paralysis Viruses. *Journal of General Virology* **37**(1), 175-182.
- Baker A, Schroeder D (2008) Occurrence and genetic analysis of picorna-like viruses infecting worker bees of *Apis mellifera* L. populations in Devon, South West England. *Journal of invertebrate pathology* **98**(2), 239-42.
- Baker HG, Baker I (1982) Chemical constituents of nectar in relation to pollination mechanisms and phylogeny. In 'Biochemical aspects of evolutionary biology.' Ed. HM Nitecki) pp. 131-171. (Chicago University Press: Chicago, IL)
- Bakonyi T, Farkas R, Szendrői A, Dobos-Kovács M, Rusvai M (2002a) Detection of acute bee paralysis virus by RT-PCR in honey bee and *Varroa destructor* field samples: rapid screening of representative Hungarian apiaries. *Apidologie* **33**(1), 63-74.
- Bakonyi T, Grabensteiner E, Kolodziejek J, Rusvai M, Topolska G, Ritter W, Nowotny N (2002b) Phylogenetic analysis of acute bee paralysis virus strains. *Applied and Environmental Microbiology* **68**(12), 6446-50.
- Balch JF, Balch PA (1990) Prescription for Nutritional Healing. In '.' pp. 18–39. (Avery Publishing Group Inc: New York)
- Ball B (1983) The association of *Varroa jacobsoni* with virus diseases of honey bees. *Experimental And Applied Acarology* (19), 607-613.
- Ball B (1985) Acute paralysis virus isolates from honey bee colonies infected with *Varroa jacobsoni*. *Journal of Apicultural Research*(24), 115-119.
- Ball BV (1989) Present status of varroaosis in Europe and progress in the *Varroa* mite control. In 'Varroa jacobsoni as a virus vector.' pp. 241-244. (Cavalloro, R. Editor: Udine, Italy)
- Ball BV, Allen MF (1988) The prevalence of pathogens in honey bee (*Apis mellifera*) colonies infested with the parasitic mite *Varroa jacobsoni*. *Annals of Applied Biology* **113**(2), 237-244.
- Ball BV, Bailey L (1997) Viruses. In 'Honey bee pests, predators, & diseases. Morse, R. A. Flottum, K. Editors, A.I. Root Company, Medina. p 11-32.'
- Barker RJ (1977) Some carbohydrates found in pollen and pollen substitutes are toxic to honey bees. *J. Nutr.* **107**, 1859-1862.
- Barker RJ (1990) Poisoning by plants. In 'Honey bee pests, predators, and diseases.' (Eds RA Morse and R Nowogrodzki) pp. 306-328. (Cornell University Press: New York and London)
- Barker RJ, Lehner Y (1974) Acceptance and sustenance value of naturally occurring sugars fed to newly emerged adult workers of honey bees (*Apis mellifera* L.). *J. Exp. Zool.* **187**, 277-285.



- Barker RJ, Lehner Y (1976) Galactose a sugar toxic to honey bees found in exudate of tulip flowers. *Apidologie* **7**, 109-112.
- Baron GL, Raine NE, Brown MJF (2014) Impact of chronic exposure to a pyrethroid pesticide on bumblebees and interactions with a trypanosome parasite. *Journal of Applied Ecology* **51**(2), 460-469.
- Barron AB, Maleszka R, Vander Meer RK, Robinson GE (2007) Octopamine modulates honey bee dance behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**(5), 1703-1707.
- Basim E, Basim H, Ozcan M (2006) Antibacterial activities of Turkish pollen and propolis extracts against plant bacterial pathogens. *Journal of Food Engineering* **77**, 992-996.
- Bastos EM, Simone M, Jorge DM, Soares AE, Spivak M (2008) In vitro study of the antimicrobial activity of Brazilian propolis against *Paenibacillus* larvae. *J Invertebr Pathol* **97**(3), 273-81. [In eng]
- Batra LR, Batra SWT, Bohart GE (1973) The mycoflora of domesticated and wild bees (Apoidea). *Mycopathol. Mycol. Appl* **49**, 13-44.
- Bauer L, Miller D, Maddox J, McManus M (1998) Interactions between a *Nosema* sp. (Microspora: Nosematidae) and Nuclear Polyhedrosis Virus Infecting the Gypsy Moth, *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae). *Journal of invertebrate pathology* **72**(2), 147-153.
- Becher M, Grimm V, Thorbek P, Horn J, Kennedy P, Osborne J (2014) BEEHAVE: a systems model of honeybee colony dynamics and foraging to explore multifactorial causes of colony failure. *Journal of Applied Ecology* **51**(2), 470-482.
- Becher M, Moritz R (2009) A new device for continuous temperature measurement in brood cells of honeybees (*Apis mellifera*). *Apidologie* **40**(5), 577-584.
- Beekman M, Ratnieks FL (2000) Long-range foraging by the honey-bee, *Apis mellifera*. *Functional Ecology* **14**, 490-496.
- Beetsma J, Boot W, Jan, Calis J (1999) Invasion behaviour of *Varroa jacobsoni* Oud.: from bees into brood cells. *Apidologie* **30**(2-3), 125-140.
- Beggs JR, Brockerhoff EG, Corley JC, Kenis M, Masciocchi M, Muller F, Rome Q, Villemant C (2011) Ecological effects and management of invasive alien Vespidae. *BioControl* **56**(4), 505-526.
- Beliën T, Kellers J, Heylen K, Keulemans W, Billen J, Arckens L, Huybrechts R, Gobin B (2009) Effects of sublethal doses of crop protection agents on honey bee (*Apis mellifera*) global colony vitality and its potential link with aberrant foraging activity. *Communications in agricultural and applied biological sciences* **74**(1), 245-253.
- Belloy L, Imdorf A, Fries I, Forsgren E, Berthoud H, Kuhn R, Charrière J-D (2007) Spatial distribution of *Melissococcus plutonius* in adult honey bees collected from apiaries and colonies with and without symptoms of European foulbrood. *Apidologie* **38**(2), 136-140.
- Belzunces L, Tchamitchian S, Brunet J-L (2012) Neural effects of insecticides in the honey bee. *Apidologie* **43**(3), 348-370.
- Bencsik M, Bencsik J, Baxter M, Lucian A, Romieu J, Millet M (2011) Identification of the honey bee swarming process by analysing the time course of hive vibrations. *Computers and Electronics in Agriculture* **76**(1), 44-50.
- Bendahou N, Bounias M, Fleche C (1997) Acute toxicity of cypermethrin and fenitrothion on honeybees *Apis mellifera mellifera* according to age, formulations and chronic paralysis virus/insecticide interaction. *Journal of Environmental Biology* **18**(1), 55-65.
- Benjeddou M, Leat N, Allsopp M, Davison S (2001) Detection of Acute Bee Paralysis Virus and Black Queen Cell Virus from Honeybees by Reverse Transcriptase PCR. *Applied and environmental microbiology* **67**(5), 2384-2387.
- Benjeddou M, Leat N, Davison S (2002) Black queen-cell virus RNA is infectious in honey bee pupae. *Journal of Invertebrate Pathology* **81**(3), 205-6.

- Benoit JB, Yoder JA, Sammataro D, Zettler LW (2004) Mycoflora and fungal vector capacity of the parasitic mite *Varroa destructor* (Mesostigmata: Varroidae) in honey bee (Hymenoptera: Apidae) colonies. *International Journal of Acarology* **30**, 103-106.
- Berényi O, Bakonyi T, Derakhshifar I, Köglberger H, Nowotny N (2006) Occurrence of six honeybee viruses in diseased Austrian apiaries. *Applied and environmental microbiology* **72**(4), 2414-20.
- Bernadou A, Démarets F, Couret-Fauvel T, Sandoz JC, Gauthier M (2009) Effect of fipronil on side-specific antennal tactile learning in the honeybee. *Journal of Insect Physiology* **55**(12), 1099-1106.
- Bernal J, Garrido-Bailón E, Del Nozal MJ, González-Porto AV, Martín-Hernández R, Diego JC, Jiménez JJ, Bernal JL, Higes M (2010) Overview of Pesticide Residues in Stored Pollen and Their Potential Effect on Bee Colony (*Apis mellifera*) Losses in Spain. *Journal of Economic Entomology* **103**(6), 1964-1971.
- Bernal J, Martín-Hernández R, Diego JC, Nozal MJ, Gozalez-Porto AV, Bernal JL, Higes M (2011) An exposure study to assess the potential impact of fipronil in treated sunflower seeds on honey bee colony losses in Spain. *Pest Manag Sci* **67**(10), 1320-31.
- Berry J (2009) Pesticides, bees and wax: an unhealthy, untidy mix. *Bee culture*(137), 33-35.
- Bicker G (1999) Histochemistry of classical neurotransmitters in antennal lobes and mushroom bodies of the honeybee. *Microscopy Research and Technique* **45**(3), 174-183.
- Bijleveld van Lexmond M, Bonmatin J, Goulson D, Noome D (2015) Worldwide integrated assessment on systemic pesticides. *Environmental Science and Pollution Research* **22**(1), 1-4.
- Bindokas VP, Gauger JR, Greenberg B (1988) Mechanism of Biological Effects Observed in Honey Bees (*Apis-Mellifera*, L) Hived under Extra-High-Voltage Transmission-Lines - Implications Derived from Bee Exposure to Simulated Intense Electric-Fields and Shocks. *Bioelectromagnetics* **9**(3), 285-301. [In English]
- Bitondi MMG, Mora IM, Simões ZLP, Figueiredo VLC (1998) The *Apis mellifera* pupal melanization program is affected by treatment with a juvenile hormone analogue. *Journal of Insect Physiology* **44**(5-6), 499-507.
- Blacquièrre T, Smagghe G, van Gestel CM, Mommaerts V (2012) Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment. *Ecotoxicology* **21**(4), 973-992.
- Blanchard P, Carletto J, Siede R, Schurr F, Thiéry R, Ribière M (2014a) Identification of Kashmir bee virus in France using a new RT-PCR method which distinguishes closely related viruses. *Journal of Virological Methods* **198**(0), 82-85.
- Blanchard P, Guillot S, *et al.* (2014b) Development and validation of a real-time two-step RT-qPCR TaqMan® assay for quantitation of Sacbrood virus (SBV) and its application to a field survey of symptomatic honey bee colonies. *Journal of Virological Methods* **197**(0), 7-13.
- Blanchard P, Regnault J, Schurr F, Dubois E, Ribière M (2012) Intra-laboratory validation of chronic bee paralysis virus quantitation using an accredited standardised real-time quantitative RT-PCR method. *Journal of Virological Methods* **180**(1-2), 26-31.
- Blanchard P, Ribière M, Celle O, Lallemand P, Schurr F, Olivier V, Iscache AL, Faucon JP (2007) Evaluation of a real-time two-step RT-PCR assay for quantitation of Chronic bee paralysis virus (CBPV) genome in experimentally-infected bee tissues and in life stages of a symptomatic colony. *Journal of Virological Methods* **141**(1), 7-13.
- Blanchard P, Schurr F, Celle O, Cougoule N, Drajnudel P, Thiéry R, Faucon J-P, Ribière M (2008) First detection of Israeli acute paralysis virus (IAPV) in France, a dicistrovirus affecting honeybees (*Apis mellifera*). *Journal of invertebrate pathology* **99**(3), 348-350.
- Blanchard P, Schurr F, *et al.* (2009) Phylogenetic analysis of the RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) and a predicted structural protein (pSP) of the Chronic bee paralysis virus (CBPV) isolated from various geographic regions. *Virus Res* **144**(1-2), 334-8.

- Bloch G, Sullivan JP, Robinson GE (2002) Juvenile hormone and circadian locomotor activity in the honey bee *Apis mellifera*. *Journal of Insect Physiology* **48**(12), 1123-1131.
- Boecking O, Spivak M (1999) Behavioral defenses of honey bees against *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie* **30**(2-3), 141-158. [In English]
- Bogdanov S (2004) Quality and standards for pollen and beeswax. *Apiacta*(38), 334-341.
- Bogdanov S (2006) Contaminants of bee products. *Apidologie* **37**(1), 1-18.
- Bogdanov S, Imdorf A, Kilchenmann V (1998a) Residues in wax and honey after Apilife VAR® treatment. *Apidologie* **29**(6), 513-524.
- Bogdanov S, Kilchenmann V, Imdorf A (1998b) Acaricide residues in some bee products. *Journal of Apicultural Research*(37), 57-67.
- Bonabeau E (2002) Agent-based modeling: Methods and techniques for simulating human systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**(suppl 3), 7280-7287.
- Boncristiani H, Underwood R, Schwarz R, Evans JD, Pettis J, vanEngelsdorp D (2012) Direct effect of acaricides on pathogen loads and gene expression levels in honey bees *Apis mellifera*. *Journal of Insect Physiology* **58**(5), 613-20.
- Boncristiani HF, Evans JD, et al. (2013) *In Vitro* Infection of Pupae with Israeli Acute Paralysis Virus Suggests Disturbance of Transcriptional Homeostasis in Honey Bees (*Apis mellifera*). *PLoS ONE* **8**(9), e73429.
- Bonmatin J, Bonnat J, et al. (1992) Two-dimensional <sup>1</sup>H NMR study of recombinant insect defensin A in water: resonance assignments, secondary structure and global folding. *J Biomol NMR* **2**(3), 235-256.
- Bonmatin J, Marchand P, Cotte J, Aajoud A, Casabianca H, Goutailler G, Courtiade M (2007) Bees and systemic insecticides (imidacloprid, fipronil) in pollen: subnano-quantification by HPLC/MS/MS and GC/MS. In 'Environmental Fate and Ecological Effects of Pesticide (Del Re A.A.M., Capri E., Fragoulis, Trevisan M),'. Ed. P Eds. La Goliardica Pavese, (It) pp. 827-834
- Bonmatin JM, Giorio C, et al. (2015) Environmental fate and exposure; neonicotinoids and fipronil. *Environmental Science and Pollution Research* **22**(1), 35-67.
- Borchert A (1970) Maladie de l'île de Wight. In : Les maladies et parasites des abeilles. Editions Vigot frères. Paris. 486 pages. p 276.
- Bortolotti L, Montanari R, Marcelino J, Medrzycki P, Maini S, Porrini C (2003) Effects of sub-lethal imidacloprid doses on the homing rate and foraging activity of honey bees. *Bulletin of Insectology* **56**, 63-67.
- Borum AE, Ulgen M (2008) Chalkbrood (*Ascosphaera apis*) infection and fungal agents of honey bees in north-west Turkey. *Journal of Apicultural Research* **47** (2), 170-171.
- Bos C, Masson C (1983) Analyse des effets, en particulier de la répulsivité, d'un pyréthrianoïde de synthèse, la deltaméthrine, sur les abeilles. *Revue d'Agronomie* **3**, 545-553.
- Botias C, Anderson DL, Meana A, Garrido-Bailon E, Martin-Hernandez R, Higes M (2012a) Further evidence of an oriental origin for *Nosema ceranae* (Microsporidia: Nosematidae). *J Invertebr Pathol* **110**(1), 108-13.
- Botías C, Martín-Hernández R, Barrios L, Garrido-Bailón E, Nanetti A, Meana A, Higes M (2012) *Nosema* spp. parasitization decreases the effectiveness of acaricide strips (Apivar®) in treating varroosis of honey bee (*Apis mellifera iberiensis*) colonies. *Environmental Microbiology Reports* **4**(1), 57-65.
- Botias C, Martin-Hernandez R, et al. (2012b) The effect of induced queen replacement on *Nosema* spp. infection in honey bee (*Apis mellifera iberiensis*) colonies. *Environ Microbiol* **14**(4), 845-59.
- Botias C, Martin-Hernandez R, Garrido-Bailon E, Gonzalez-Porto A, Martinez-Salvador A, De la Rúa P, Meana A, Higes M (2012c) The growing prevalence of *Nosema ceranae* in honey bees in Spain, an emerging problem for the last decade. *Res Vet Sci* **93**(1), 150-5.

- Botías C, Martín-Hernández R, Meana A, Higes M (2013) Screening alternative therapies to control Nosemosis type C in honey bee (*Apis mellifera iberiensis*) colonies. *Research in veterinary science* **95**(3), 1041-1045.
- Bouga M, Alaux C, et al. (2011) A review of methods for discrimination of honey bee populations as applied to European beekeeping. *Journal of Apicultural Research* **50**(1), 51-84.
- Bounias M, Morgan MRJ, Joliet C (1982) Action du chloramphénicol sur l'évolution du spectre protéique de l'hémolymphe d'abeilles nourries sur sirops de saccharose et de tréhalose *Apidologie* **13**(2), 115-126.
- Bourgeois L, Beaman L, Holloway B, Rinderer TE (2012) External and internal detection of *Nosema ceranae* on honey bees using real-time PCR. *Journal of invertebrate pathology* **109**(3), 323-325.
- Bowen-Walker PL, Martin SJ, Gunn A (1999) The transmission of deformed wing virus between honeybees (*Apis mellifera* L.) by the ectoparasitic mite *Varroa jacobsoni* Oud. *J Invertebr Pathol* **73**, 101-106.
- Brasse D (2001) Stellungnahme der BBA zum Streptomycin-Problem. Teil 2: Bewertung der Rückstandswerte im Honig. *Allgemeine Deutsche Imkerzeitung* **35** 24-25.
- Briggs S (1992) 'Basic guide to pesticides.' (Hemisphere Publishing: Washington DC) 283
- Brodtschneider R, Crailsheim K (2010) Nutrition and health in honey bees. *Apidologie* **41**, 278-294.
- Brodsgaard HF, Brodsgaard CJ, Hansen H, Lövei GL (2003) Environmental risk assessment of transgene products using honey bee (*Apis mellifera*) larvae. *Apidologie* **34**(2), 139-145.
- Bromenshenk JJ, Henderson CB, et al. (2010) Iridovirus and Microsporidian Linked to Honey Bee Colony Decline. *PLoS ONE* **5**(10), e13181.
- Brudford MW, Bradley DG, Luikart G (2003) DNA markers reveal the complexity of livestock domestication. *Nature Review: Genetics* **4**, 900-910.
- Brunet J-L (2013) Effets des interactions toxicopathologiques sur la qualité du sperme, la fécondité et la durée de vie des reines chez l'abeille. Rapport final\_ Convention INRA-FranceAgrimer 11-42 R.
- Brunet J-L, Badiou A, Belzunces LP (2005) In vivo metabolic fate of [14C]-acetamidiprid in six biological compartments of the honeybee, *Apis mellifera* L. *Pest Management Science* **61**(8), 742-748.
- Buchmann S, Thoenes S (1990) The electronic scale honey bee colony as management and research tool. *Bee Science* **1**(1), 40-47.
- Budge GE, Shirley MDF, Jones B, Quill E, Tomkies V, Feil EJ, Brown Ma, Haynes EG (2014) Molecular epidemiology and population structure of the honey bee brood pathogen *Melissococcus plutonius*. *The ISME journal* **8**(8), 1588-97.
- Bull JC, Ryabov EV, Prince G, Mead A, Zhang C, Baxter LA, Pell JK, Osborne JL, Chandler D (2012) A strong immune response in young adult honeybees masks their increased susceptibility to infection compared to older bees. *PLoS Pathog* **8**(12), e1003083. [In eng]
- Bunsen J (1991) Experimentelle Untersuchungen zur Bekämpfung der Milbe *Varroa jacobsoni* Oud., einem Ektoparasit der Honigbiene (*Apis mellifera* L.) mit Stoffen natürlicher Herkunft. Justus-Liebig-Universität Giessen,
- Burgett M, Burikam I (1985) Number of adult honey bees (Hymenoptera: Apidae) occupying a comb: a standard for estimating colony populations. *Journal of Economic Entomology* **78**, 1154-1156.
- Burley LM, Fell RD, Saacke RG (2008) Survival of Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Spermatozoa Incubated at Room Temperature from Drones Exposed to Miticides. *Journal of Economic Entomology* **101**(4), 1081-1087.
- Burrill RM, Dietz A (1981) The Response of Honey Bees to Variations in Solar-Radiation and Temperature. *Apidologie* **12**(4), 319-328. [In English]

- Butzloff P (2011) Micro-CT Imaging of Denatured Chitin by Silver to Explore Honey Bee and Insect Pathologies. *PLoS ONE* **6**(11), e27448.
- Campbell J, Mummert L, Sukthankar R (2008) Video monitoring of honey bee colonies at the hive entrance. In 'Workshop of visual observation and analysis of behavior at international conference of pattern recognition.' pp. 11–14)
- Campos MG, Webby RF, Markham KR, Mitchell KA, Da Cunha AP (2003) Aged induced diminution of free radicals scavenging capacity in bee-pollens and the contribution of constituents flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**, 742-745.
- Carletto J, Blanchard P, Gauthier A, Schurr F, Chauzat M-P, Ribière M (2013) Improving molecular discrimination of *Nosema apis* and *Nosema ceranae*. *Journal of invertebrate pathology* **113**(1), 52-55.
- Carletto J, Gauthier A, Regnault J, Blanchard P, Schurr F, M. R-C (2010) Detection of main honey bee pathogens by multiplex PCR. *EuroReference*(4), ER04-10R02. <http://www.ansespro.fr/euroreference/numero4/PN6010.htm>.
- Caron D, Burdick E, Ostiguy N, Frazier M (2005) Mid-Atlantic Apiculture Research and Extension Consortium Survey Preliminaries. Department of Entomology, 501 Ag Sciences & Industries Bldg., Penn State University, PA 16802 and Dept of Entomology, 250 Townsend Hall, University of Delaware, Newark, DE, 7 p.
- Casida JE, Durkin KA (2013) Neuroactive Insecticides: Targets, Selectivity, Resistance, and Secondary Effects. *Annual Review of Entomology* **58**(1), 99-117.
- Celle O, Blanchard P, Olivier V, Schurr F, Cougoule N, Faucon J-P, Ribière M (2008) Detection of Chronic bee paralysis virus (CBPV) genome and its replicative RNA form in various hosts and possible ways of spread. *Virus Research* **133**(2), 280-284.
- Cepero A, Martín-Hernández R, Prieto L, Gómez-Moracho T, Martínez-Salvador A, Bartolomé C, Maside X, Meana A, Higes M (2015) Is *Acarapis woodi* a single species? A new PCR protocol to evaluate its prevalence. *Parasitology Research* **114**(2), 651-658.
- Chaimanee V, Chantawannakul P, Chen Y, Evans JD, Pettis JS (2012) Differential expression of immune genes of adult honey bee (*Apis mellifera*) after inoculated by *Nosema ceranae*. *Journal of Insect Physiology* **58**(8), 1090-1095.
- Chaimanee V, Pettis JS, Chen Y, Evans JD, Khongphinitbunjong K, Chantawannakul P (2013) Susceptibility of four different honey bee species to *Nosema ceranae*. *Veterinary Parasitology* **193**(1–3), 260-265.
- Chaimanee V, Warrit N, Chantawannakul P (2010) Infections of *Nosema ceranae* in four different honeybee species. *Journal of invertebrate pathology* **105**(2), 207-210.
- Chalvet-Monfray K, Sabatier P, Belzunces LP, Colin ME, Fléché C (1996) Synergy between deltamethrin and prochloraz in bees: Modeling approach. *Environmental Toxicology and Chemistry* **15**(4), 525-534.
- Chan Q, Cornman RS, et al. (2011) Updated genome assembly and annotation of *Paenibacillus larvae*, the agent of American foulbrood disease of honey bees. *BMC Genomics* **12**(1), 450.
- Chandel R, Gupta P (1992) Toxicity of diflubenzuron and penfluron to immature stages of *Apis cerana indica* F and *Apis mellifera* L. *Apidologie* **23**(5), 465-473.
- Chantawannakul P, Ward L, Boonham N, Brown M (2006) A scientific note on the detection of honeybee viruses using real-time PCR (TaqMan) in *Varroa mites* collected from a Thai honeybee (*Apis mellifera*) apiary. *Journal of Invertebrate Pathology* **91**(1), 69-73.
- Chapman NC, Lim J, Oldroyd BP (2008) Population genetics of commercial and feral honey bees in Western Australia. *Journal of Economic Entomology* **101**, 272-277.
- Charpentier G, Louat F, Bonmatin J, Marchand P, Vanier F, Locker D, Decoville M (2014a) Lethal and sublethal effects of imidacloprid, after chronic exposure, on the insect model *Drosophila melanogaster*. *Environmental Science & Technology* **48**(7), 4096-4102.

- Charpentier G, Vidau C, Ferdy J-B, Tabart J, Vetillard A (2014b) Lethal and sub-lethal effects of thymol on honeybee (*Apis mellifera*) larvae reared *in vitro*. *Pest Management Science* **70**(1), 140-147.
- Chauvin R (1968) *Traité de biologie de l'abeille*. Elsevier/Masson. 566 p.
- Chauzat M, Carpentier P, Madec F, Bougeard S, Cougoule N, Drajnudel P, Clément M, Aubert M, Faucon J (2010) The role of infectious agents and parasites in the health of honey bee colonies in France. *Journal of Apicultural Research* **49**, 31-39.
- Chauzat M, Higes M, Meana A, Cougoule N, Faucon J (2007) Presence of *Nosema ceranae* in French honey bee colonies. *Journal of Apicultural Research* **46**, 127-128.
- Chauzat M, Laurent M, Rivière M, Saugeon C, Hendrikx P, Ribière-Chabert M (2014) Epilobee. A pan-European epidemiological study on honeybee colony losses 2012-2013. In 'Bee-Health Conference. European Commission.' pp. 1-32)
- Chauzat M, Martel A, Cougoule N, Porta P, Lachaize J, Zeggane S, Aubert M, Carpentier P, Faucon J (2011) An assessment of honeybee colony matrices, *Apis mellifera* (Hymenoptera : Apidae), to monitor pesticide presence in continental France *Environmental Toxicology and Chemistry* **30**(1), 103-111.
- Chauzat MP, Carpentier P, *et al.* (2009) Influence of pesticide residues on honey bee (Hymenoptera: Apidae) colony health in France. *Environ Entomol* **38**(3), 514-23.
- Chen Y, Evans J (2007) Historical presence of Israeli Acute Paralysis Virus in the United States. *American Bee Journal*(147), 1027-1028.
- Chen Y, Evans JD, Smith IB, Pettis JS (2008) *Nosema ceranae* is a long-present and wide-spread microsporidian infection of the European honey bee (*Apis mellifera*) in the United States. *Journal of Invertebrate Pathology* **97**(2), 186-8. [In eng]
- Chen Y, Evans JD, Zhou L, Boncristiani H, Kimura K, Xiao T, Litkowski AM, Pettis JS (2009) Asymmetrical coexistence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology* **101**(3), 204-9.
- Chen YP, Higgins JA, Feldlaufer MF (2005) Quantitative Real-Time Reverse Transcription-PCR Analysis of Deformed Wing Virus Infection in the Honeybee (*Apis mellifera* L.). *Applied and environmental microbiology* **71**(1), 436-441.
- Chen Yp, Pettis J, *et al.* (2013) Genome sequencing and comparative genomics of honey bee microsporidia, *Nosema apis* reveal novel insights into host-parasite interactions. *BMC Genomics* **14**(1), 451.
- Chen YP, Pettis JS, Collins A, Feldlaufer MF (2006) Prevalence and Transmission of Honeybee Viruses. *Applied and environmental microbiology* **72**(1), 606-611.
- Chen YP, Pettis JS, *et al.* (2014) Israeli Acute Paralysis Virus: Epidemiology, Pathogenesis and Implications for Honey Bee Health. *PLoS Pathog* **10**(7), e1004261.
- Chen YP, Pettis JS, Evans JD, Kramer M, Feldlaufer MF (2004) Transmission of Kashmir bee virus by the ectoparasitic mite *Varroa destructor*. *Apidologie* **35**(4), 441-448.
- Chen YP, Siede R (2007) Honey bee viruses. *Advances in Virus Research* **70**, 33-80.
- Chen YW, Chung WP, Wang CH, Solter LF, Huang WF (2012) *Nosema ceranae* infection intensity highly correlates with temperature. *Journal of Invertebrate Pathology* **111**, 264-267.
- Chevin A, Schurr F, Blanchard P, Thiery R, Ribiere M (2012) Experimental infection of the honeybee (*Apis mellifera* L.) with the chronic bee paralysis virus (CBPV): infectivity of naked CBPV RNAs. *Virus Research* **167**(2), 173-8.
- Choe SE, Nguyen LTK, Noh JH, Koh HB, Jean YH, Kweon CH, Kang SW (2012) Prevalence and distribution of six bee viruses in Korean *Apis cerana* populations. *Journal of invertebrate pathology* **109**(3), 330-333.
- Chorbinski P (2004) Identification of *Ascospaera apis* strains using ribosomal DNA sequences. *Medycyna Weterynaryjna* **60**(2), 190-192.

- Ciemniak A, Witczak A, Mocek K (2013) Assessment of honey contamination with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Journal of Environmental Science and Health, Part B* **48**(11), 993-998.
- Clarke D, Whitney H, Sutton G, Robert D (2013) Detection and Learning of Floral Electric Fields by Bumblebees. *Science*. [In Eng]
- Claudianos C, Ranson H, Johnson RM, Biswas S, Schuler MA, Berenbaum MR, Feyereisen R, Oakeshott JG (2006) A deficit of detoxification enzymes: pesticide sensitivity and environmental response in the honeybee. *Insect Mol Biol* **15**(5), 615-36.
- CMDv (2013) Coordination Group for Mutual recognition and Decentralized Procedures – Veterinary, EMA/CMDv/497311/2009 rev. 4, London, 18 March 2013
- Colin M, Belzunces L (1992) Evidence of synergy between prochloraz and deltamethrin in *Apis mellifera* L.: a convenient biological approach. *Pesticide Science* **36**(2), 115-119.
- Colin M, Faucon J, Heinrich A, Ferry R, Giauffret A (1983) Etude du premier foyer français de varroatose de l'abeille. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France* **56**, 89-93.
- Colin ME (1990) Essential oils of labiatae for controlling honey bee varroosis. *J. Appl. Entomol.* (110), 19-25.
- Colin ME, Bonmatin JM, Moineau I, Gaimon C, Brun S, Vermandere JP (2004) A Method to Quantify and Analyze the Foraging Activity of Honey Bees: Relevance to the Sublethal Effects Induced by Systemic Insecticides. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **47**(3), 387-395.
- Collins A, Pettis J, Wilbanks R, Feldlaufer M (2004) Performance of honey bee (*Apis mellifera*) queens reared in beeswax cells impregnated with coumaphos. *Journal of Apicultural Research* **43**(3), 128-134.
- Cook JM, Crozier RH (1995) Sex determination and population biology in the Hymenoptera. *Trends in Ecology and Evolution* **10**, 281-286.
- Copley TR, Jabaji SH (2012) Honeybee glands as possible infection reservoirs of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in naturally infected forager bees. *Journal of Applied Microbiology* **112**(1), 15-24.
- Cornman R, Bennett A, Murray K, Evans J, Elsik C, Aronstein K (2012a) Transcriptome analysis of the honey bee fungal pathogen, *Ascosphaera apis*: implications for host pathogenesis. *BMC Genomics* **13**(1), 1-13.
- Cornman RS, Chen YP, *et al.* (2009) Genomic analyses of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of honey bees. *PLoS Pathog* **5**(6), e1000466.
- Cornman RS, Tarpay DR, Chen Y, Jeffreys L, Lopez D, Pettis JS, VanEngelsdorp D, Evans JD (2012b) Pathogen webs in collapsing honey bee colonies. *PLoS ONE* **7**(8), e43562-e43562.
- Cornman SR, Schatz MC, *et al.* (2010) Genomic survey of the ectoparasitic mite *Varroa destructor*, a major pest of the honey bee *Apis mellifera*. *BMC Genomics* **11**, 602.
- Costa C, Lodesani M, Bienefeld K (2012) Differences in colony phenotypes across different origins and locations: evidence for genotype by environment interactions in the Italian honeybee (*Apis mellifera ligustica*)? *Apidologie* **43**(6), 634-642.
- Costa C, Tanner G, Lodesani M, Maistrello L, Neumann P (2011) Negative correlation between *Nosema ceranae* spore loads and deformed wing virus infection levels in adult honey bee workers. *Journal of invertebrate pathology* **108**(3), 224-225.
- Cox-Foster DL, Conlan S, *et al.* (2007) A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science* **318**(5848), 283-7.
- Crailsheim K, Schneider LHW, Hrassnigg N, Bühlmann G, Brosch U, Gmeinbauer R, Schöffmann B (1992) Pollen consumption and utilization in worker honeybees (*Apis mellifera carnica*): dependence on individual age and function. *Journal of Insect Physiology* **38**, 409-419.
- Crane E (1980) 'A book of honey.' (Oxford university press)
- Cremer S, Armitage SA, Schmid-Hempel P (2007) Social immunity. *Curr Biol* **17**(16), R693-702.

- Cremonese TM, De Jong D, Bitondi MMG (1998) Quantification of hemolymph proteins as a fast method for testing protein diets for honey bees (Hymenoptera : Apidae). *Journal of Economic Entomology* **91**(6), 1284-1289. [In English]
- Cresswell J (2011) A meta-analysis of experiments testing the effects of a neonicotinoid insecticide (imidacloprid) on honey bees. *Ecotoxicology* **20**(1), 149-157.
- Cruden RW, Herman SM, Petterson S (1983) Patterns of nectar production and plant-pollination coevolution. In 'The biology of nectaries.' (Eds B Bentley and T Elias) pp. 80-125. (Columbia University Press: New York, NY)
- CST (2003) Comité scientifique et technique de l'étude multifactorielle des troubles des abeilles\_ Imidaclopride utilisé en enrobage de semences (Gaucho®) et troubles des abeilles Rapport final (<http://agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/rapportfin.pdf>).
- Currie R (1999) Fluvalinate queen tabs for use against *Varroa jacobsoni* Oud.: efficacy and impact on honey bee, *Apis mellifera* L., queen and colony performance. *American Bee Journal* **139**(11), 871-876.
- Dai P-L, Zhou W, Zhang J, Jiang W-Y, Wang Q, Cui H-J, Sun J-H, Wu Y-Y, Zhou T (2012) The effects of Bt Cry1Ah toxin on worker honeybees (*Apis mellifera ligustica* and *Apis cerana cerana*). *Apidologie* **43**(4), 384-391.
- Dainat B, Evans J, Chen Y, Gauthier L, Neumann P (2012a) Dead or alive: Deformed Wing Virus and *Varroa destructor* Reduce the Life Span of Winter Honeybees. *Applied and environmental microbiology* **78**(4), 981-987.
- Dainat B, Evans J, Chen Y, Gauthier L, Neumann P (2012b) Predictive markers of honey bee colony collapse. *PLoS ONE* **7**, e32151.
- Dainat B, Evans JD, Chen YP, Neumann P (2011) Sampling and RNA quality for diagnosis of honey bee viruses using quantitative PCR. *Journal of Virological Methods* **174**(1-2), 150-152.
- Dainat B, Neumann P (2013) Clinical signs of deformed wing virus infection are predictive markers for honey bee colony losses. *Journal of Invertebrate Pathology* **112**(3), 278-80.
- Danka R, Beaman L (2007) Flight Activity of USDA-ARS Russian Honey Bees (Hymenoptera: Apidae) During Pollination of Lowbush Blueberries in Maine. *Journal of Economic Entomology* **100**(2), 267-272.
- Davies TGE, Field LM, Usherwood PNR, Williamson MS (2007) DDT, pyrethrins, pyrethroids and insect sodium channels. *IUBMB Life* **59**(3), 151-162.
- de Groot AP (1953) Protein and amino acid requirements of the honey bee (*Apis mellifica* L.). *Physiol.Comp. Oecol.* **3**, 197-285.
- De Guzman LI, Rinderer TE, Bigalk M, Tubbs H, Bernard SJ (2005) Russian honey bee (Hymenoptera: Apidae) colonies: *Acarapis woodi* (Acari: Tarsonemidae) infestations and overwintering survival. *J Econ Entomol* **98**(6), 1796-801.
- De Jong D, De Jong PH, Goncalves LS (1982) Weight loss and other damage to developing worker honey bees from infestation with *Varroa Jacobsoni*. *Journal of Apicultural Research* **21**(3), 161-167.
- De la Rúa P, Jaffe R, Muñoz I, Serrano J, Moritz RFA, Kraus FB (2013) Conserving genetic diversity in the honeybee: comments on Harpur et al. (2012). *Molecular Ecology* **22**, 3208-3210.
- de Miranda J, Genersch E (2010) Deformed wing virus. *Journal of Invertebrate Pathology* **103 Suppl**, 48-61.
- de Miranda JR, Cordoni G, Budge G (2010) The Acute bee paralysis virus-Kashmir bee virus-Israeli acute paralysis virus complex. *Journal of invertebrate pathology* **103 Suppl**, S30-47.
- de Miranda JR, Drebot M, Tyler S, Shen M, Cameron CE, Stoltz DB, Camazine SM (2004) Complete nucleotide sequence of Kashmir bee virus and comparison with acute bee paralysis virus. *J Gen Virol* **85**(Pt 8), 2263-70.



- de Miranda JR, Fries I (2008) Venereal and vertical transmission of deformed wing virus in honeybees (*Apis mellifera* L.). *Journal of invertebrate pathology* **98**(2), 184-189.
- de Smet L, De Koker D, Hawley AK, Foster LJ, De Vos P, de Graaf DC (2014) Effect of bodily fluids from honey bee (*Apis mellifera*) larvae on growth and genome-wide transcriptional response of the causal agent of American Foulbrood disease (*Paenibacillus larvae*). *PLoS ONE* **9**(2), e89175-e89175.
- de Vries H, Biesmeijer J (1998) Modelling collective foraging by means of individual behaviour rules in honey-bees. *Behav. Ecol. Sociobiol* **44**, 109-124.
- de Vries H, Biesmeijer J (2002) Self-organization in collective honeybee foraging: Emergence of symmetry breaking, cross inhibition and equal harvest-rate distribution. *Behav. Ecol. Sociobiol.* **51**, 557-569.
- Decanini LI, Collins AM, Evans JD (2007) Variation and heritability in immune gene expression by diseased honeybees. *J Hered* **98**(3), 195-201. [In eng]
- Dechaume Montcharmont F, Decourtye A, Hennequet-Hantier C, Pons O, Pham-Delègue M (2003) Statistical analysis of honeybee survival after chronic exposure to insecticides. *Environmental Toxicology and Chemistry* **22** (12), 3088-3094.
- Decourtye A, Alaux C, Odoux J-F, Henry M, Vaissière B, Le Conte Y (2011a) Why enhancement of floral resources in agro-ecosystems benefit the honeybee and the beekeeper ? . In 'Ecosystems Biodiversity. Vol. 16.' (Eds O Grillo and G Venora) pp. 371-388. (InTech)
- Decourtye A, Armengaud C, Renou M, Devillers J, Cluzeau S, Gauthier M, Pham-Delègue M-H (2004a) Imidacloprid impairs memory and brain metabolism in the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Pesticide Biochemistry and Physiology* **78**(2), 83-92.
- Decourtye A, Devillers J (2010) Ecotoxicity of Neonicotinoid Insecticides to Bees. In 'Insect Nicotinic Acetylcholine Receptors. Vol. 683.' Ed. S Thany) pp. 85-95. (Springer New York)
- Decourtye A, Devillers J, Aupinel P, Brun F, Bagnis C, Fourrier J, Gauthier M (2011b) Honeybee tracking with microchips: a new methodology to measure the effects of pesticides. *Ecotoxicology* **20**(2), 429-437.
- Decourtye A, Devillers J, Cluzeau S, Charreton M, Pham-Delègue M (2004b) Effects of imidacloprid and deltamethrin on associative learning in honeybees under semi-field and laboratory conditions. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **57**(3), 410-419.
- Decourtye A, Devillers J, Genecque E, Menach KL, Budzinski H, Cluzeau S, Pham-Delègue MH (2005) Comparative Sublethal Toxicity of Nine Pesticides on Olfactory Learning Performances of the Honeybee *Apis mellifera*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **48**(2), 242-250.
- Decourtye A, Lacassie E, Pham-Delègue M-H (2003) Learning performances of honeybees (*Apis mellifera* L) are differentially affected by imidacloprid according to the season. *Pest Management Science* **59**(3), 269-278.
- Decourtye A, Lefort S, Devillers J, Gauthier M, Aupinel P, Tisseur M (2009) Sublethal effects of fipronil on the ability of honeybees (*Apis mellifera* L.) to orientate in a complex maze. *Julius-Kühn-Archiv* **423**, 75-83.
- Degrandi-Hoffman G, Chen Y, Huang E, Huang MH (2010) The effect of diet on protein concentration, hypopharyngeal gland development and virus load in worker honey bees (*Apis mellifera* L.). *J Insect Physiol* **56**, 1184-1191.
- DeGrandi-Hoffman G, Chen Y, Simonds R (2013) The Effects of Pesticides on Queen Rearing and Virus Titers in Honey Bees (*Apis mellifera* L.). *Insects* **4**(1), 71-89.
- DeGrandi-Hoffman G, Roth SA, Loper GL, Erickson Jr EH (1989) BEEPOP: A honeybee population dynamics simulation model. *Ecological Modelling* **45**(2), 133-150.

- DeGrandi-Hoffman G, Wardell G, Ahumada-Segura F, Rinderer T, Danka R, Pettis J (2008) Comparisons of pollen substitute diets for honey bees: consumption rates by colonies and effects on brood and adult populations. *Journal of Apicultural Research* **47**(4), 265-270. [In English]
- Delfinado-Baker M (1984) *Acarapis woodi* in the United States. *American Bee Journal* **124**(11), 805-806.
- Delgado D, Perez M, Galindo-Cardona A, Giray T, Restrepo C (2012) Forecasting the Influence of Climate Change on Agroecosystem Services: Potential Impacts on Honey Yields in a Small-Island Developing State. *Psyche*, doi:10.1155/2012/951215.
- Deng G, Waddington K (1997) Methoprene does not affect food preferences and foraging performance in honey bee workers. *Journal of Insect Behavior*(10), 229-235.
- Derecka K, Blythe MJ, *et al.* (2013) Transient Exposure to Low Levels of Insecticide Affects Metabolic Networks of Honeybee Larvae. *PLoS ONE* **8**(7), e68191.
- Desai SD, Eu YJ, Whyard S, Currie RW (2012) Reduction in deformed wing virus infection in larval and adult honey bees (*Apis mellifera* L.) by double-stranded RNA ingestion. *Insect Molecular Biology* **21**(4), 446-455.
- Devillers J, Aupinel P, Decourtye A (2013) Réponses individuelles et populationnelles des abeilles aux perturbateurs endocriniens xénobiotiques, Programme National de Recherche "Perturbateurs Endocriniens" (PNRPE)- APR 2008, Rapport final
- Devillers J, Budzinski H (2008) Utilisation de l'abeille pour caractériser le niveau de contamination de l'environnement par les xénobiotiques. *Bulletin Technique Apicole*(35), 168-178.
- Devillers J, Devillers H (2013) Population dynamics models for assessing the endocrine disruption potential of juvenile hormone analogues on nontarget species. In 'Juvenile Hormones and Juvenoids. Modeling Biological Effects and Environmental Fate.' Ed. J Devillers) pp. 127-144. (CRC Press, Boca Raton)
- Devillers J, Devillers H, Decourtye A, Aupinel P (2010) Internet resources for agent-based modelling. *Sar and Qsar in Environmental Research* **21**(3-4), 337-350.
- Devillers J, Devillers H, Decourtye A, Fourrier J, Aupinel P, Fortini D (2014) Agent-based modeling of the long term effects of pyriproxyfen on honey bee population. In 'In Silico Bees.' Ed. J Devillers) pp. 179-208. (CRC Press, Boca Raton,)
- Devillers J, Devillers H (2014) Automatic systems for capturing the normal and abnormal behaviors of Honey bees. In 'In Silico Bees. James Devillers Ed. p 1-25.'
- Dharmananda S (2003) Traces of chloramphenicol in Chinese bee products: origin, development, and resolution. [www.itmonline.org/arts/bees.htm](http://www.itmonline.org/arts/bees.htm), 1-5.
- Di Pasquale G, Salignon M, Le Conte Y, Belzunces LP, Decourtye A, Kretschmar A, Suchail S, Brunet J-L, Alaux C (2013) Influence of Pollen Nutrition on Honey Bee Health: Do Pollen Quality and Diversity Matter? *PLoS ONE* **8**(8), e72016.
- Di Prisco G, Cavaliere V, Annoscia D, Varricchio P, Caprio E, Nazzi F, Gargiulo G, Pennacchio F (2013) Neonicotinoid clothianidin adversely affects insect immunity and promotes replication of a viral pathogen in honey bees. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**(46), 18466-18471.
- Di Prisco G, Pennacchio F, Caprio E, Boncristiani HF, Evans JD, Chen Y (2011) *Varroa destructor* is an effective vector of Israeli acute paralysis virus in the honeybee, *Apis mellifera*. *Journal of General Virology* **92**(1), 151-155.
- Dictionnaire Petit Robert (2007) 'édition 2007.'
- Didier PJ, Phillips JN, Kuebler DJ, Nasr M, Brindley PJ, Stovall ME, Bowers LC, Didier ES (2006) Antimicrobial activities of fumagillin, TNP-470, ovalicin, and ovalicin derivatives *in vitro* and *in vivo*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **50**(6), 2146-55.
- Dietemann V, Pirk CWW, Crewe R (2009) Is there a need for conservation of honeybees in Africa? *Apidologie* **40**, 285-295.

- Diserens JM Contaminants and residues in Food. Strategies (if any) to screen and analyse veterinary drug residues in food from animal origin. In 'Proceedings of the 5th International Fresenius Conference Nestle Research Center', 2007, Lausanne, Switzerland <http://www.biocop.org/.../ContaminantsResiduesinFood5thFresenius> ppt.pdf.,
- Djukic M, Brzuszkiewicz E, *et al.* (2014) How to kill the honey bee larva: genomic potential and virulence mechanisms of *Paenibacillus larvae*. *PLoS ONE* **9**(3), e90914-e90914.
- Dornhaus A, Klügl F, Oechslein C, Puppe F, Chittka L (2006) Benefits of recruitment in honey bees: effects of ecology and colony size in an individual-based model. *Behavioral Ecology* **17**(3), 336-344.
- Doublet V, Labarussias M, de Miranda J, Moritz R, Paxton R (2014) Bees under stress: sublethal doses of a neonicotinoid pesticide and pathogens interact to elevate honey bee mortality across the life cycle. *Environmental microbiology*, n/a-n/a.
- Doublet V, Natsopoulou M, Zschiesche L, Paxton R (2015) Within-host competition among the honey bees pathogens *Nosema ceranae* and Deformed wing virus is asymmetric and to the disadvantage of the virus. *Journal of invertebrate pathology* **124**(0), 31-34.
- Downey DL, Higo TT, Winston ML (2000) Single and dual parasitic mite infestations on the honey bee, *Apis mellifera*. *Insectes Sociaux* **47**, 171-176.
- Downey DL, Winston ML (2001) Honey bee colony mortality and productivity with single and dual infestations of parasitic mite species. *Apidologie* **32**, 567-575.
- Duan JJ, Marvier M, Huesing J, Dively G, Huang ZY (2008) A Meta-Analysis of Effects of Bt Crops on Honey Bees (Hymenoptera: Apidae). *PLoS ONE* **3**(1), e1415.
- Dufault R, LeBlanc B, Schnoll R, Cornett C, Schweitzer L, Wallinga D, Hightower J, Patrick L, Lukiw W (2009) Mercury from chlor-alkali plants: measured concentrations in food product sugar. *Environmental Health* **8**(1), 2.
- Dussaubat C, Brunet JL, *et al.* (2012) Gut Pathology and Responses to the Microsporidium *Nosema ceranae* in the Honey Bee *Apis mellifera*. *Plos One* **7**(5), e37017.
- Dussaubat C, Maisonnasse A, Alaux C, Tchamitchan S, Brunet JL, Plettner E, Belzunces LP, Le Conte Y (2010) *Nosema* spp. infection alters pheromone production in honey bees (*Apis mellifera*). *J Chem Ecol* **36**(5), 522-5.
- Dussaubat C, Maisonnasse A, Crauser D, Beslay D, Costagliola G, Soubeyrand S, Kretzchmar A, Le Conte Y (2013) Flight behavior and pheromone changes associated to *Nosema ceranae* infection of honey bee workers (*Apis mellifera*) in field conditions. *Journal of Invertebrate Pathology* **113**(1), 42-51.
- Dustmann JH, von der Ohe W (1988) Influence des coups de froid sur le développement printanier des colonies d'abeilles (*Apis mellifica* L.). *Apidologie* **19**, 245-254.
- Eckert JE (1933) The flight range of the honey bee. *Journal of Agricultural Research* **47**, 257-285.
- EFSA (2012a) Scientific Opinion on the science behind the development of a risk assessment of Plant Protection Products on bees (*Apis mellifera*, *Bombus* spp. and solitary bees). *EFSA Journal* **10**(5), 2668 (275p).
- EFSA (2012b) Statement on the findings in recent studies investigating sub-lethal effects in bees of some neonicotinoids in consideration of the uses currently authorised in Europe. *EFSA Journal* **10**(6), 2752. [27 pp.].
- EFSA (2013a) Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment for bees for the active substance clothianidin. *EFSA Journal* **11**(1), 58 pp.
- EFSA (2013b) Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment for bees for the active substance imidacloprid. *EFSA Journal* **11**(1), 55 pp.
- EFSA (2013c) Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment for bees for the active substance thiamethoxam. *EFSA Journal* **11**(1), 3067 (68p).

- EFSA (2013d) EFSA Guidance Document on the risk assessment of plant protection products on bees (*Apis mellifera*, *Bombus* spp. and solitary bees). *EFSA Journal* **11**(7), 268pp.
- Eiri DM, Nieh JC (2012) A nicotinic acetylcholine receptor agonist affects honey bee sucrose responsiveness and decreases waggle dancing. *The Journal of Experimental Biology* **215**(12), 2022-2029.
- Eischen F, A., Cardoso-Tamez D, Wilson W, T., Dietz A (1989) Honey production of honey bee colonies infested with *Acarapis woodi* (Rennie). *Apidologie* **20**(1), 1-8.
- Eischen FA (1987) Overwintering performance of honey bee colonies heavily infested with *Acarapis Woodi* (Rennie). *Apidologie* **18**(4), 293-304.
- El Hassani A, Dacher M, Gary V, Lambin M, Gauthier M, Armengaud C (2008) Effects of Sublethal Doses of Acetamiprid and Thiamethoxam on the Behavior of the Honeybee (*Apis mellifera*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **54**(4), 653-661.
- El Hassani A, Dupuis J, Gauthier M, Armengaud C (2009) Glutamatergic and GABAergic effects of fipronil on olfactory learning and memory in the honeybee. *Invertebrate Neuroscience* **9**(2), 91-100.
- El Hassani AK, Dacher M, Gauthier M, Armengaud C (2005) Effects of sublethal doses of fipronil on the behavior of the honeybee (*Apis mellifera*). *Pharmacology Biochemistry and Behavior* **82**(1), 30-39.
- Ellis A, Delaplane KS (2009) Individual forager profits in *Apis mellifera* unaffected by a range of colony *Varroa destructor* densities. *Insectes Sociaux* **56**(4), 419-424.
- Ellis JD, Munn PA (2005) The worldwide health status of honey bees. *Bee World* **86** (4), 88-101.
- Ellis M, Baxendale F (1997) Toxicity of seven monoterpenoids to tracheal mites (Acari: Tarsonemidae) and their honey bee (Hymenoptera: Apidae) hosts when applied as fumigants. *Journal of Economic Entomology*(90), 1087-1091.
- Ellis M, Baxendale F, Keith D (1998) Protecting Bees When Using Insecticides. NebGuide G98-1347. University of Nebraska-Lincoln Extension,
- Ellis M, D., Siegfried B, D., Spawn B (1997) The effect of Apistan® on honey bee (*Apis mellifera* L). Responses to methyl parathion, carbaryl and bifenthrin exposure. *Apidologie* **28**(3-4), 123-127.
- Elzen P, Baxter J, Spivak M, Wilson W (2000) Control of *Varroa jacobsoni* Oud. resistant to fluvalinate and amitraz using coumaphos. *Apidologie* **31**(3), 437-441.
- Elzen P, Westervelt D (2002) Detection of coumaphos resistance in *Varroa destructor* in Florida. *American Bee Journal*(142), 291-292.
- EMA (2010) European Medicines Agency - Workshop on medicines for bees - What the Agency can do to increase availability. London, 14-15 December 2009([http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Other/2010/03/WC500078477.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Other/2010/03/WC500078477.pdf)) (accessed on 26 December 2013).
- EMA (1995) The European Agency for the evaluation of medicinal products. EMEA/MRL/021-REV1/95.
- Emmett BJ, Archer BM (1980) The toxicity of diflubenzuron to honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies in apple orchards. *Plant Pathology* **29**(4), 177-183.
- Emsen B (2006) Semi-automated measuring capped brood areas of honey bee colonies. *Journal of Animal and Veterinary Advances* **5**, 1229-1232.
- Enan E (2001) Insecticidal activity of essential oils: octopaminergic sites of action. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* **130**(3), 325-337.
- Engel P, Martinson VG, Moran NA (2012) Functional diversity within the simple gut microbiota of the honey bee. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**(27), 11002-11007. [In English]
- EPA (2005) Reregistration eligibility decision for Tau-fluvalinate. September 2005.

- Evans J, Armstrong T (2005) Inhibition of the American foulbrood bacterium, *Paenibacillus larvae larvae*, by bacteria isolated from honey bees. *Journal of Apicultural Research* **44**(4), 168-171.
- Evans J, Schwarz R (2011) Bees brought to their knees: microbes affecting honey bee health. *Trends in Microbiology* **19**(12), 614-620.
- Evans JD (2001) Genetic Evidence for Coinfection of Honey Bees by Acute Bee Paralysis and Kashmir Bee Viruses. *Journal of invertebrate pathology* **78**(4), 189-193.
- Evans JD (2004) Transcriptional immune responses by honey bee larvae during invasion by the bacterial pathogen, *Paenibacillus larvae*. *J Invertebr Pathol* **85**(2), 105-111.
- Evans JD, Aronstein K, et al. (2006) Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. *Insect Molecular Biology* **15**(5), 645-56. [In eng]
- Evans JD, Lopez DL (2004) Bacterial probiotics induce an immune response in the honey bee (Hymenoptera: Apidae). *J Econ Entomol* **97**(3), 752-6. [In eng]
- Evans JD, Spivak M (2010) Socialized medicine: Individual and communal disease barriers in honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology* **103, Supplement**(0), S62-S72.
- Evans P, Gee J (1980) Action of formamidine pesticides on octopamine receptors. *Nature*(287), 60-62.
- Evison SEF, Roberts KE, Laurenson L, Pietravalle S, Hui J, Biesmeijer JC, Smith JE, Budge G, Hughes WOH (2012) Pervasiveness of Parasites in Pollinators. *PLoS ONE* **7**(1), e30641.
- Faucon JP (1992) 'Précis de Pathologie : connaître et traiter les maladies des abeilles.' (CNEVA-FNOSAD)
- Faucon JP, Mathieu L, Ribière M, Martel A-C, Drajnudel P, Zeggane S, Aurieres C, Aubert MFA (2002) Honey bee winter mortality in France in 1999 and 2000. *Bee World*(83), 14-23.
- Favre D (2011) Mobile phone-induced honeybee worker piping. *Apidologie* **42**(3), 270-279.
- Fehler M, Kleinhenz M, Klügl F, Puppe F, Tautz J (2007) Caps and gaps: a computer model for studies on brood incubation strategies in honeybees (*Apis mellifera carnica*). *Naturwissenschaften* **94**(8), 675-680.
- Feldlaufer M, Pettis JS, Kochansky JP, Stiles G (2001) Lincomycin hydrochloride for the control of American foulbrood disease of honey bees. *Apidologie* **32** (6), 547-554.
- Feldlaufer MF, Knox DA, Lusby WR, Shimanuki H (1993a) Antimicrobial Activity of Fatty-Acids against *Bacillus-Larvae*, the Causative Agent of American Foulbrood Disease. *Apidologie* **24**(2), 95-99.
- Feldlaufer MF, Lusby WR, Knox DA, Shimanuki H (1993b) Isolation and Identification of Linoleic-Acid as an Antimicrobial Agent from the Chalkbrood Fungus, *Ascosphaera-Apis*. *Apidologie* **24**(2), 89-94.
- Fenoy S, Rueda C, Higes M, Martin-Hernandez R, del Aguila C (2009) High-level resistance of *Nosema ceranae*, a parasite of the honeybee, to temperature and desiccation. *Applied and Environmental Microbiology* **75**(21), 6886-9.
- Ferrari S, Silva M, Guarino M, Berckmans D (2008) Monitoring of swarming sounds in bee hives for early detection of the swarming period. *Computers and Electronics in Agriculture* **64**(1), 72-77.
- Feyereisen R (1999) Insect P450 Enzymes. *Annual Review of Entomology* **44**(1), 507-533.
- Fievet J, Tentcheva D, Gauthier L, de Miranda J, Cousserans F, Colin ME, Bergoin M (2006) Localization of deformed wing virus infection in queen and drone *Apis mellifera* L. *Virology* **3**, 16.
- Fischer J, Müller T, Spatz A-K, Greggers U, Grünwald B, Menzel R (2014) Neonicotinoids Interfere with Specific Components of Navigation in Honeybees. *PLoS ONE* **9**(3), e91364.
- Flenniken ML, Andino R (2013) Non-specific dsRNA-mediated antiviral response in the honey bee. *Plos One* **8**(10), e77263. [In eng]
- Flores JM, Gutiérrez I, Espejo R (2005a) The role of pollen in chalkbrood disease in *Apis mellifera*: transmission and predisposing conditions. *Mycologia* **97**(6), 1171-1176.

Flores JM, Gutierrez I, Puerta F (2004) Oxytetracycline as a predisposing condition for chalkbrood in honeybee. *Veterinary Microbiology* **103**(3–4), 195-199.

Flores JM, Spivak M, Gutiérrez I (2005b) Spores of *Ascosphaera apis* contained in wax foundation can infect honeybee brood. *Veterinary Microbiology* **108**(1–2), 141-144.

Floris I, Satta A, Cabras P, Garau V, Angioni A (2004) Comparison Between Two Thymol Formulations in the Control of *Varroa destructor*: Effectiveness, Persistence, and Residues. *Journal of Economic Entomology* **97**(2), 187-191.

Foley K, Fazio G, Jensen AB, Hughes WO (2012) Nutritional limitation and resistance to opportunistic *Aspergillus* parasites in honey bee larvae. *J Invertebr Pathol* **111**(1), 68-73.

Fontbonne R, Garnery L, et al. (2013) Comparative susceptibility of three Western honeybee taxa to the microsporidian parasite *Nosema ceranae*. *Infection, Genetics and Evolution* **17**, 188-194.

Forsgren E (2010) European foulbrood in honey bees. *Journal of invertebrate pathology* **103 Suppl**(2010), 5-9.

Forsgren E, Fries I (2013) Temporal study of *Nosema* spp. in a cold climate. *Environmental Microbiology Reports* **5**(1), 78-82.

Forsgren E, Fries I, JR dM (2012) Adult honey bees (*Apis mellifera*) with deformed wings discovered in confirmed varroa-free colonies. *Journal of Apicultural Research* **51**(1), 136-138.

Forsgren E, Laugen AT (2013) Prognostic value of using bee and hive debris samples for the detection of American foulbrood disease in honey bee colonies. *Apidologie* **45**(1), 10-20.

Forsgren E, Lundhagen A, Imdorf A, Fries I (2005) Distribution of *Melissococcus plutonius* in honeybee colonies with and without symptoms of European foulbrood. *Microbial ecology* **50**, 369-74.

Forsgren E, Olofsson TC, Vásquez A, Fries I (2010) Novel lactic acid bacteria inhibiting *Paenibacillus larvae* in honey bee larvae. *Apidologie* **41**, 99-108.

Fragouli-Fournogeraki ME, Fragoulis EG, Sekeris CE (1978) Protein synthesis by polysomes from the epidermis of blowfly larvae: Dependence of formation of DOPA-decarboxylase on developmental stage. *Insect Biochemistry* **8**(6), 435-441.

FranceAgriMer (2012) Audit économique de la filière apicole française / LES SYNTHÈSES de FranceAgriMer / édition septembre 2012

[http://www.franceagrimer.fr/content/download/17875/141072/file/Audit\\_de\\_la\\_filière\\_apicole\\_2012.pdf](http://www.franceagrimer.fr/content/download/17875/141072/file/Audit_de_la_filière_apicole_2012.pdf)

Francis R, Nielsen S, Kryger P (2013a) Patterns of viral infection in honey bee queens. *Journal of General Virology* **94**(Pt 3), 668-676.

Francis R, Nielsen S, Kryger P (2013b) *Varroa*-Virus Interaction in Collapsing Honey Bee Colonies. *PLoS ONE* **8**(3), e57540.

Frazier MT, Finley J, Collison CH, Rajotte E (1994) The incidence and impact of honey bee tracheal mites and *Nosema apis* on colony mortality in Pennsylvania. *BeeScience*(3), 94 -100.

Freitak D, Ots I, Vanatoa A, Horak P (2003) Immune response is energetically costly in white cabbage butterfly pupae. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **270**, S220-S222. [In English]

Fries I (1991) Treatment of sealed honey bee brood with formic acid for control of *Varroa jacobsoni*. *American Bee Journal*(131), 313-314.

Fries I (2010) *Nosema ceranae* in European honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Invertebrate Pathology* **103 Suppl 1**, S73-9.

Fries I, Feng F, Da Silva A, Slemmeda SB, Pieniazek NJ (1996) *Nosema ceranae* n. sp. (Microspora, Nosematidae), morphological and molecular characterization of a microsporidian parasite of the Asian honey bee *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae). *European Journal of Protistology* **32**(3), 356–365.

- Fries I, Lindström A, Korpela S (2006) Vertical transmission of American foulbrood (*Paenibacillus larvae*) in honey bees (*Apis mellifera*). *Veterinary Microbiology* **114**(3–4), 269-274.
- Frilli F, Milani N, Barbattini R, Greatti M, Chiesa F, Iob M, D'Agaro M, Prota R, Floris I The effectiveness of various acaricides in the control of *Varroa jacobsoni* and their tolerance by honey bees. In 'Proceedings of The Current State and Development of Research in Apiculture', 25-26 October 1991, Sassari, Italy, pp. 59-77
- Fünfhaus A, Poppinga L, Genersch E (2013) Identification and characterization of two novel toxins expressed by the lethal honey bee pathogen *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood. *Environmental microbiology* **15**(11), 2951-2965.
- Furst MA, McMahon DP, Osborne JL, Paxton RJ, Brown MJF (2014) Disease associations between honeybees and bumblebees as a threat to wild pollinators. *Nature* **506**(7488), 364-366.
- Garcia-Gonzalez E, Müller S, Enslé P, Süssmuth RD, Genersch E (2014a) Elucidation of sevadicin, a novel non-ribosomal peptide secondary metabolite produced by the honey bee pathogenic bacterium *Paenibacillus larvae*. *Environmental microbiology* **16**(5), 1297-309.
- Garcia-Gonzalez E, Poppinga L, Fünfhaus A, Hertlein G, Hedtke K, Jakubowska A, Genersch E (2014b) *Paenibacillus larvae* Chitin-Degrading Protein PICBP49 Is a Key Virulence Factor in American Foulbrood of Honey Bees. *PLoS Pathog* **10**(7), e1004284.
- Garedew A, Lamprecht I, Schmolz E, Schrickler B (2002) The varroacidal action of propolis: a laboratory assay. *Apidologie* **33**(1), 41-50. [In English]
- Garrido-Bailon E, Higes M, Martinez-Salvador A, Antunez K, Botias C, Meana A, Prieto L, Martin-Hernandez R (2013) The prevalence of the honeybee brood pathogens *Ascosphaera apis*, *Paenibacillus larvae* and *Melissococcus plutonius* in Spanish apiaries determined with a new multiplex PCR assay. *Microb Biotechnol* **6**(6), 731-9.
- Garrido PM, Antunez K, Martin M, Porrini MP, Zunino P, Eguaras MJ (2013) Immune-related gene expression in nurse honey bees (*Apis mellifera*) exposed to synthetic acaricides. *Journal of Insect Physiology* **59**(1), 113-9. [In eng]
- Gary NE (1960) A Trap to Quantitatively Recover Dead and Abnormal Honey Bees from the Hive. *Journal of Economic Entomology* **53**(5), 782-785.
- Gary NE, Page REJ (1989) Tracheal mite (Acari : Tarsonemidae) infestation effects on foraging and survivorship of honey bees (Hymenoptera : Apidae). *Journal of economic entomology* **82**(3), 734-739.
- Gatschenberger H, Gimple O, Tautz J, Beier H (2012) Honey bee drones maintain humoral immune competence throughout all life stages in the absence of vitellogenin production. *Journal of Experimental Biology* **215**(Pt 8), 1313-22. [In eng]
- Gauthier L, Ravallec M, Tournaire M, Cousserans F, Bergoin M, Dainat B, de Miranda JR (2011) Viruses Associated with Ovarian Degeneration in *Apis mellifera* L. Queens. *Plos One* **6**(1). [In English]
- Gauthier L, Tentcheva D, Tournaire M, Dainat B, Cousserans F, Colin M, Bergoin M (2007) Viral load estimation in asymptomatic honey bee colonies using the quantitative RT-PCR technique. *Apidologie* **38**, 426-435.
- Genersch E (2010) American Foulbrood in honeybees and its causative agent, *Paenibacillus larvae*. *Journal of Invertebrate Pathology*(103), S10-S19.
- Genersch E, Forsgren E, Pentikäinen J, Ashiralieva A, Rauch S, Kilwinski J, Fries I (2006a) Reclassification of *Paenibacillus larvae* subsp. *pulvifaciens* and *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* as *Paenibacillus larvae* without subspecies differentiation. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*(56), 501-511.
- Genersch E, von der Ohe W, et al. (2010) The German bee monitoring project: a long term study to understand periodically high winter losses of honey bee colonies. *Apidologie* **41**(3), 332-352.

- Genersch E, Yue C, Fries I, de Miranda JR (2006b) Detection of Deformed wing virus, a honey bee viral pathogen, in bumble bees (*Bombus terrestris* and *Bombus pascuorum*) with wing deformities. *Journal of Invertebrate Pathology* **91**(1), 61-63.
- Geng L-L, Cui H-J, Dai P-L, Lang Z-H, Shu C-L, Zhou T, Song F-P, Zhang J (2013) The influence of Bt-transgenic maize pollen on the bacterial diversity in the midgut of *Apis mellifera ligustica*. *Apidologie* **44**(2), 198-208.
- Gerig L (1975) The effects of juvenile hormone analogues on summer bees (*Apis mellifica* L.) in the field and laboratory. [Wirkung von Juvenilhormon-Analoga auf Sommerbienen (*Apis mellifica* L.) im Freiland und Labor.]. *Schweizerische Landwirtschaftliche Forschung* **14**(4), 355-370.
- Ghosh RC, Ball BV, Willcocks MM, Carter MJ (1999) The nucleotide sequence of sacbrood virus of the honey bee: an insect picorna-like virus. *J Gen Virol* **80** ( Pt 6), 1541-9.
- Giersch T, Barchia I, Hornitzky M (2010) Can fatty acids and oxytetracycline protect artificially raised larvae from developing European foulbrood? *Apidologie* **41**(2), 151-159.
- Gilbert MD, Wilkinson CF (1974) Microsomal oxidases in the honey bee, *Apis mellifera* (L.). *Pesticide Biochemistry and Physiology* **4**(1), 56-66.
- Gilbert MD, Wilkinson CF (1975) An inhibitor of microsomal oxidation from gut tissues of the honey bee (*Apis mellifera*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* **50**(4), 613-619.
- Gilliam M, Wickerham LJ, Morton HL, Martin RD (1974) Yeasts isolated from honey bees, *Apis mellifera*, fed 2,4-D and antibiotics. *Journal of Invertebrate Pathology* **24**, 349-356.
- Gisder S, Aumeier P, Genersch E (2009) Deformed wing virus: replication and viral load in mites (*Varroa destructor*). *Journal of General Virology* **90**(2), 463-467.
- Gisder S, Genersch E (2013) Molecular differentiation of *Nosema apis* and *Nosema ceranae* based on species-specific sequence differences in a protein coding gene. *Journal of invertebrate pathology* **113**(1), 1-6.
- Gisder S, Hedtke K, Möckel N, Frielitz M, Linde A, Genersch E (2010) Five-year cohort study of *Nosema* spp. in Germany: does climate shape virulence and assertiveness of *Nosema ceranae*? *Applied and environmental microbiology* **76**, 3032-8.
- Glinski Z (1982) Studies on pathogenicity of *Ascospaera apis* for larvae of the honeybee *Apis mellifera* L. Part II. Relationships between biochemical types and virulence of *A. apis*. *Annales Universitatis Mariae Curie Sklodowska Sectio DD. Med. Vet.* **37** (8), 69-77.
- Gliński Z, Jarosz J (1995) Cellular and humoral defences in honey bees. *Bee world*(67), 195-205.
- Goblirsch M, Huang ZY, Spivak M (2013) Physiological and Behavioral Changes in Honey Bees (*Apis mellifera*) Induced by *Nosema ceranae* Infection. *PLoS ONE* **8**(3), e58165.
- Godfray HCJ, Blacquière T, Field LM, Hails RS, Petrokofsky G, Potts SG, Raine NE, Vanbergen AJ, McLean AR (2014) A restatement of the natural science evidence base concerning neonicotinoid insecticides and insect pollinators. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* **281**(1786).
- González-Varo J, Biesmeijer J, et al. (2013) Combined effects of global change pressures on animal-mediated pollination. *Trends in Ecology & Evolution* **28**(9), 524-530.
- Gould J, Gould C (1993) 'Les abeilles, comportement, communication et capacités sensorielles.' (Paris: Pour la Science) 240 p
- Goulson D (2013) REVIEW: An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides. *Journal of Applied Ecology* **50**(4), 977-987.
- Goulson D, Nicholls E, Botías C, Rotheray EL (2015) Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science*.
- Govan VA, Leat N, Allsopp M, Davison S (2000) Analysis of the complete genome sequence of acute bee paralysis virus shows that it belongs to the novel group of insect-infecting RNA viruses. *Virology* **277**(2), 457-63.



- Grabensteiner E, Bakonyi T, Ritter W, Pechhacker H, Nowotny N (2007) Development of a multiplex RT-PCR for the simultaneous detection of three viruses of the honeybee (*Apis mellifera* L.): acute bee paralysis virus, Black queen cell virus and Sacbrood virus. *Journal of Invertebrate Pathology* **94**(3), 222-5.
- Granja RHMM, Niño AMM, Zucchetti RAM, Niño REM, Patel R, Salerno AG (2009) Determination of streptomycin residues in honey by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* **637**(1–2), 64-67.
- Grant GA, Nelson DL, Olsen PE, Rice WA (1993) The ELISA detection of tracheal mites in whole honey bee samples. *American Bee Journal* **133**, 652-655.
- Graystock P, Yates K, Darvill B, Goulson D, Hughes WOH (2013) Emerging dangers: Deadly effects of an emergent parasite in a new pollinator host. *Journal of invertebrate pathology* **114**(2), 114-119.
- Greco M (2010) Imaging techniques for improved bee management. *ALP Technical-Scientific Information Series 534*, 38 pp.
- Greco M, Jones A, Spooner-Hart R, Holford P (2008) X-ray computerised microtomography (MicroCT): a new technique for assessing external and internal morphology of bees. *Journal of Apicultural Research* **47** (4), 286-291.
- Greenberg B, Bindokas VP, Frazier MJ, Gauger JR (1981) Response of Honey Bees, *Apis Mellifera* L, to High-Voltage Transmission-Lines. *Environmental Entomology* **10**(5), 600-610.
- Greggers U, Koch G, Schmidt V, Durr A, Floriou-Servou A, Piepenbrock D, Gopfert MC, Menzel R (2013) Reception and learning of electric fields in bees. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society* **280**(1759), 20130528.
- Gregorc A (2012) A clinical case of honey bee intoxication after using coumaphos strips against *Varroa destructor*. *Journal of Apicultural Research* **51**(1), 142-143.
- Gregorc A, Bowen I (2000) Histochemical characterization of cell death in honeybee larvae midgut after treatment with *Paenibacillus larvae*, amitraz and oxytetracycline. *Cell Biology International* **24**(5), 319-324.
- Gregorc A, Ellis JD (2011) Cell death localization in situ in laboratory reared honey bee (*Apis mellifera* L.) larvae treated with pesticides. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **99**(2), 200-207.
- Gregorc A, Evans JD, Scharf M, Ellis JD (2012) Gene expression in honey bee (*Apis mellifera*) larvae exposed to pesticides and *Varroa* mites (*Varroa destructor*). *Journal of Insect Physiology* **58**(8), 1042-9.
- Gregorc A, Smodiš Škerl M (2007) Toxicological and immunohistochemical testing of honeybees after oxalic acid and rotenone treatments. *Apidologie* **38**(3), 296-305.
- Gregory P, Evans J, Rinderer T, de Guzman L (2005) Conditional immune-gene suppression of honeybees parasitized by *Varroa* mites. *Journal of Insect Science* **5**(1).
- Gretenkord C, Drescher W (1995) Labor- und Zeltprüfverfahren zur Bestimmung der Auswirkungen von Insektenwachstumsregulatoren (zB Insegar, Dimilin) auf die Brut von *Bombus terrestris* L. (summary). *Apidologie Springer Verlag (Germany)* **26** (4), 331-332.
- Guez D, Suchail S, Gauthier M, Maleszka R, Belzunces LP (2001) Contrasting Effects of Imidacloprid on Habituation in 7- and 8-Day-Old Honeybees (*Apis mellifera*). *Neurobiology of Learning and Memory* **76**(2), 183-191.
- Gunes N, Cibik R, Gunes ME, Aydin L (2008) Erythromycin residue in honey from the Southern Marmara region of Turkey. *Food Additives & Contaminants: Part A* **25**(11), 1313-1317.
- Gupta P, R., Chandel R, S. (1995) Effects of diflubenzuron and penfluron on workers of *Apis cerana indica* F and *Apis mellifera* L. *Apidologie* **26**(1), 3-10.
- Ha EM, Oh CT, Bae YS, Lee WJ (2005) A direct role for dual oxidase in *Drosophila* gut immunity. *Science* **310**(5749), 847-50. [In eng]

- Haarmann T, Spivak M, Weaver D, Weaver B, Glenn T (2002) Effects of Fluvalinate and Coumaphos on Queen Honey Bees (Hymenoptera: Apidae) in Two Commercial Queen Rearing Operations. *Journal of Economic Entomology* **95**(1), 28-35.
- Hamdi C, Balloi A, et al. (2011) Gut microbiome dysbiosis and honeybee health. *Journal of Applied Entomology* **135**, 524-533.
- Hamiduzzaman MM, Guzman-Novoa E, Goodwin PH (2010) A multiplex PCR assay to diagnose and quantify *Nosema* infections in honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of invertebrate pathology* **105**(2), 151-155.
- Han P, Niu C-Y, Lei C-L, Cui J-J, Desneux N (2010) Use of an innovative T-tube maze assay and the proboscis extension response assay to assess sublethal effects of GM products and pesticides on learning capacity of the honey bee *Apis mellifera* L. *Ecotoxicology* **19**(8), 1612-1619.
- Harbo JR, Harris JW (1999) Selecting honey bees for resistance to *Varroa jacobsoni*. *Apidologie* **30**, 183-196.
- Hardstone MC, Scott JG (2010) Is *Apis mellifera* more sensitive to insecticides than other insects ? *Pest Management Science*, DOI 10.1002/ps.2001.
- Harpur BA, Minaei S, Kent CF, Zayed A (2012) Management increases genetic diversity of honey bees via admixture. *Molecular Ecology* **21**, 4414-4421.
- Harpur BA, Sobhani M, Zayed A (2013) A review of the consequences of complementary sex determination and diploid male production on mating failures in the Hymenoptera. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **146**, 156-164.
- Harris JW (2007) Bees with varroa Sensitive Hygiene preferentially remove mite infested pupae aged < five days post capping. *Journal of Apicultural Research* **46**, 134-139.
- Harris JW, Harbo JR, Villa JD, Danka RG (2003) Variable population growth of *Varroa destructor* (Mesostigmata : Varroidae) in colonies of honey bees (Hymenoptera : Apidae) during a 10-year period. *Environmental Entomology* **32**(6), 1305-1312.
- Hatjina F, Papaefthimiou C, Charistos L, Dogaroglu T, Bouga M, Emmanouil C, Arnold G (2013) Sublethal doses of imidacloprid decreased size of hypopharyngeal glands and respiratory rhythm of honeybees *in vivo*. *Apidologie* **44**(4), 467-480.
- Haubruege E, Nguyen BK, Widart J, Thomé J-P, Fickers P, Depauw E (2006) Le dépérissement de l'abeille domestique, *Apis mellifera* L., 1758 (Hymenoptera : Apidae) : faits et causes probables. *Notes fauniques de Gembloux*(59), 3-21.
- Hawthorne DJ, Dively GP (2011) Killing Them with Kindness? In-Hive Medications May Inhibit Xenobiotic Efflux Transporters and Endanger Honey Bees. *PLoS ONE* **6**(11), e26796.
- Haxaire J, Tamisier J-P, Bouguet J-P (2006) *Vespa velutina* Lepeletier, 1836, une redoutable nouveauté pour la faune de France (Hym., Vespidae). *Bull. Soc. Entomol. Fr.* **111**, 194-194.
- Haydak MH (1970) Honey bee nutrition. *Annual Review of Entomology* **15**, 143-156.
- Haynes E, Helgason T, Young J, Thwaites R, Budge G (2013) A typing scheme for the honeybee pathogen *Melissococcus plutonius* allows detection of disease transmission events and a study of the distribution of variants. *Environmental Microbiology Reports* **5**(4), 525-529.
- Hedtke K, Jensen PM, Jensen AB, Genersch E (2011) Evidence for emerging parasites and pathogens influencing outbreaks of stress-related diseases like chalkbrood. *Journal of invertebrate pathology* **108**(3), 167-73.
- Heinrich B (1981) The mechanisms and energetics of honeybee swarm temperature regulation. *Journal of Experimental Biology* **91**, 25-55.
- Hendriksma H, Härtel S, Babendreier D, von der Ohe W, Steffan-Dewenter I (2012) Effects of multiple Bt proteins and GNA lectin on *in vitro*-reared honey bee larvae. *Apidologie* **43**(5), 549-560.
- Hendriksma HP, Härtel S, Steffan-Dewenter I (2011) Testing Pollen of Single and Stacked Insect-Resistant Bt-Maize on *in vitro* Reared Honey Bee Larvae. *PLoS ONE* **6**(12), e28174.

- Hendriksma HP, Küting M, Härtel S, Näther A, Dohrmann AB, Steffan-Dewenter I, Tebbe CC (2013) Effect of Stacked Insecticidal Cry Proteins from Maize Pollen on Nurse Bees (*Apis mellifera carnica*) and Their Gut Bacteria. *PLoS ONE* **8**(3), e59589.
- Henry M, Beguin M, Requier F, Rollin O, Odoux JF, Aupinel P, Aptel J, Tchamitchian S, Decourtye A (2012) A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. *Science* **336**(6079), 348-50.
- Henry M, Bertrand C, Le Féon V, Requier F, Odoux J-F, Aupinel P, Bretagnolle V, Decourtye A (2014) Pesticide risk assessment in free-ranging bees is weather and landscape dependent. *Nat Commun* **5**.
- Herbert EW, Jr., Shimanuki H (1978) Chemical composition and nutritive value of bee-collected and bee-stored pollen. *Apidologie* **9**(1), 33-40.
- Heylen K, Gobin B, Arckens L, Huybrechts R, Billen J (2011) The effects of four crop protection products on the morphology and ultrastructure of the hypopharyngeal gland of the European honeybee, *Apis mellifera*. *Apidologie* **42**(1), 103-116.
- Higes M, Esperón F, Sánchez-Vizcaíno JM (2007a) Short communication. First report of black queen-cell virus detection in honey bees (*Apis mellifera*) in Spain. *Spanish Journal of Agricultural Research* **5**(3), 322-325.
- Higes M, García-Palencia P, Martín-Hernández R, Meana A (2007b) Experimental infection of *Apis mellifera* honeybees with *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Journal of invertebrate pathology* **94**(3), 211-217.
- Higes M, Martín-Hernández R, et al. (2008) How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Environmental microbiology* **10**(10), 2659-2669.
- Higes M, Martín-Hernández R, Meana A (2010) *Nosema ceranae* in Europe: an emergent type C nosemosis. *Apidologie* **41**(3), 375-392.
- Higes M, Martín R, Meana A (2006) *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe. *Journal of invertebrate pathology* **92**(2), 93-95.
- Higes M, Martín R, Sanz A, Alvarez N, Sanz A, Del Pilar Garcia M, Meana A (2005) Le syndrome de dépeuplement de ruches en Espagne. *La santé de l'abeille*(211), 26-37.
- Higes M, Meana A, Bartolomé C, Botías C, Martín-Hernández R (2013) *Nosema ceranae* (Microsporidia), a controversial 21st century honey bee pathogen. *Environmental Microbiology Reports* **5**(1), 17-29.
- Higes M, Meana A, Suárez M, Llorente J (1999) Negative long-term effects on bee colonies treated with oxalic acid against *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie* **30**(4), 289-292.
- Higes M, Nozal M, Alvaro A, Barrios L, Meana A, Martín-Hernández R, Bernal J, Bernal J (2011) The stability and effectiveness of fumagillin in controlling *Nosema ceranae* (Microsporidia) infection in honey bees (*Apis mellifera*) under laboratory and field conditions. *Apidologie* **42**(3), 364-377.
- Highfield A, El Nagar A, Mackinder L, Noël L-L, Hall M, Martin S, Schroeder D (2009) Deformed Wing Virus Implicated in Overwintering Honeybee Colony Losses. *Applied and environmental microbiology* **75**(22), 7212-7220.
- Hladun K, Kaftanoglu O, Parker D, Tran K, Trumble J (2013) Effects of selenium on development, survival, and accumulation in the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Environmental Toxicology and Chemistry* **32**(11), 2584-2592.
- Holmstrup M, Bindesbøl A, et al. (2010) Interactions between effects of environmental chemicals and natural stressors: A review. *Science of The Total Environment* **408**(18), 3746-3762.
- Hoppe H (1990) Vergleichende Untersuchungen zur biotechnischen Bekämpfung der Varroatose. Dissertation Thesis, Justus-Liebig-Universität Giessen,
- Hopwood J, Vaughan M, Shepherd M, Biddinger D, Mader E, Black S, Mazzacano C (2012) Are neonicotinoids killing bees? *The Xerces Society for Invertebrate Conservation*. <http://ento.psu.edu/publications/are-neonicotinoids-killing-bees>.

- Hornitzky M (2003) Fatty acids - an alternative control strategy for honeybee diseases. *RIRDC Publication DAN-193A*.
- Hou C, Rivkin H, Slabezki Y, Chejanovsky N (2014) Dynamics of the Presence of Israeli Acute Paralysis Virus in Honey Bee Colonies with Colony Collapse Disorder. *Viruses* **6**(5), 2012-2027.
- Hrassnigg N, Crailsheim K (2005) Differences in drone and worker physiology in honeybees (*Apis mellifera*). *Apidologie* **36**(2), 255-277.
- Hsu CY, Ko FY, Li CW, Fann K, Lue JT (2007) Magnetoreception System in Honeybees (*Apis mellifera*). *Plos One* **2**(4). [In English]
- Hsu CY, Li CW (1994) Magnetoreception in Honeybees. *Science* **265**(5168), 95-97. [In English]
- Huang Q, Kryger P, Le Conte Y, Moritz RFA (2012) Survival and immune response of drones of a Nosemosis tolerant honey bee strain towards *N. ceranae* infections. *Journal of invertebrate pathology* **109**(3), 297-302.
- Huang W-F, Jiang J-H, Chen Y-W, Wang C-H (2007) A *Nosema ceranae* isolate from the honeybee *Apis mellifera*. *Apidologie* **38**(1), 30-37.
- Huang W-F, Solter LF (2013) Comparative development and tissue tropism of *Nosema apis* and *Nosema ceranae*. *Journal of invertebrate pathology* **113**(1), 35-41.
- Huang W-F, Solter LF, Yau PM, Imai BS (2013) *Nosema ceranae* Escapes Fumagillin Control in Honey Bees. *PLoS Pathog* **9**(3), e1003185.
- Huang ZY, Hanley AV, Pett WL, Langenberger M, Duan JJ (2004) Field and Semifield Evaluation of Impacts of Transgenic Canola Pollen on Survival and Development of Worker Honey Bees. *Journal of Economic Entomology* **97**(5), 1517-1523.
- Huang ZY, Robinson GE (1995) Seasonal changes in juvenile hormone titers and rates of biosynthesis in honey bees. *Journal of Comparative Physiology B* **165**(1), 18-28. [In English]
- Hung ACF, Peng CYS, Shimanuki H (2000) Nucleotide sequence variations in Kashmir bee virus isolated from *Apis mellifera* L. and *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie* **31**(1), 17-23.
- Hung ACF, Shimanuki H, Knox DA (1996) Inapparent infection of acute bee paralysis virus and Kashmir bee virus in the US honey bees. *American Bee Journal* (136), 874-876.
- Hunter W, Ellis J, et al. (2010) Large-Scale Field Application of RNAi Technology Reducing Israeli Acute Paralysis Virus Disease in Honey Bees (*Apis mellifera*, Hymenoptera: Apidae). *PLoS Pathog* **6**(12), e1001160.
- Ibrahim A, Spivak M (2006) The relationship between hygienic behavior and suppression of mite reproduction as honey bee (*Apis mellifera*) mechanisms of resistance to *Varroa destructor*. *Apidologie* **37**(1), 31-40. [In English]
- Il'iasov R, Gaifullina L, Saltykova E, Poskriakov A, Nikolenko A (2012) Defensins in the honeybee antinfectious protection. *Zh Evol Biokhim Fiziol* **48**(5), 425-432.
- Imdorf A, Bogdanov S, Kilchenmann V, Maquelin C (1995a) Apilife Var: A New Varroacide With Thymol As The Main Ingredient. *Bee World* **76**(2), 77-83.
- Imdorf A, Bogdanov S, Ochoa R, Ibáñez, Calderone N, W. (1999a) Use of essential oils for the control of *Varroa jacobsoni* Oud. in honey bee colonies. *Apidologie* **30**(2-3), 209-228.
- Imdorf A, Charriere J, Rosenkranz P (1999b) *Varroa* control with formic acid. Coordination in Europe of research on integrated control of *Varroa* mite in honey bee colonies, Appendix VI Final Technical Report.
- Imdorf A, Gerig L (1999) Guide d'évaluation de la force d'une colonie. *Centre suisse de recherches apicoles* (<http://www.agroscope.admin.ch/imkerei/00000/00294/02107/index.html?lang=fr>).
- Imdorf A, Kilchenmann V, Bogdanov S, Bachofen B, Beretta C (1995b) Toxizität von Thymol, Campher, Menthol und Eucalyptol auf *Varroa jacobsoni* Oud und *Apis mellifera* L im Labortest. *Apidologie, Springer Verlag (Germany)* **26** (1), 27-31.

- Imdorf A, Kilchenmann V, Maquelin C, Bogdanov S (1994) Optimierung der Anwendung von 'Apilife VAR ' zur Bekämpfung von *Varroa jacobsoni* Oud in Bienenvölkern. *Apidologie* **25**(1), 49-60.
- Imdorf A, Ruoff K, Fluri P (2010) Le développement des colonies chez l'abeille mellifère. *ALP forum* **68**, 1-68.
- Invernizzi C, Abud C, Tomasco IH, Harriet J, Ramallo G, Campá J, Katz H, Gardiol G, Mendoza Y (2009) Presence of *Nosema ceranae* in honeybees (*Apis mellifera*) in Uruguay. *Journal of invertebrate pathology* **101**(2), 150-153.
- Invernizzi C, Rivas F, Bettucci L (2011) Resistance to Chalkbrood Disease in *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) Colonies with Different Hygienic Behaviour. *Neotropical Entomology* **40**, 28-34.
- Isman MB (2006) Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world *Annual Review of Entomology* **51**(1), 45-66.
- ITSAP (2014) 'Guide des bonnes pratiques apicoles, 180 p.'
- ITSAP Ct Cahier technique ITSAP : Hivernage et pertes de colonies chez les apiculteurs professionnels français.
- Iwasa T, Motoyama N, Ambrose JT, Roe RM (2004) Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, *Apis mellifera*. *Crop Protection* **23**(5), 371-378.
- Jachimowicz T, El Sherbiny G (1975) Problème de l'utilisation du sucre inverti pour le nourrissage des abeilles. *Apidologie* **6**(2), 121-143.
- Jaffe R, Dietmann V, et al. (2010) Estimating the density of honeybee colonies across their natural range to fill the gap in pollinator decline censures. *Conservation Biology* **24**, 583-593.
- Jamnikar Ciglenečki U, Toplak I (2012) Development of a real-time RT-PCR assay with TaqMan probe for specific detection of acute bee paralysis virus. *Journal of Virological Methods* **184**(1-2), 63-68.
- Janmaat AF, Winston ML (2000a) The influence of pollen storage area and *Varroa jacobsoni* Oudemans parasitism on temporal caste structure in honey bees (*Apis mellifera* L.). *Insectes Sociaux* **47**, 177-182.
- Janmaat AF, Winston ML (2000b) Removal of *Varroa jacobsoni* infested brood in honey bee colonies with differing pollen stores. *Apidologie* **31**(3), 377-385.
- Jaumann S, Scudelari R, Naug D (2013) Energetic cost of learning and memory can cause cognitive impairment in honeybees. *Biology letters* **9**, 20130149.
- Jean-Prost P, Le Conte Y (2005) 'Apiculture : connaître l'abeille, conduire le rucher.' (Lavoisier)
- Jeschke P, Nauen R, Schindler M, Elbert A (2011) Overview of the Status and Global Strategy for Neonicotinoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **59**(7), 2897-2908.
- Johnson B, Nieh J (2010) Modeling the Adaptive Role of Negative Signaling in Honey Bee Intraspecific Competition. *Journal of Insect Behavior* **23**(6), 459-471.
- Johnson BR (2009) Pattern formation on the combs of honeybees: increasing fitness by coupling self-organization with templates. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* **276**(1655), 255-261.
- Johnson R (2007) Recent honey bee colony declines. Rapport délivré au Congrès Américain le 26 mars 2007.
- Johnson R, Mao W, Pollock H, Niu G, Schuler M, Berenbaum M (2012) Ecologically Appropriate Xenobiotics Induce Cytochrome P450s in *Apis mellifera*. *PLoS ONE* **7**(2), e31051.
- Johnson RM, Dahlgren L, Siegfried BD, Ellis MD (2013) Acaricide, Fungicide and Drug Interactions in Honey Bees (*Apis mellifera*). *PLoS ONE* **8**(1), e54092.
- Johnson RM, Ellis MD, Mullin CA, Frazier M (2010) Pesticides and honey bee toxicity – USA. *Apidologie* **41**, 312-331.

- Johnson RM, Pollock HS, Berenbaum MR (2009) Synergistic interactions between in-hive miticides in *Apis mellifera*. *J. Econ. Entomol.* **102**, 474-479.
- Johnson RM, Wen Z, Schuler MA, Berenbaum MR (2006) Mediation of pyrethroid insecticide toxicity to honey bees (Hymenoptera: Apidae) by cytochrome P450 monooxygenases. *J Econ Entomol* **99**(4), 1046-50.
- Jones JC, Myerscough MR, Graham S, Oldroyd BP (2004) Honey bee nest thermoregulation: diversity promotes stability. *Science* **305**(5682), 402-4.
- Kadala A, Charreton M, Jakob I, Cens T, Rousset M, Chahine M, Le Conte Y, Charnet P, Collet C (2014) Pyrethroids Differentially Alter Voltage-Gated Sodium Channels from the Honeybee Central Olfactory Neurons. *PLoS ONE* **9**(11), e112194.
- Kanbar G, Engels W (2003) Ultrastructure and bacterial infection of wounds in honey bee (*Apis mellifera*) pupae punctured by *Varroa* mites. *Parasitology Research* **90**(5), 349-354.
- Katznelson H (1956) Stability of antibiotics in honey. *Am. Bee J.* **96**, 137.
- Katznelson H, Jamieson CA (1952) Control of *Nosema* disease of honeybees with fumagillin. *Science* **115**, 70-71.
- Katznelson H, Jamieson CA, Austin GH (1955) Further studies on the chemotherapy of diseases of the honeybee. *Can. J. Agric. Sci* **35**, 189-192.
- Keeling PJ, Fast NM (2002) Microsporidia: biology and evolution of highly reduced intracellular parasites. *Annual Review of Microbiology* **56**, 93-116.
- Keyhani J, Keyhani E (1980) Epr study of the effect of formate on cytochrome c oxidase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **92**(1), 327-333.
- Khong S-P, Gremaud E, Richoz J, Delatour T, Guy PA, Stadler RH, Mottier P (2004) Analysis of Matrix-Bound Nitrofurantoin Residues in Worldwide-Originated honeys by Isotope Dilution High-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**(17), 5309-5315.
- Khoury D, Myerscough M, Barron A (2011) A Quantitative Model of Honey Bee Colony Population Dynamics. *PLoS ONE* **6**(4), e18491.
- King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ (2011) Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego: Elsevier Academic Press.
- Kirschvink JL, Padmanabha S, Boyce CK, Oglesby J (1997) Measurement of the threshold sensitivity of honeybees to weak, extremely low-frequency magnetic fields. *Journal of Experimental Biology* **200**(9), 1363-1368. [In English]
- Klee J, Besana AM, et al. (2007) Widespread dispersal of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of the western honey bee, *Apis mellifera*. *Journal of Invertebrate Pathology* **96**(1), 1-10. [In eng]
- Klochko R, Biryukova N, Gudkov I (1994) Perizin for the control of *Varroa* infection in bees. *Problemy Veterinarnoi Sanitari i Ekologii* **93**(2), 43-48.
- Kloucek P, Smid J, Flesar J, Havlik J, Titera D, Rada V, Drabek O, Kokoska L (2012) In vitro inhibitory activity of essential oil vapors against *Ascosphaera apis*. *Nat Prod Commun* **7**(2), 253-6.
- Kluser S, Peduzzi P (2007) Global Pollinator Decline: A Literature Review. United Nations Environment Programme.
- Kochansky J, Knox DA, Feldlaufer M, Pettis JS (2001) Screening alternative antibiotics against oxytetracycline-susceptible and -resistant *Paenibacillus larvae*. *Apidologie* **32**, 215-222.
- Kocher S, Richard F-J, Tapy D, Grozinger CM (2009) Queen reproductive state modulates pheromone production and queen-worker interactions in honey bees. *Behavioral Ecology* **20**(5), 1007-1014.
- Kocher S, Richard FJ, Tapy DR, Grozinger CM (2008) Genomic analysis of post-mating changes in the honey bee queen (*Apis mellifera*). *BMC Genomics* **9**, 232.

- Kojima Y, Yoshiyama M, Kimura K, Kadowaki T (2011) PCR-based detection of a tracheal mite of the honey bee *Acarapis woodi*. *Journal of Invertebrate Pathology* **108**(2), 135-137.
- Kovac H, Crailsheim K (1988) Lifespan of *Apis mellifera carnica* Pollm. infested by *Varroa jacobsoni* Oud. in relation to season and extent of infestation. *Journal of Apicultural Research* **27**(4), 230-238.
- Kralj J, Fuchs S (2010) *Nosema* sp. influences flight behavior of infected honey bee (*Apis mellifera*) foragers. *Apidologie* **41**, 21-28.
- Kraus B (1990) Untersuchungen zur olfaktorischen Orientierung von *Varroa jacobsoni* Oud. und deren Störung durch ätherische Öle, Dissertation. Goethe-Universität, Frankfurt,
- Kronenberg F, Heller HC (1982) Colonial Thermoregulation in Honey Bees (*Apis-Mellifera*). *Journal of Comparative Physiology* **148**(1), 65-76. [In English]
- Krska D, Ravulapalli R, Fieldhouse RJ, Lugo MR, Merrill AR (2015) C3larvin Toxin, an ADP-ribosyltransferase from *Paenibacillus larvae*. *Journal of Biological Chemistry* **290**(3), 1639-1653.
- Kubik M, Nowacki J, Pidek A, Warakomska Z, Michalczyk L, Goszczyński W (1999) Pesticide residues in bee products collected from cherry trees protected during blooming period with contact and systemic fungicides. *Apidologie* **30**(6), 521-532.
- Kubik M, Nowacki J, Pidek A, Warakomska Z, Michalczyk L, Goszczyński W, Dwużnik B (2000) Residues of captan (contact) and difenoconazole (systemic) fungicides in bee products from an apple orchard. *Apidologie* **31**(4), 531-541.
- Kukielka D, Sánchez-Vizcaino JM (2009) One-step real-time quantitative PCR assays for the detection and field study of Sacbrood honeybee and Acute bee paralysis viruses. *Journal of Virological Methods* **161**(2), 240-246.
- Kulinčević JM, Rothenbuhler WC (1975) Selection for resistance and susceptibility to hairless-black syndrome in the honeybee. *Journal of invertebrate pathology* **25**(3), 289-295.
- Kumar NR, Sangwan S, Badotra P (2011) Exposure to cell phone radiations produces biochemical changes in worker honey bees. *Toxicol Int* **18**, 70-72.
- Kuterbach DA, Walcott B, Reeder RJ, Frankel RB (1982) Iron-Containing Cells in the Honey Bee (*Apis mellifera*). *Science* **218**(4573), 695-7. [In eng]
- Ladas A (1972) The influence of some internal and external factors upon the insecticide resistance of honeybee. *Apidologie* **3**, 55-78.
- Lambert O (2012) Contamination chimique de matrices apicoles au sein de ruchers appartenant à des structures paysagères différentes. Thèse de doctorat d'université. Université Blaise Pascal. 350 p.
- Lambert O, Piroux M, Puyo S, Thorin C, L'Hostis M, Wiest L, Buleté A, Delbac F, Pouliquen H (2013) Widespread Occurrence of Chemical Residues in Beehive Matrices from Apiaries Located in Different Landscapes of Western France. *PLoS ONE* **8**(6), e67007.
- Lambert O, Veyrand B, et al. (2012) Polycyclic aromatic hydrocarbons: Bees, honey and pollen as sentinels for environmental chemical contaminants. *Chemosphere* **86**(1), 98-104.
- Lambin M, Armengaud C, Raymond S, Gauthier M (2001) Imidacloprid-induced facilitation of the proboscis extension reflex habituation in the honeybee. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **48**(3), 129-134.
- Langridge D, McGehee R (1967) *Crithidia mellificae* nsp an acidophilic trypanosomatide of honey bee *Apis mellifera*. *J Protozool* **14**, 485-487.
- Lanzi G, de Miranda JR, Boniotti MB, Cameron CE, Lavazza A, Capucci L, Camazine SM, Rossi C (2006) Molecular and biological characterization of deformed wing virus of honeybees (*Apis mellifera* L.). *J Virol* **80**(10), 4998-5009.
- Laughton AM, Boots M, Siva-Jothy MT (2011) The ontogeny of immunity in the honey bee, *Apis mellifera* L. following an immune challenge. *Journal of Insect Physiology* **57**(7), 1023-32. [In eng]

- Laurino D, Manino A, Patetta A, Ansaldi M, Porporato M (2010) Acute oral toxicity of neonicotinoids on different honey bee strains. *Redi-Giornale di Zoologia*(93), 99-102.
- Le Conte Y, Brunet J-L, McDonnell C, Dussaubat C, Alaux C (2011) Interactions between risk factors in honey bees. In 'Recent Investigations into the Problems with our Honey Bee Pollinators. Vol. 18.' (Eds D Sammataro and J Yoder) pp. 215-222. (Taylor & Francis Inc)
- Le Conte Y, Crauser D (2006) Vers de nouveaux systèmes de comptages automatiques d'abeilles. *Bulletin technique apicole* **33** (1), 23-30.
- Le Conte Y, Ellis M, Ritter W (2010) *Varroa* mites and honey bee health: can *Varroa* explain part of the colony losses? *Apidologie* **41**, 353-363.
- Le Conte Y, Navajas M (2008) Climate change: impact on honey bee populations and diseases. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* **27**, 499-510.
- Leat N, Ball B, Govan V, Davison S (2000) Analysis of the complete genome sequence of black queen-cell virus, a picorna-like virus of honey bees. *J Gen Virol* **81**(Pt 8), 2111-9.
- LeBlanc BW, Davis OK, Boue S, DeLucca A, Deeby T (2009a) Antioxidant activity of Sonoran Desert bee pollen. *Food Chemistry* **115**, 1299-1305.
- LeBlanc BW, Eggleston G, Sammataro D, Cornett C, Dufault R, Deeby T, St. Cyr E (2009b) Formation of Hydroxymethylfurfural in Domestic High-Fructose Corn Syrup and Its Toxicity to the Honey Bee (*Apis mellifera*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **57**(16), 7369-7376.
- Lee GM, McGee PA, Oldroyd BP (2013) Variable virulence among isolates of *Ascosphaera apis*: testing the parasite–pathogen hypothesis for the evolution of polyandry in social insects. *Naturwissenschaften* **100**(3), 229-234. [In English]
- Lee PE, Furgala B (1967) Electron microscopic observations on the localization and development of sacbrood virus. *Journal of invertebrate pathology* **9**(2), 178-187.
- Lehrman A (2007) Does pea lectin expressed transgenically in oilseed rape (*Brassica napus*) influence honey bee (*Apis mellifera*) larvae? *Environ. Biosafety Res.* **6**(4), 271-278.
- Leighton T (1983) Effectiveness and optimal selection of antibiotics for the control of American foulbrood disease. Progress report to Californian Department of Food and Agriculture, December 31.
- Li AY, Pruett JH, Davey RB, George JE (2005) Toxicological and biochemical characterization of coumaphos resistance in the San Roman strain of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology* **81**(3), 145-153.
- Li JL, Cornman RS, et al. (2014a) Systemic Spread and Propagation of a Plant-Pathogenic Virus in European Honeybees, *Apis mellifera*. *mBio* **5**(1).
- Li X, Schuler MA, Berenbaum MR (2007) Molecular Mechanisms of Metabolic Resistance to Synthetic and Natural Xenobiotics. *Annual Review of Entomology* **52**(1), 231-253.
- Li Z, Su S, Hamilton M, Yan L, Chen Y (2014b) The ability to cause infection in a pathogenic fungus uncovers a new biological feature of honey bee viruses. *Journal of invertebrate pathology* **120**(0), 18-22.
- Liljas L, Tate J, Lin T, Christian P, Johnson JE (2002) Evolutionary and taxonomic implications of conserved structural motifs between picornaviruses and insect picorna-like viruses. *Archives of Virology* **147**(1), 59-84.
- Lindström A (2008) Distribution of *Paenibacillus* larvae spores among adult honey bees (*Apis mellifera*) and the relationship with clinical symptoms of American foulbrood. *Microbial ecology* **56**(2), 253-9.
- Lindström A, Fries I (2005) Sampling of adult bees for detection of American foulbrood (*Paenibacillus larvae* subsp *larvae*) spores in honey bee (*Apis mellifera*) colonies. *Journal of Apicultural Research* **44**, 82-86.
- Lipinski Z (2006) How far should bees be located from the high voltage power lines.? *Journal of Apicultural Research* **45**(4), 240-242. [In English]



- Lipinski Z, Farjan M, Zoltowska K, Polaczek B (2008) Effects of dietary transgenic *Bacillus thuringiensis* maize pollen on hive worker honeybees. *Polish Journal of Environmental Studies* **17**(6), 957-961.
- List C, Elsholtz C, Seeley TD (2009) Independence and interdependence in collective decision making: an agent-based model of nest-site choice by honeybee swarms. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences* **364**(1518), 755-762.
- Liu B, Shu C, Xue K, Zhou K, Li X, Liu D, Zheng Y, Xu C (2009) The oral toxicity of the transgenic Bt+CpTI cotton pollen to honeybees (*Apis mellifera*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* **72**(4), 1163-1169.
- Liu TP (1990) Ultrastructural changes in the secretion granules of the hypopharyngeal glands of the honeybee infected by *Nosema apis* and after treatment with fumagillin. *Tissue and Cell* **22**(4), 523-531.
- Liu TP (1996) *Varroa* mites as carriers of honeybee chalkbrood. *American bee journal* **136**(9), 655.
- Liu X, Zhang Y, Yan X, Han R (2010) Prevention of Chinese Sacbrood Virus Infection in *Apis cerana* using RNA Interference. *Current Microbiology* **61**(5), 422-428. [In English]
- Locke B, Forsgren E, Fries I, de Miranda J (2012) Acaricide Treatment Affects Viral Dynamics in *Varroa destructor*-Infested Honey Bee Colonies via both Host Physiology and Mite Control. *Applied and environmental microbiology* **78**(1), 227-235.
- Lodesani M, Colombo M, Spreafico M (1995) Ineffectiveness of Apistan® treatment against the mite *Varroa jacobsoni* Oud in several districts of Lombardy (Italy). *Apidologie* **26**(1), 67-72.
- Loper GM, Cohen AC (1987) Amino Acid Content of Dandelion Pollen, a Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Nutritional Evaluation. *Journal of Economic Entomology* **80**(1), 14-17.
- Lourdes C, Bayarri S, Pérez-Arquillué C, Lázaro R, Molino F, Herrera A (2014) Evaluation of Heavy Metals and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Honeys from Different Origins. *Journal of Food Protection* **77**(3), 504-509.
- Lourdes J (2002) Evaluación de un método de análisis de residuos de sulfamidas, en miel de abejas (*Apis mellifera* L.), a través de cromatografía líquida de alta precisión (HPLC), en fase reversa. Thesis Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias, Escuela de Ingeniería en Alimentos, Valdivia, Chile,
- Louveaux J, Albisetti M, Delangue M, Theurkauff M (1966) Les modalités de l'adaptation des abeilles (*Apis mellifica* L.) au milieu naturel *Ann. Abeille* **9**(4), 323-350.
- Lu C, Warchol K, Callahan R (2012) *In situ* replication of honey bee colony collapse disorder. *Bulletin of Insectology* **65**(1), 99-106.
- Lumbsch HT, Huhndorf SMe (2007) Outline of Ascomycota. *Myconet* **13**, 1 - 58.
- Maassen A (1913) Weitere Mitteilungen über der seuchenhaften Brutkrankheiten der Bienen [Further communication on the epidemic brood disease of bees]. *Mitteilungen aus der Kaiserlichen Biologischen Anstalt für Land- und Forstwirtschaft* **14**, 48-58.
- Macedo P, Ellis M, Siegfried B (2002) Detection and quantification of fluvalinate resistance in *Varroa* mites in Nebraska. *American Bee Journal* (147), 523-526.
- Machado Baptista A, Carvalho G, Carvalho S, Carvalho C, JS dSBF (2009) Toxicity of pesticides used in citrus crop to *Apis mellifera* [Toxicidade de produtos fitossanitários utilizados em citros para *Apis mellifera*]. *Ciência Rural, Santa Maria* **39**(4), 955-961.
- Machova M (1970) Variations de la sensibilité aux antibiotiques souches de *Bacillus* larvae. *Bull. Apic* **13**, 5-11.
- Mallon EB, Brockmann A, Schmid-Hempel P (2003) Immune response inhibits associative learning in insects. *Proc Biol Sci* **270**(1532), 2471-3. [In eng]
- Malone L, Scott-Dupree C, Todd J, Ramankutty P (2007) Short communication: no sub-lethal toxicity to bumblebees, *Bombus terrestris*, exposed to Bt-corn pollen, captan and novaluron. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* **35**(4), 435-439.

- Malone LA, Pham-Delègue M-H (2001) Effects of transgene products on honey bees (*Apis mellifera*) and bumblebees (*Bombus sp.*). *Apidologie* **32**(4), 287-304.
- Malone LA, Todd JH, Burgess EPJ, Christeller JT (2004) Development of hypopharyngeal glands in adult honey bees fed with a Bt toxin, a biotin-binding protein and a protease inhibitor. *Apidologie* **35**(6), 655-664.
- Malone LA, Tregidga EL, *et al.* (2002) Effects of ingestion of a biotin-binding protein on adult and larval honey bees. *Apidologie* **33**(5), 447-458.
- Mao W, Schuler MA, Berenbaum MR (2011) CYP9Q-mediated detoxification of acaricides in the honey bee (*Apis mellifera*). *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**(31), 12657-12662.
- Mao W, Schuler MA, Berenbaum MR (2013) Honey constituents up-regulate detoxification and immunity genes in the western honey bee *Apis mellifera*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**(22), 8842-6. [In eng]
- Maori E, Lavi S, Mozes-Koch R, Gantman Y, Peretz Y, Edelbaum O, Tanne E, Sela I (2007a) Isolation and characterization of Israeli acute paralysis virus, a dicistrovirus affecting honeybees in Israel: evidence for diversity due to intra- and inter-species recombination. *J Gen Virol* **88**(Pt 12), 3428-3438.
- Maori E, Paldi N, Shafir S, Kalev H, Tsur E, Glick E, Sela I (2009) IAPV, a bee-affecting virus associated with Colony Collapse Disorder can be silenced by dsRNA ingestion. *Insect Molecular Biology* **18**(1), 55-60.
- Maori E, Tanne E, Sela I (2007b) Reciprocal sequence exchange between non-retro viruses and hosts leading to the appearance of new host phenotypes. *Virology* **362**(2), 342-349.
- Marchetti S, Barbattini R, D'Agaru M (1984) Comparative effectiveness of treatments used to control *Varroa Jacobsoni* Oud. *Apidologie* **15**(4), 363-378.
- Maredia KM, Dakouo D, Mota-Sanchez D (2003) 'Integrated Pest Management in the Global Arena.' (CABI Publishing: Wallingford, UK)
- Martel AC, Zeggane S, Drajnudel P, Faucon JP, Aubert M (2006) Tetracycline residues in honey after hive treatment. *Food Additives and Contaminants* **23**(3), 265-273.
- Martí JI, Del Cacho E, Josa A, Espinosa E, Muiño-Blanco T (1996) Plasma membrane glycoproteins of mature and immature drone honey bee (*Apis mellifera* L.) spermatozoa: Lectin-binding as seen by light and electron microscopy. *Theriogenology* **46**(1), 181-190.
- Martín-Hernández R, Botías C, Bailón EG, Martínez-Salvador A, Prieto L, Meana A, Higes M (2012) Microsporidia infecting *Apis mellifera*: coexistence or competition. Is *Nosema ceranae* replacing *Nosema apis*? *Environmental microbiology* **14**(8), 2127-38.
- Martin-Hernandez R, Botias C, Barrios L, Martinez-Salvador A, Meana A, Mayack C, Higes M (2011) Comparison of the energetic stress associated with experimental *Nosema ceranae* and *Nosema apis* infection of honeybees (*Apis mellifera*). *Parasitology Research* **109**(3), 605-12.
- Martin S (1998) A population model for the ectoparasitic mite *Varroa jacobsoni* in honey bee (*Apis mellifera*) colonies. *Ecological Modelling* **109**(3), 267-281.
- Martin S, Hardy J, Villalobos E, Martín-Hernández R, Nikaido S, Higes M (2013) Do the honeybee pathogens *Nosema ceranae* and deformed wing virus act synergistically? *Environmental Microbiology Reports* **5**(4), 506-510.
- Martin S, Highfield A, Brettell L, Villalobos E, Budge G, Powell M, Nikaido S, Schroeder D (2012) Global honey bee viral landscape altered by a parasitic mite. *Science* **336**(6086), 1304-6.
- Martin SJ (2001) The role of *Varroa* and viral pathogens in the collapse of honeybee colonies: a modelling approach. *Journal of Applied Ecology* **38**(5), 1082-1093.
- Martinello M, Baggio A, Gallina A, Mutinelli F (2013) Distribution of Sulfathiazole in Honey, Beeswax, and Honeybees and the Persistence of Residues in Treated Hives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **61**(38), 9275-9279.

- Martinez J, Leal G, Conget P (2012) *Nosema ceranae* an emergent pathogen of *Apis mellifera* in Chile. *Parasitology Research* **111**(2), 601-7. [In eng]
- Matsuka M, Nakamura J (1990) Oxytetracycline residues in honey and royal jelly. *J. Apic. Res.* **29**, 112-117.
- Mattila H, Otis G, Daley J, Schulz T (2000) Trials of apiguard, a thymol-based miticide part 2. Non-target effects on honey bees. *Journal American Bee Journal* **140**(1), 68-70.
- Mattila HR, Burke KM, Seeley TD (2008) Genetic diversity within honeybee colonies increases signal production by waggle-dancing foragers. *Proc Biol Sci* **275**, 809-816.
- Mattila HR, Otis GW (2006) Influence of pollen diet in spring on development of honey bee (Hymenoptera : Apidae) colonies. *Journal of Economic Entomology* **99**(3), 604-613. [In English]
- Mattila HR, Seeley TD (2007) Genetic diversity in honey bee colonies enhances productivity and fitness. *Science* **317**(5836), 362-364.
- Maurizio A (1950) The influence of pollen feeding and brood rearing on the length of life and physiological condition of the honey bee. *Bee World* **31**, 9-12.
- Mayack C, Naug D (2009) Energetic stress in the honeybee *Apis mellifera* from *Nosema ceranae* infection. *J Invertebr Pathol* **100**(3), 185-8.
- Mayack C, Naug D (2010) Parasitic infection leads to decline in hemolymph sugar levels in honeybee foragers. *Journal of Insect Physiology* **56**(11), 1572-1575.
- Mayland PG, Burkhardt CC (1970) Honey Bee Mortality As Related To Insecticide-Treated Surfaces and Bee Age. *Journal of Economic Entomology* **63**(5), 1437-1439.
- Mayo MA (2002) Virus taxonomy - Houston 2002. *Archives of Virology* **147**(5), 1071-6. [In eng]
- McMullan J, Brown MF (2006) Brood-cell size does not influence the susceptibility of honey bees (*Apis mellifera*) to infestation by tracheal mites (*Acarapis woodi*). *Experimental & Applied Acarology* **39**(3-4), 273-280.
- Medici S, Castro A, Sarlo E, Marioli J, Eguaras M (2012) The concentration effect of selected acaricides present in beeswax foundation on the survival of *Apis mellifera* colonies. *Journal of Apicultural Research* **51**(2), 164-168.
- Meeus I, de Miranda JR, de Graaf DC, Wäckers F, Smagghe G (2014) Effect of oral infection with Kashmir bee virus and Israeli acute paralysis virus on bumblebee (*Bombus terrestris*) reproductive success. *Journal of invertebrate pathology* **121**(0), 64-69.
- Meikle W, Rector B, Mercadier G, Holst N (2008) Within-day variation in continuous hive weight data as a measure of honey bee colony activity. *Apidologie* **39**(6), 694-707.
- Meled M, Thrasyvoulou A, Belzunces LP (1998) Seasonal variations in susceptibility of *Apis mellifera* to the synergistic action of prochloraz and deltamethrin. *Environmental Toxicology and Chemistry* **17**(12), 2517-2520.
- Menapace DM, Wilson WT (1979) Feeding oxytetracyclines as terramycin® does not aggravate chalkbrood infections. *Apidologie* **10**(2), 167-174.
- Mesnager R, Defarge N, Spiroux de Vendômois J, Séralini G (2014) Major Pesticides Are More Toxic to Human Cells Than Their Declared Active Principles. *BioMed Research International* **2014**, 8.
- Milbrath M, van Tran T, Huang W, Solter L, Tarpay D, Lawrence F, Huang Z (2015) Comparative virulence and competition between *Nosema apis* and *Nosema ceranae* in honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of invertebrate pathology* **125**, 9-15.
- Moeller F (1958) Relation between egg-laying capacity of queen and populations and honey production of their colonies. *American Bee Journal* **98** 401-402.
- Moffett JO, Wilson WT, Parker RL (1958) The effect of Penicel, tetracycline and erythromycin on adult bees, brood-rearing, and honey production. *Am. Bee J.* **98**, 22-24.

- Mohr S, García-Bermejo Á, Herrero L, Gómara B, Costabeber I, González M (2014) Levels of brominated flame retardants (BFRs) in honey samples from different geographic regions. *Science of The Total Environment* **472**(0), 741-745.
- Mommaerts V, Sterk G, Smaghe G (2006) Hazards and uptake of chitin synthesis inhibitors in bumblebees *Bombus terrestris*. *Pest Management Science* **62**(8), 752-758.
- Monceau K, Arca M, Leprêtre L, Mougel F, Bonnard O, Silvain J-F, Maher N, Arnold G, Thiéry D (2013) Native Prey and Invasive Predator Patterns of Foraging Activity: The Case of the Yellow-Legged Hornet Predation at European Honeybee Hives. *PLoS ONE* **8**(6), e66492.
- Mondet F, de Miranda JR, Kretzschmar A, Le Conte Y, Mercer AR (2014) On the Front Line: Quantitative Virus Dynamics in Honeybee (*Apis mellifera* L.) Colonies along a New Expansion Front of the Parasite *Varroa destructor*. *PLoS Pathog* **10**(8), e1004323.
- Moore J, Jironkin A, Chandler D, Burroughs N, Evans D, Ryabov E (2011) Recombinants between Deformed wing virus and *Varroa destructor* virus-1 may prevail in *Varroa destructor*-infested honeybee colonies. *Journal of General Virology* **92**(1), 156-161.
- Morais M, Moreira L, Feas X, Estevinho LM (2011) Honeybee-collected pollen from five Portuguese Natural Parks: Palynological origin, phenolic content, antioxidant properties and antimicrobial activity. *Food Chem Toxicol* **49**(5), 1096-101.
- Morandin L, Winston M (2003) Effects of novel pesticides on bumble bee (Hymenoptera: Apidae) colony health and foraging ability. *Environmental Entomology* **32**(3), 555-563.
- Morgenthaler O (1933) *Acarapis woodi* in queens. *Bee World*(14), 81.
- Morimoto T, Kojima Y, Yoshiyama M, Kimura K, Yang B, Kadowaki T (2012) Molecular Identification of Chronic Bee Paralysis Virus Infection in *Apis mellifera* Colonies in Japan. *Viruses* **4**(7), 1093-1103.
- Moritz RFA, Southwick EE (1992) 'Bees as superorganisms: an evolutionary reality.' (Springer-Verlag, Berlin and Heidelberg, Germany.)
- Morrissey BJ, Helgason T, Poppinga L, Fünfhaus A, Genersch E, Budge GE (2014) Biogeography of *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood, using a new multilocus sequence typing scheme. *Environmental microbiology*.
- Morse RA, Dyce EJ, Gould A, C. (1965) The treatment of American foul brood in New York state. *Bee World*(46), 15-17.
- Morse RA, Goncalves LS (1979) *Varroa* disease, a threat to world beekeeping. *Gleanings in Bee Culture* (107), 179-181.
- Mouret C, Lambert O, Piroux M, Beaudeau F, Provost B, Benet P (2013) Prevalence of 12 infectious agents in field colonies of 18 apiaries in western France. *Revue Méd. Vét.* **164**, 577-582.
- Mulholland G, Traver B, Johnson N, Fell R (2012) Individual Variability of *Nosema ceranae* Infections in *Apis mellifera* Colonies. *Insects* **3**(4), 1143-1155.
- Mullin CA, Frazier M, Frazier JL, Ashcraft S, Simonds R, van Engelsdorp D, Pettis JS (2010) High levels of miticides and agrochemicals in north american apiaries: implications for honey bee health. *Plos One* **e9754**.
- Münch D, Kreibich C, Amdam G (2013) Aging and its modulation in a long-lived worker caste of the honey bee. *The Journal of Experimental Biology* **216**(9), 1638-1649.
- Munoz I, Madrid-Jimenez MJ, P DIR (2012) Population genetic structure of coastal Croatia honeybees (*Apis mellifera carnica*). *Apidologie* **40**, 617-626.
- Murray KD, Aronstein KA, Jones WA (2005) A molecular diagnostic method for selected *Ascospaera* species using PCR amplification of internal transcribed spacer regions of rDNA. *Journal of Apicultural Research* **44**(2), 61-64.
- Mutinelli F, Baggio A, Capolongo F, Piro R, Prandin L, Biasion L (1997) A scientific note on oxalic acid by topical application for the control of varroosis. *Apidologie* **28**(6), 461-462.

- Natsopoulou M, McMahon D, Doublet V, Bryden J, Paxton R (2015) Interspecific competition in honeybee intracellular gut parasites is asymmetric and favours the spread of an emerging infectious disease. *Proc Biol Sci* **282**(1798), 20141896.
- Naug D (2009) Nutritional stress due to habitat loss may explain recent honeybee colony collapses. *Biological Conservation* **142**, 2369-2372.
- Naug D, Gibbs A (2009) Behavioral changes mediated by hunger in honeybees infected with *Nosema ceranae*. *Apidologie* **40**, 595-599.
- Navajas M, Migeon A, Alaux C, Martin-Magniette M, Robinson G, Evans J, Cros-Arteil S, Crauser D, Le Conte Y (2008) Differential gene expression of the honey bee *Apis mellifera* associated with *Varroa destructor* infection. *BMC Genomics* **9**, 301. [In eng]
- Nazzi F, Brown S, et al. (2012) Synergistic parasite-pathogen interactions mediated by host immunity can drive the collapse of honeybee colonies. *PLoS Pathog* **8**, e1002735.
- Nazzi F, Pennacchio F (2014) Disentangling multiple interactions in the hive ecosystem. *Trends in Parasitology* **30**(12), 556-561.
- Neumann P, Carreck NL (2010) Honey bee colony losses. *Journal of Apicultural Research* **49**, 1-6.
- Neumann P, Mortiz RFA (2000) Testing genetic variance hypotheses for the evolution of polyandry in the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Insectes Sociaux* **47**(3), 271-279. [In English]
- Nguyen B, Saegerman C, et al. (2009) Does imidacloprid seed-treated maize have an impact on honey bee mortality? . *Journal of Economic Entomology* **102**, 616-623.
- Nguyen NTB, Le TH (2013) Complete Genome Sequence of Sacbrood Virus Strain SBM2, Isolated from the Honeybee *Apis cerana* in Vietnam. *Genome Announcements* **1**(1).
- Nicodemo D, De Jong D, Couto RH, Malheiros EB (2013) Honey bee lines selected for high propolis production also have superior hygienic behavior and increased honey and pollen stores. *Genet Mol Res* **12**(4), 6931-8. [In eng]
- Nicodemo D, Maioli MA, Medeiros HCD, Guelfi M, Balieira KVB, De Jong D, Mingatto FE (2014) Fipronil and imidacloprid reduce honeybee mitochondrial activity. *Environmental Toxicology and Chemistry* **33**(9), 2070-2075.
- Niu G, Johnson R, Berenbaum M (2011) Toxicity of mycotoxins to honeybees and its amelioration by propolis. *Apidologie* **42**(1), 79-87. [In English]
- Nogueira Couto RH, Abe CS, Pitelli RA (1996) Effect of paraquat in *Apis mellifera* Africanized bees mortality. *Naturalia Sao Paulo*(21), 49-55.
- Nordström S (2000) Virus infections and varroa mite infestations in honey bee colonies. PhD thesis. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden.
- Nordström S, Fries I, Aarhus A, Hansen H, Korpela S (1999) Virus infections in Nordic honey bee colonies with no, low or severe *Varroa jacobsoni* infestations. *Apidologie* **30**(6), 475-484.
- Nozal M, Bernal J, Gómez L, Higes M, Meana A (2003) Determination of oxalic acid and other organic acids in honey and in some anatomic structures of bees. *Apidologie* **34**(2), 181-188.
- Nozal M, Bernal J, Martin M, Bernal J, Alvaro A (2008) Trace analysis of fumagillin in honey by liquid chromatography-diode array-electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1190**, 224-231.
- Nozal MJ, Bernal JL, Jimenez JJ, Gonzalez MJ, Higes M (2002) Extraction of thymol, eucalyptol, menthol, and camphor residues from honey and beeswax. Determination by gas chromatography with flame ionization detection. *J Chromatogr A* **954**(1-2), 207-15. [In eng]
- Odoux J, Aupinel P, Gateff S, Requier F, Henry M, Bretagnolle V (2014) Ecobee: a tool for long-term honey bee colony monitoring at the landscape scale in West European intensive agroecosystems. *Journal of Apicultural Research* **53**(1), 57-66.
- Odoux JF, Feuillet D, Aupinel P, Loublier Y, Tasei JN, Mateescu C (2012) Territorial biodiversity and consequences on physico-chemical characteristics of pollen collected by honey bee colonies. *Apidologie* **43**(5), 561-575. [In English]

- OIE (2014) 'Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals <http://www.oie.int/fr/normes-internationales/manuel-terrestre/acces-en-ligne/>.'
- OIE (2015) Maladies, infections et infestations de la Liste de l'OIE en vigueur en 2015 <http://www.oie.int/fr/sante-animale-dans-le-monde/oie-listed-diseases-2015/>.
- Okayama A, Sakogawa T, Nakajima C, Hayama T (1996) Biological properties and antibiotic susceptibility of *Bacillus larvae* originated from American foulbrood of honeybee in Japan. *J. Vet. Med. Sci* **58** (5), 439-441.
- Okumura K, Arai R, Okura M, Kirikae T, Takamatsu D, Osaki M, Miyoshi-Akiyama T (2011) Complete genome sequence of *Melissococcus plutonius* ATCC 35311. *Journal of Bacteriology* **193**(15), 4029-30.
- Oldroyd BP (2007) What's killing American honey bees? *PLoS Biology* **5**(6), 1195-1199.
- Oldroyd BP, Fewell JH (2007) Genetic diversity promotes homeostasis in insect colonies. *Trends Ecol Evol* **22**(8), 408-13.
- Olivier V, Blanchard P, *et al.* (2008a) Molecular characterisation and phylogenetic analysis of Chronic bee paralysis virus, a honey bee virus. *Virus Res* **132**(1-2), 59-68.
- Olivier V, Massou I, Celle O, Blanchard P, Schurr F, Ribière M, Gauthier M (2008b) *In situ* hybridization assays for localization of the chronic bee paralysis virus in the honey bee (*Apis mellifera*) brain. *Journal of Virological Methods* **153**(2), 232-237.
- Olivier V, Ribière M (2006) Les virus infectant l'abeille *Apis mellifera*: le point sur leur classification. *Virologie* **10**(4), 267-278.
- Olofsson TC, Vásquez A (2008) Detection and identification of a novel lactic acid bacterial flora within the honey stomach of the honeybee *Apis mellifera*. *Curr. Microbiol.* **57**, 356-363.
- Ongus JR, Peters D, Bonmatin JM, Bengsch E, Vlaskovic JM, van Oers MM (2004) Complete sequence of a picorna-like virus of the genus Iflavirus replicating in the mite *Varroa destructor*. *J Gen Virol* **85**(Pt 12), 3747-55.
- Orantes-Bermejo F, Pajuelo A, Megias M, Fernandez-Pinar C (2010) Pesticide residues in beeswax and beebread samples collected from honey bee colonies (*Apis mellifera* L.) in Spain. Possible implications for bee losses. *Journal of Apicultural Research* **48**(1), 243-250.
- Otis GW, Scott-Dupree CD (1992) Effects of *Acarapis woodi* on overwintered colonies of honey bees (Hymenoptera: Apidae) in New York. *Journal of Economic Entomology*(85), 40-46.
- Overton HA, Buck KW, Bailey L, Ball BV (1982) Relationships between the RNA components of Chronic bee paralysis virus and those of Chronic bee paralysis virus associate. *J. Gen. Virol*(63), 171-179.
- Oxley PR, Oldroyd BP (2010) The genetic architecture of bee breeding. *Advances in Insect Physiology* **39**, 82-118.
- Palacios G, Hui J, *et al.* (2008) Genetic Analysis of Israel Acute Paralysis Virus: Distinct Clusters Are Circulating in the United States. *Journal of Virology* **82**(13), 6209-6217.
- Palmer K, Oldroyd B (2003) Evidence for intra-colonial genetic variance in resistance to American foulbrood of honey bees (*Apis mellifera*): further support for the parasite/pathogen hypothesis for the evolution of polyandry. *Naturwissenschaften* **90**(6), 265-268.
- Palmer MJ, Moffat C, Saranzewa N, Harvey J, Wright GA, Connolly CN (2013) Cholinergic pesticides cause mushroom body neuronal inactivation in honeybees. *Nat Commun* **4**, 1634.
- PAN (2009) Pesticide action network. Accessed 24 February 2014, <http://www.pesticideinfo.org>.
- Papaefthimiou C, Theophilidis G (2001) The Cardiotoxic Action of the Pyrethroid Insecticide Deltamethrin, the Azole Fungicide Prochloraz, and Their Synergy on the Semi-Isolated Heart of the Bee *Apis mellifera macedonica*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **69**(2), 77-91.
- Paradis D, Bérail G, Bonmatin J, Belzunces L (2013) Sensitive analytical methods for 22 relevant insecticides of 3 chemical families in honey by GC-MS/MS and LC-MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **406**(2), 621-633.

- Paxton RJ, Klee J, Korpela S, Fries I (2007) *Nosema ceranae* has infected *Apis mellifera* in Europe since at least 1998 and may be more virulent than *Nosema apis*. *Apidologie* **38**, 558-565.
- Peng CY-S, Mussen E, Fong A, Cheng P, Wong G, Montague MA (1996) Laboratory and Field Studies on the Effects of the Antibiotic Tylosin on Honey Bee *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) Development and Prevention of American Foulbrood Disease. *Journal of invertebrate pathology* **67**(1), 65-71.
- Peng W, Li J, Boncristiani H, Strange J, Hamilton M, Chen Y (2011) Host range expansion of honey bee Black Queen Cell Virus in the bumble bee, *Bombus huntii*. *Apidologie* **42**(5), 650-658.
- Peng Y-SC, Mussen E, Fong A, Montague MA, Tyler T (1992) Effects of chlortetracycline of honey bee worker larvae reared in vitro. *Journal of invertebrate pathology* **60**(2), 127-133.
- Pernal SF, Albright RL, Melathopoulos AP (2008) Evaluation of the shaking technique for the economic management of American foulbrood disease of honey bees (Hymenoptera: Apidae). *J Econ Entomol* **101**(4), 1095-104.
- Pernal SF, Currie RW (2000) Pollen quality of fresh and 1-year-old single pollen diets for worker honey bees (*Apis mellifera* L.). *Apidologie* **31**, 387-409.
- Pernal SF, Currie RW (2001) The influence of pollen quality on foraging behavior in honeybees (*Apis mellifera* L.). *Behavioral Ecology and Sociobiology* **51**(1), 53-68.
- Perugini M, Di Serafino G, Giacomelli A, Medrzycki P, Sabatini AG, Persano Oddo L, Marinelli E, Amorena M (2009) Monitoring of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Bees (*Apis mellifera*) and Honey in Urban Areas and Wildlife Reserves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **57**(16), 7440-7444.
- Peters M, Kilwinski J, Beringhoff A, Reckling D, Genersch E (2006) American foulbrood of the honey bee: occurrence and distribution of different genotypes of *Paenibacillus larvae* in the administrative district of Arnsberg (North Rhine-Westphalia). *Journal of veterinary medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health* **53**(2), 100-4.
- Pettis J, Delaplane K (2010) Coordinated responses to honey bee decline in the USA\*. *Apidologie* **41**(3), 256-263.
- Pettis J, Lichtenberg E, Andree M, Stitzinger J, Rose R, vanEngelsdorp D (2013) Crop Pollination Exposes Honey Bees to Pesticides Which Alters Their Susceptibility to the Gut Pathogen *Nosema ceranae*. *PLoS ONE* **8**(7), e70182.
- Pettis J, S., Wilson W, T., Shimanuki H, Teel P, D. (1991) Fluvalinate treatment of queen and worker honey bees (*Apis mellifera* L) and effects on subsequent mortality, queen acceptance and supersedure. *Apidologie* **22**(1), 1-7.
- Pettis J, VanEngelsdorp D, Cox-Foster D (2007) Colony collapse disorder working group pathogen sub-group progress report. *American Bee Journal* **147**(7), 595-597.
- Pettis J, VanEngelsdorp D, Johnson J, Dively G (2012) Pesticide exposure in honey bees results in increased levels of the gut pathogen *Nosema*. *Naturwissenschaften* **99**(2), 153-8. [In eng]
- Pettis JS, Collins AM, Wilbanks R, Feldlaufer MF (2004) Effects of coumaphos on queen rearing in the honey bee, *Apis mellifera*. *Apidologie* **35**(6), 605-610.
- Pham-Delègue M, Decourtye A, Kaiser L, Devillers J (2002) Behavioural methods to assess the effects of pesticides on honey bees. *Apidologie* **33**(5), 425-432.
- Phibbs A (1996) Three year survey of varroa mite and tracheal mite infestations of honey bees in Wisconsin. *American Bee Journal* **136**, 589-592.
- Pilling E, Campbell P, Coulson M, Ruddle N, Tornier I (2013) A Four-Year Field Program Investigating Long-Term Effects of Repeated Exposure of Honey Bee Colonies to Flowering Crops Treated with Thiamethoxam. *PLoS ONE* **8**(10), e77193.
- Pilling ED, Bromleychallenor KAC, Walker CH, Jepson PC (1995) Mechanism of Synergism between the Pyrethroid Insecticide  $\lambda$ -Cyhalothrin and the Imidazole Fungicide Prochloraz, in the Honeybee (*Apis mellifera* L.). *Pesticide Biochemistry and Physiology* **51**(1), 1-11.

- Pilling ED, Jepson PC (1993) Synergism between EBI fungicides and a pyrethroid insecticide in the honeybee (*Apis mellifera*). *Pesticide Science* **39**(4), 293-297.
- Pinto L, Bitondi M, Simões Z (2000) Inhibition of vitellogenin synthesis in *Apis mellifera* workers by a juvenile hormone analogue, pyriproxyfen. *Journal of Insect Physiology* **46**(2), 153-160.
- Pirk C, Human H, Crewe R, vanEngelsdorp D (2014) A survey of managed honey bee colony losses in the Republic of South Africa - 2009 to 2011. *J. Apic. Res.* **53**, 35-42.
- Piroux M, Lambert O, Puyo S, Farrera I, Thorin C, L'Hostis M, Vigues B, Bastian S (2014) Correlating the pollens gathered by *Apis mellifera* with the landscape features in Western France *Applied Ecology and Environmental Research* **12**(2), 423-439.
- Pisa LW, Amaral-Rogers V, et al. (2015) Effects of neonicotinoids and fipronil on non-target invertebrates. *Environmental Science and Pollution Research* **22**(1), 68-102.
- Plischuk S, Martín-Hernández R, Prieto L, Lucía M, Botías C, Meana A, Abrahamovich AH, Lange C, Higes M (2009) South American native bumblebees (Hymenoptera: Apidae) infected by *Nosema ceranae* (Microsporidia), an emerging pathogen of honeybees (*Apis mellifera*). *Environmental Microbiology Reports* **1**(2), 131-135.
- Poirot B, Nervers V, Gomez-Krämer P, Ménard M, Crauser D, Le Conte Y (2012) Utilisation d'un compteur d'abeilles par vidéosurveillance pour le suivi à distance et en temps réel de la mortalité au sein des colonies. In 'Journée Scientifique Apicole, Arles, 11 février 2011.' Ed. OLeMLH JM Barbançon) pp. 100pp)
- Pollack P (2011) 'Fine Chemicals: The Industry and the Business.' (2nd ed. John Wiley & Sons, New Jersey.)
- Potts S, Biesmeijer J, Kremen C, Neumann P, Schweiger O, Kunin W (2010) Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends in Ecology & Evolution* **25**(6), 345-353.
- Priestley C, Williamson E, Wafford K, Sattelle D (2003) Thymol, a constituent of thyme essential oil, is a positive allosteric modulator of human GABA(A) receptors and a homo-oligomeric GABA receptor from *Drosophila melanogaster*. *British J. Pharmacol* **140**(8), 1363-72.
- Provost B (2013) Agents infectieux et qualités physiologiques et reproductrices des reines : identification de marqueurs sanitaires et physiologiques indicateurs de la qualité de la reproduction. In 'Programme communautaire apicole 2011-2013, synthèse des travaux réalisés au cours des années 1 et 2.' pp. 72 p)
- Purwar JP, Sachan GC (2006) Synergistic effect of entomogenous fungi on some insecticides against Bihar hairy caterpillar *Spilarctia obliqua* (Lepidoptera: Arctiidae). *Microbiological Research* **161**(1), 38-42.
- Puškadija Z, Štefanić E, A. M, Zdunić Z, Paradžiković N, Florijančić T, Opačak A (2007) Influence of weather conditions on honey bee visits (*Apis mellifera carnica*) during sunflower (*Helianthus annuus* L.) blooming period. *Poljoprivreda* **13**, 230-233.
- Qin X, Evans JD, Aronstein KA, Murray KD, Weinstock GM (2006) Genome sequences of the honey bee pathogens *Paenibacillus larvae* and *Ascosphaera apis*. *Insect Mol Biol* **15**(5), 715-8.
- Quarles W (1996) EPA exempts least-toxic pesticides. *IPM Practitioner* **18**, 16-17.
- Rabea E, Nasr H, Badawy MI (2010) Toxic Effect and Biochemical Study of Chlorfluazuron, Oxymatrine, and Spinosad on Honey Bees (*Apis mellifera*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **58**(3), 722-732.
- Rademacher E, Harz M (2006) Oxalic acid for the control of varroosis in honey bee colonies – a review. *Apidologie* **37**(1), 98-120.
- Raes H, Cornelis R, Rzeznik U (1992) Distribution, accumulation and depuration of administered lead in adult honeybees,. *Sci. Total Environ.* **113**, 269-279.
- Ramakrishnan R, Suiter DR, Nakatsu CH, Humber RA, Bennett GW (1999) Imidacloprid-enhanced *Reticulitermes flavipes* (Isoptera : Rhinotermitidae) susceptibility to the van entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Economic Entomology* **92**, 1125-1132.



- Ramirez-Romero R, Chaufaux J, Pham-Delègue M-H (2005) Effects of Cry1Ab protoxin, deltamethrin and imidacloprid on the foraging activity and the learning performances of the honeybee *Apis mellifera*, a comparative approach. *Apidologie* **36**(4), 601-611.
- Ramirez-Romero R, Desneux N, Decourtye A, Chaffiol A, Pham-Delègue MH (2008) Does Cry1Ab protein affect learning performances of the honey bee *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae)? *Ecotoxicology and Environmental Safety* **70**(2), 327-333.
- Randolt K, Gimple O, Geissendörfer J, Reinders J, Prusko C, Mueller M, Albert S, Tautz J, Beier H (2008) Immune-related proteins induced in the hemolymph after aseptic and septic injury differ in honey bee worker larvae and adults. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **69**(4), 155-167.
- Rauch S, Ashiralieva A, Hedtke K, Genersch E (2009) Negative correlation between individual-insect-level virulence and colony-level virulence of *Paenibacillus larvae*, the etiological agent of American foulbrood of honeybees. *Applied and environmental microbiology* **75**(10), 3344-7.
- Ravoet J, Maharramov J, Meeus I, De Smet L, Wenseleers T, Smagghe G, de Graaf DC (2013) Comprehensive bee pathogen screening in Belgium reveals *Crithidia mellificae* as a new contributory factor to winter mortality. *PLoS ONE* **8**(8), e72443.
- Reddy K, Noh J, *et al.* (2013a) Analysis of the complete genome sequence and capsid region of black queen cell viruses from infected honeybees (*Apis mellifera*) in Korea. *Virus Genes* **47**(1), 126-132.
- Reddy K, Yoo M-S, *et al.* (2014) Analysis of the RdRp, intergenic and structural polyprotein regions, and the complete genome sequence of Kashmir bee virus from infected honeybees (*Apis mellifera*) in Korea. *Virus Genes* **49**(1), 137-144.
- Reddy KE, Noh JH, Kim Y-H, Yoo MS, Doan HTT, Ramya M, Jung S-C, Quyen DV, Kang S-W (2013b) Analysis of the nonstructural and structural polyprotein regions, and complete genome sequences of Israel acute paralysis viruses identified from honeybees (*Apis mellifera*) in Korea. *Virology* **444**(1-2), 211-217.
- Redfern R, Knox D (1974) Adult honeybee: relative toxicity of two juvenile hormone analogues. *American bee journal* **114**(12), 456.
- Rembold H, Sharma G, Czoppelt C, Schmutterer H (1982) Azadirachtin: A potent insect growth regulator of plant origin. *Zeitschrift Angewandte Entomologie* **93**, 12-17.
- Rennich K, Pettis J, VanEngelsdorp D, Bozarth R, Eversole H, Roccacasecca K (2012) 2011-2012 National honey bee pests and diseases survey report. Available: [http://www.aphis.usda.gov/plant\\_health/plant\\_pest\\_info/honey\\_bees/downloads/2011\\_National\\_Survey\\_Report.pdf](http://www.aphis.usda.gov/plant_health/plant_pest_info/honey_bees/downloads/2011_National_Survey_Report.pdf) [March 2012].
- Rennie J (1921) Isle of Wight disease in hive bees - acarine disease : the organism associated with the disease - *Tarsonemus woodi*, n. sp. *Transaction of the Royal Society of Edinburgh*(52), 768-779.
- Requier F, Odoux J, Tamic T, Moreau N, Henry M, Decourtye A, Bretagnolle V (Sous presse) Honey bee diet in intensive farmland habitats reveals an unexpectedly high flower richness and a major role of weeds. *Ecological Applications*.
- Retschnig G, Neumann P, Williams G (2014a) Thiacloprid–*Nosema ceranae* interactions in honey bees: Host survivorship but not parasite reproduction is dependent on pesticide dose. *Journal of invertebrate pathology* **118**(0), 18-19.
- Retschnig G, Williams GR, Mehmman MM, Yañez O, de Miranda JR, Neumann P (2014b) Sex-Specific Differences in Pathogen Susceptibility in Honey Bees (*Apis mellifera*). *PLoS ONE* **9**(1), e85261.
- Reybroeck W (2003) Residues of antibiotics and sulphonamides in honey on the Belgian market. *Apiacta* **38**, 23-30.
- Reybroeck W, Daeseleire E, De Brabander HF, Herman L (2012) Antimicrobials in beekeeping. *Veterinary Microbiology* **158**(1-2), 1-11.

- Reynaldi FJ, Lopez AC, Albo GN, Alippi AM, (2003) Genomic fingerprinting. *Journal of Apicultural Research* **42** (4), 68-76.
- Rivière M, Ball B, Aubert M (2008) Natural history and geographical distribution of honey bee viruses. In :Virology and the Honey bee. Aubert, M. , Ball, B. , Fries, I. , Moritz, R. , Milani. N. , Bernardinelli, I. Editors. European Commission.
- Rivière M, Lallemand P, Iscache A-L, Schurr F, Celle O, Blanchard P, Olivier V, Faucon J-P (2007) Spread of Infectious Chronic Bee Paralysis Virus by Honeybee (*Apis mellifera* L.) Feces. *Applied and environmental microbiology* **73**(23), 7711-7716.
- Rivière M, Olivier V, Blanchard P (2010) Chronic bee paralysis: a disease and a virus like no other? *Journal of invertebrate pathology* **103 Suppl**, S120-31.
- Rivière M, Triboulot C, Mathieu L, Aurières C, Faucon J-P, Pépin M (2002) Molecular diagnosis of chronic bee paralysis virus infection. *Apidologie* **33**(3), 339-351.
- Richard F-J, Aubert A, Grozinger CM (2008) Modulation of social interactions by immune stimulation in honey bee, *Apis mellifera*, workers. *BMC Biology* **6**(1), 50.
- Richard F-J, Schal C, Tarry D, Grozinger CM (2011) Effects of instrumental insemination and insemination quantity on Dufour's gland chemical profiles and vitellogenin expression in honey bee queens (*Apis mellifera*). *Journal of Chemical Ecology* **37**, 1027-1036.
- Richard F-J, Tarry DR, Grozinger CM (2007) Effects of Insemination Quantity on Honey Bee Queen Physiology. *PLoS ONE* **2**(10), e980.
- Richard FJ, Holt HL, Grozinger CM (2012) Effects of immunostimulation on social behavior, chemical communication and genome-wide gene expression in honey bee workers (*Apis mellifera*). *BMC Genomics* **13**, 558. [In eng]
- Riessberger U, Crailsheim K (1997) Short-term effect of different weather conditions upon the behaviour of forager and nurse honey bees (*Apis mellifera carnica* Pollmann). *Apidologie* **28**(6), 411-426. [In English]
- Rinderer T (1986) 'Bee Genetics and Breeding.' (Academic Press: New York)
- Rinderer T, de Guzman L, Lancaster V, Delatte G, Stelzer J (1999) *Varroa* in the mating yard: I. The effects of *Varroa jacobsoni* and Apistan® on drone honey bees. *Am. Bee J.* **139**(2), 134-139.
- Rinderer TE, Danka RG, Johnson S, Bourgeois AL, Frake AM, Villa JD, Guzman LID, Harris JW (2014) Functionality of *Varroa*-Resistant Honey Bees (Hymenoptera: Apidae) When Used for Western U.S. Honey Production and Almond Pollination. *Journal of Economic Entomology* **107**(2), 523-530.
- Rinderer TE, Elliott KD (1977) Worker honey bee response to infection with *Nosema apis*. *J. Econ. Entomol.* **70**, 431-433.
- Rinderer TE, Rothenbuhler WC (1975) The fate and effect of hairs removed from honeybees with hairless-black syndrome. *Journal of invertebrate pathology* **26**(3), 305-308.
- Rinderer TE, Rothenbuhler WC, Gochnauer TA (1974) The influence of pollen on the susceptibility of honey-bee larvae to *Bacillus larvae*. *J Invertebr Pathol.* **23**, 347-350.
- Rivière M, Rivière M, Chauzat M (2013) Recent molecular biology methods for foulbrood and nosemosis diagnosis. *Rev Sci Tech* **32**(3), 885-92.
- Robinson GE (1985) Effects of a juvenile hormone analogue on honey bee foraging behaviour and alarm pheromone production. *Journal of Insect Physiology* **31**(4), 277-282.
- Robinson GE (1987) Regulation of honey bee age polyethism by juvenile hormone. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **20**(5), 329-338.
- Roetschi A, Berthoud H, Kuhn R, Imdorf A (2008) Infection rate based on quantitative real-time PCR of *Melissococcus plutonius* , the causal agent of European foulbrood, in honeybee colonies before and after apiary sanitation. *Apidologie* **39**(3), 362-371.
- Romaniuk K, Wawrzyniak S (1991) Effect of *Varroa jacobsoni* on worker bee body weight. *Medycyna Weterynaryjna* **47**(1), 12-13.

- Rome Q, Villemant C (2011) *Vespa velutina* Fiche d'aide à l'identification. [http://inpn.mnhn.fr/docs/Vespa\\_velutina/Fiches\\_Identification\\_Vespa\\_velutina\\_MNHN.pdf](http://inpn.mnhn.fr/docs/Vespa_velutina/Fiches_Identification_Vespa_velutina_MNHN.pdf)
- Rondeau G, Sanchez-Bayo F, Tennekes HA, Decourtye A, Ramirez-Romero R, Desneux N (2014) Delayed and time-cumulative toxicity of imidacloprid in bees, ants and termites. *Sci. Rep.* **4**.
- Root AI (1990) *ABC and XYZ of Bee Culture*, 40th Edition edition. The A.I. Root Company, Medina, Ohio, USA.
- Rortais A, Arnold G, Halm MP, Touffet-Briens F (2005) Modes of honeybees exposure to systemic insecticides: estimated amounts of contaminated pollen and nectar consumed by different categories of bees. *Apidologie* **36**(1), 71-83.
- Rosenkranz P, Aumeier P, Ziegelmann B (2010) Biology and control of *Varroa destructor*. *J Invertebr Pathol* **103**, 96-119.
- Roudel M, Aufauvre J, Corbara B, Delbac F, Blot N (2013) New insights on the genetic diversity of the honeybee parasite *Nosema ceranae* based on multilocus sequence analysis. *Parasitology* **140**(11), 1346-1356.
- Roulston TH, Cane JH (2000) Pollen nutritional content and digestibility for animals. *Plant Systematics and Evolution* **222**, 187-209.
- Runckel C, Flenniken ML, Engel JC, Ruby JG, Ganem D, Andino R, DeRisi JL (2011) Temporal analysis of the honey bee microbiome reveals four novel viruses and seasonal prevalence of known viruses, *Nosema*, and *Crithidia*. *PLoS ONE* **6**(6), e20656-e20656.
- Rusenova N, Parvanov P, Stanilova S (2013) Molecular typing of *Paenibacillus larvae* strains isolated from Bulgarian apiaries based on repetitive element polymerase chain reaction (Rep-PCR). *Current Microbiology* **66**(6), 573-7.
- Ruttner F (1988) 'Biogeography and taxonomy of honeybees,.' (Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New-york, Paris)
- Ryabov E, Wood G, Fannon J, Moore J, Bull J, Chandler D, Mead A, Burroughs N, Evans D (2014) A Virulent Strain of Deformed Wing Virus (DWV) of Honeybees (*Apis mellifera*) Prevails after *Varroa destructor*-Mediated, or *In Vitro*, Transmission. *PLoS Pathog* **10**(6), e1004230.
- Sabaté DC, Carrillo L, Carina Audisio M (2009) Inhibition of *Paenibacillus larvae* and *Ascosphaera apis* by *Bacillus subtilis* isolated from honeybee gut and honey samples. *Research in Microbiology* **160**(3), 193-199.
- Sagili RR, Pankiw T, Zhu-Salzman K (2005) Effects of soybean trypsin inhibitor on hypopharyngeal gland protein content, total midgut protease activity and survival of the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Journal of Insect Physiology* **51**(9), 953-957.
- Sakagami S, Fukuda H (1968) Life tables for worker honeybees. *Researches on Population Ecology* **10**(2), 127-139.
- Sammataro D, Gerson U, Needham G (2000) Parasitic mites of honey bees: life history, implications, and impact. *Annu Rev Entomol* **45**, 519-48.
- Sammataro D, Untalan P, Guerrero F, Finley J (2005) The resistance of *Varroa* mites (Acari: Varroidae) to acaricides and the presence of esterase. *International Journal of Acarology* **31**(1), 67-74.
- Sanchez-Bayo F, Goka K (2014) Pesticide Residues and Bees – A Risk Assessment. *PLoS ONE* **9**(4), e94482.
- Santillán-Galicia MT, Carzaniga R, Ball BV, Alderson PG (2008) Immunolocalization of deformed wing virus particles within the mite *Varroa destructor*. *Journal of General Virology* **89**(7), 1685-1689.
- Santos AV, de Oliveira BL, Samuels RI (2007) Selection of entomopathogenic fungi for use in combination with sub-lethal doses of imidacloprid: perspectives for the control of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera : Formicidae). *Mycopathologia* **163**, 233-240.

- Sasagawa H, Sasaki M, Okada I (1989) Hormonal control of the division of labor in adult honeybees (*Apis mellifera* L.) I. Effect of methoprene on *corpora allata* and hypopharyngeal gland, and its  $\alpha$ -glucosidase activity. *Appl. Entomol. Zool.* **24**, 66-77.
- Savoy Perroud M-C, Le-Breton M-H, Graveleau L, Diserens JM Validation of an ELISA kit for the detection of fluoroquinolones in honey. In 'Poster at 41st Apimondia Congress, September 15-20, Montpellier, France', 2009,
- Scheiner R (2012) Birth weight and sucrose responsiveness predict cognitive skills of honeybee foragers. *Animal Behaviour* **84**(2), 305-308.
- Schild H-A, Fuchs SW, Bode HB, Grünewald B (2014) Low-molecular-weight metabolites secreted by *Paenibacillus larvae* as potential virulence factors of American foulbrood. *Applied and environmental microbiology* **80**(8), 2484-92.
- Schmehl D, Teal P, Frazier J, Grozinger C (2014) Genomic analysis of the interaction between pesticide exposure and nutrition in honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Insect Physiology* **71**(0), 177-190.
- Schmickl T, Crailsheim K (2001) Cannibalism and early capping: strategy of honeybee colonies in times of experimental pollen shortages. *Journal of Comparative Physiology a-Sensory Neural and Behavioral Physiology* **187**(7), 541-547. [In English]
- Schmickl T, Crailsheim K (2007) HoPoMo: A model of honeybee intracolony population dynamics and resource management. *Ecol Modell* **204**, 219-245.
- Schmickl T, Crailsheim K (2008) Analysing honeybees' division of labour in broodcare by a multi-agent model. *Artificial Life*(11), 529-536.
- Schmid MR, Brockmann A, Pirk CW, Stanley DW, Tautz J (2008) Adult honeybees (*Apis mellifera* L.) abandon hemocytic, but not phenoloxidase-based immunity. *Journal of Insect Physiology* **54**(2), 439-44. [In eng]
- Schmidt JO (1984) Feeding preferences of *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae): individual versus mixed pollen species. *Journal of the Kansas Entomological Society* **57**, 323-327.
- Schmidt JO, Thoenes SC, Levin MD (1987) Survival of honey bees, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae), fed various pollen sources. *J. Econ. Entomol.* **80**, 176-183.
- Schmidt LS, Schmidt JO, Rao H, Wang W, Xu L (1995) Feeding preference and survival of young worker honey bees (Hymenoptera:Apidae) fed rape, sesame, and sunflower pollen. *Journal of Economic Entomology* **88**, 1591-1595.
- Schmuck R (2004) Effects of a Chronic Dietary Exposure of the Honeybee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) to Imidacloprid. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **47**(4), 471-478.
- Schmuck R, Nauen R, Ebbinghaus-Kintscher U (2003a) Effects of imidacloprid and common plant metabolites of imidacloprid in the honeybee: toxicological and biochemical considerations. *Bulletin of Insectology*(56), 27-34.
- Schmuck R, Stadler T, Schmidt H-W (2003b) Field relevance of a synergistic effect observed in the laboratory between an EBI fungicide and a chloronicotinyl insecticide in the honeybee (*Apis mellifera* L, Hymenoptera). *Pest Management Science* **59**(3), 279-286.
- Schneider CW, Tautz J, Grünewald B, Fuchs S (2012) RFID Tracking of Sublethal Effects of Two Neonicotinoid Insecticides on the Foraging Behavior of *Apis mellifera*. *PLoS ONE* **7**(1), e30023.
- Schulz DJ, Robinson GE (2001) Octopamine influences division of labor in honey bee colonies. *Journal of Comparative Physiology. A, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology* **187**(1), 53-61.
- Schwarz R, Evans J (2013) Single and mixed-species trypanosome and microsporidia infections elicit distinct, ephemeral cellular and humoral immune responses in honey bees. *Developmental & Comparative Immunology* **40**(3-4), 300-310.
- Scudamore C, MacMillan I, Carr J (2012) An improved double embedding technique for the microscopic evaluation of honey bees. *Journal of Apicultural Research* **51**(4), 365-366.

- Seehuus SC, Norberg K, Gimsa U, Krekling T, Amdam GV (2006) Reproductive protein protects functionally sterile honey bee workers from oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(4), 962-7.
- Seeley TD (1995) 'The wisdom of the hive. The social physiology of honey bee colonies.' (MA: Harvard University Press: Cambridge)
- Seeley TD, Tarpay DR (2007) Queen promiscuity lowers disease within honeybee colonies. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **274**, 67-72.
- Sguazza GH, Reynaldi FJ, Galosi CM, Pecoraro MR (2013) Simultaneous detection of bee viruses by multiplex PCR. *Journal of Virological Methods* **194**(1-2), 102-106.
- Sharma VP, Kumar NR (2010) Changes in honeybee behaviour and biology under the influence of cellphone radiations. *Current Science* **98**(10), 1376-1378. [In English]
- Shawki MA-A, Táborský V, Kamler F, Kazda J (2005) Effect of two neemAzal™ formulations on honeybees under semi-field conditions. *Plant Protect. Sci.* **41** 63-72.
- Shen M, Cui L, Ostiguy N, Cox-Foster D (2005a) Intricate transmission routes and interactions between picorna-like viruses (Kashmir bee virus and sacbrood virus) with the honeybee host and the parasitic *Varroa* mite. *Journal of General Virology* **86**(8), 2281-2289.
- Shen M, Yang X, Cox-Foster D, Cui L (2005b) The role of *Varroa* mites in infections of Kashmir bee virus (KBV) and deformed wing virus (DWV) in honey bees. *Virology* **342**(1), 141-149.
- Sheppard W (2012) Honey bee genetic diversity and breeding -towards the reintroduction of European germplasm. *American Bee Journal* 152-158.
- Shimanuki H, Calderone NW, Knox DA (1994) Parasitic mite syndrome : the symptoms. *American Bee Journal* **134**(12), 827-828.
- Shimanuki H, Knox DA, Feldlaufer MF (1992) Honey bee disease interactions: The impact of chalkbrood on other honey bee brood diseases. *Am. Bee J.* **132**, 735-736.
- Shutler D, Head K, Burgher-MacLellan KL, Colwell MJ, Levitt AL, Ostiguy N, Williams GR (2014) Honey Bee *Apis mellifera* Parasites in the Absence of *Nosema ceranae* Fungi and *Varroa destructor* Mites. *PLoS ONE* **9**(6), e98599.
- Siede R, Buchler R (2006) Spatial distribution patterns of Acute Bee Paralysis Virus, Black Queen Cell Virus and Sacbrood Virus in Hesse, Germany. *Veterinary Medicine. Austria/Wien. Tierarztl. Mschr.* (93), 90-93.
- Siede R, Derakhshifar I, Otten C, Berenyi O, Bakonyi T, Koglbberger H, Buchler R (2005) Prevalence of Kashmir bee virus in central Europe. *Journal of Apicultural Research* **44** (3), 131-132.
- Siede R, König M, Büchler R, Failing K, Thiel H-J (2008) A real-time PCR based survey on acute bee paralysis virus in German bee colonies. *Apidologie* **39**(6), 650-661.
- Siede R, Meixner MD, Buchler R (2012) Comparison of transcriptional changes of immune genes to experimental challenge in the honey bee (*Apis mellifera*). *Journal of Apicultural Research* **51**(4), 320-328. [In English]
- Simon-Delso N, Amaral-Rogers V, et al. (2015) Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites. *Environmental Science and Pollution Research* **22**(1), 5-34.
- Simon-Delso N, San Martin G, Bruneau E, Minsart L, Mouret C, Hautier L (2014) Honeybee Colony Disorder in Crop Areas: The Role of Pesticides and Viruses. *PLoS ONE* **9**(7), e103073.
- Simone-Finstrom M, Spivak M (2010) Propolis and bee health: the natural history and significance of resin use by honey bees. *Apidologie* **41**(3), 295-311. [In English]
- Simone-Finstrom MD, Spivak M (2012) Increased resin collection after parasite challenge: A case of self-medication in honey bees? *PLoS ONE* **7**(3).
- Simone M, Evans JD, Spivak M (2009) Resin collection and social immunity in honey bees. *Evolution* **63**(11), 3016-22.

- Smart MD, Sheppard WS (2012) *Nosema ceranae* in age cohorts of the western honey bee (*Apis mellifera*). *Journal of invertebrate pathology* **109**(1), 148-151.
- Smith CR, Toth AL, Suarez AV, Robinson GE (2008) Genetic and genomic analyses of the division of labour in insect societies. *Nature Reviews: Genetics* **9**, 735-748.
- Smith G, Bromenshenk J, Jones D, Alnasser G (2002) Volatile and semi-volatile organic compounds in beehive atmospheres. In 'Honey Bees: Estimating the Environmental Impact of Chemicals.' Ed. E J. Devillers and M.H. Pham-Delègue pp. 12-41. (Taylor and Francis, London)
- Smodiš Škerl M, Velikonja Bolta Š, Baša Česnik H, Gregorc A (2009) Residues of Pesticides in Honeybee (*Apis mellifera carnica*) Bee Bread and in Pollen Loads from Treated Apple Orchards. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **83**(3), 374-377.
- Smodiš Škerl MI, Gregorc A (2010) Heat shock proteins and cell death in situ localisation in hypopharyngeal glands of honeybee (*Apis mellifera carnica*) workers after imidacloprid or coumaphos treatment. *Apidologie* **41**(1), 73-86.
- Solignac M, Cornuet JM, Vautrin D, Le Conte Y, Anderson D, Evans J, Cros-Arteil S, Navajas M (2005) The invasive Korea and Japan types of *Varroa destructor*, ectoparasitic mites of the Western honeybee (*Apis mellifera*), are two partly isolated clones. *Proc Biol Sci* **272**(1561), 411-9.
- Song C, Scharf M (2008) Formic acid: A neurologically active, hydrolyzed metabolite of insecticidal formate esters. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **92**(2), 77-82.
- Spivak M, Reuter GS (2001a) Resistance to American foulbrood disease by honey bee colonies *Apis mellifera* bred for hygienic behavior. *Apidologie* **32**(6), 555-565. [In English]
- Spivak M, Reuter GS (2001b) *Varroa jacobsoni* infestation in untreated honey bee (Hymenoptera:Apidae) colonies selected for hygienic behavior. *Journal of Economic Entomology* **94**, 326-331.
- Spreefico M, Romana Eördegh F, Bernardinelli I, Colombo M (2001) First detection of strains of *Varroa destructor* resistant to coumaphos. Results of laboratory tests and field trials. *Apidologie* **32**(1), 49-55.
- Stabentheiner A, Pressl H, Papst T, Hrasnigg N, Crailsheim K (2003) Endothermic heat production in honeybee winter clusters. *Journal of Experimental Biology* **206**(2), 353-358.
- Stabentheiner A, Schmaranzer S (1987) Thermographic Determination of Body Temperatures in Honey Bees and Hornets : Calibration and Applications. *Thermology* **2**, 563-572.
- Standifer LN (1967) A comparison of the protein quality of pollens for growth-stimulation of the hypopharyngeal glands and longevity of honey bees, *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). *Insectes Sociaux* **14**(4), 415-425. [In English]
- Starks PT, Blackie CA, Seeley TD (2000) Fever in honeybee colonies. *Naturwissenschaften* **87**(5), 229-31.
- Steffan-Dewenter I, Kuhn A (2003) Honeybee foraging in differentially structured landscapes. *Proc Biol Sci* **270**(1515), 569-75.
- Stevanovic J, Stanimirovic Z, Genersch E, Kovacevic SR, Ljubenkovic J, Radakovic M, Aleksic N (2010) Dominance of *Nosema ceranae* in honey bees in the Balkan countries in the absence of symptoms of colony collapse disorder. *Apidologie*.
- Stoltz D, Shen XR, Boggis C, Sisson G (1995) Molecular diagnosis of Kashmir bee virus infection. *Journal of Apicultural Research* **34**(3), 153-160.
- Stoya W, Wachendörfer G, Kary I, Siebentritt P, Kaiser E (1986) Ameisensäure als Therapeutikum gegen Varroatose und ihre Auswirkungen auf den Honig. *Deutsche Lebensmittel-Rundsch* **82**, 217-221.
- Strachecka A, Olszewski K, Paleolog J, Borsuk G, Bajda M, Krauze M, Merska M, Chobotow J (2014) Coenzyme Q10 treatments influence the lifespan and key biochemical resistance systems in the honeybee, *Apis mellifera* *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **86**(3), 165-179.

- Strange J, Garnery L, Sheppard W (2007) Persistence of the Landes ecotype of *Apis mellifera mellifera* in southwest France: confirmation of a locally adaptive annual brood cycle trait. *Apidologie, Springer Verlag (Germany)* **38** (3), 259-267.
- Streit S, Bock F, Pirk CWW, Tautz J (2003) Automatic life-long monitoring of individual insect behaviour now possible. *Zoology* **106**(3), 169-171.
- Struye M, H., Mortier H, J., Arnold G, Miniggio C, Borneck R (1994) Microprocessor-controlled monitoring of honeybee flight activity at the hive entrance. *Apidologie* **25**(4), 384-395.
- Suchail S, De Sousa G, Rahmani R, Belzunces L (2004a) *In vivo* distribution and metabolism of <sup>14</sup>C-imidacloprid in different compartments of *Apis mellifera* L. *Pest Management Science* **60**(11), 1056-1062.
- Suchail S, Debrauwer L, Belzunces L (2004b) Metabolism of imidacloprid in *Apis mellifera*. *Pest Management Science* **60**(3), 291-296.
- Suchail S, Guez D, Belzunces L (2001) Discrepancy between acute and chronic toxicity induced by imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera*. *Environmental toxicology and chemistry* **20**, 2482-6.
- Suchail S, Guez D, Belzunces LP (2000) Characteristics of imidacloprid toxicity in two *Apis mellifera* subspecies. *Environmental Toxicology and Chemistry* **19**(7), 1901-1905.
- Sumpter DJT, Martin SJ (2004) The dynamics of virus epidemics in *Varroa*-infested honey bee colonies. *Journal of Animal Ecology* **73**(1), 51-63.
- Suwannapong G, Maksong S, Seanbualuang P, Benbow ME (2010) Experimental infection of red dwarf honeybee, *Apis florea*, with *Nosema ceranae*. *Journal of Asia-Pacific Entomology* **13**(4), 361-364.
- Sylvester H, Watts R, De Guzman L, Stelzer J, Rinderer T (1999) *Varroa* in the mating yard: II. The effects of *Varroa* and fluvalinate on drone mating competitiveness. *Am. Bee J.* **139**, 225-227.
- Tan K, Hu Z, Chen W, Wang Z, Wang Y, Nieh JC (2013) Fearful Foragers: Honey Bees Tune Colony and Individual Foraging to Multi-Predator Presence and Food Quality. *PLoS ONE* **8**(9), e75841.
- Tarpy D (2003) Genetic diversity within honeybee colonies prevents severe infections and promotes colony growth. *Proceedings of the Royal Society of London Series B - Biological Sciences* **270**, 99-103.
- Tarpy D, Seeley T (2006) Lower disease infections in honeybee (*Apis mellifera*) colonies headed by polyandrous vs monandrous queens. *Naturwissenschaften* **93**(4), 195-9.
- Tarpy D, vanEngelsdorp D, Pettis J (2013) Genetic diversity affects colony survivorship in commercial honey bee colonies. *Naturwissenschaften* **100**(8), 723-728.
- Tasei J (2002) Impact of agrochemicals on non-*Apis* bees. In 'Honey Bees: Estimating the Environmental Impact of Chemicals.' Ed. E J. Devillers and M.H. Pham-Delègue) pp. 101-131. (Taylor and Francis, London)
- Teeters BS, Johnson RM, Ellis MD, Siegfried BD (2012) Using video-tracking to assess sublethal effects of pesticides on honey bees (*Apis mellifera* L.). *Environmental Toxicology and Chemistry* **31**(6), 1349-1354.
- Tentcheva D, Gauthier L, Zappulla N, Dainat B, Cousserans F, Colin ME, Bergoin M (2004) Prevalence and seasonal variations of six bee viruses in *Apis mellifera* L. and *Varroa destructor* mite populations in France. *Applied and environmental microbiology* **70**(12), 7185-91.
- The Agrochemicals Handbook Third Edition (1994) Royal Society of Chemistry Information Systems. Unwin Brothers Ltd. Surrey, England.
- Theantana T, Chantawannakul P (2008) Protease and  $\beta$ -N-acetylglucosaminidase of honey bee chalkbrood pathogen *Ascosphaera apis*. *Journal of Apicultural Research* **47**(1), 68-76.

- Thenius R, Schmickl T, Crailsheim K (2005) The “dance or work” problem: why do not all honeybees dance with maximum intensity. In 'CEEMAS 2005.' Ed. PP Pechoucek M, L.Z. Varga LZ ) pp. 246–255. (Springer, Berlin,LNAI )
- Thompson H, Wilkins S, Battersby A, Waite R, Wilkinson D (2005) The Effects of Four Insect Growth-Regulating (IGR) Insecticides on Honeybee (*Apis mellifera* L.) Colony Development, Queen Rearing and Drone Sperm Production. *Ecotoxicology* **14**(7), 757-769.
- Thompson HM (2012) Interaction between pesticides and other factors in effects on bees. Supporting. Publications 2012:EN-340. [204 pp.]. Available online: [www.efsa.europa.eu/publications](http://www.efsa.europa.eu/publications).
- Thompson HM, Wilkins S, Battersby AH, Waite RJ, Wilkinson D (2007) Modelling long-term effects of IGRs on honey bee colonies. *Pest Management Science* **63**(11), 1081-1084.
- Thomson W (1983) 'Agricultural Chemicals Book I Insecticides.' (Thomson Publications. Fresno, CA)
- Thuiller W, Lavorel S, Araujo MB, Sykes MT, Prentice IC (2005) Climate change threats to plant diversity in Europe. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**(23), 8245-8250. [In English]
- Tian Y, Zhang Y, Wu K, Zhao K, Peng Y, Guo Y (2006) Effects of transgenic Bt- cry1Ab corn pollen on the growth, development and enzymes activity in *Apis mellifera* (L.) (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Agricultural Biotechnology* **14**(6), 990-991.
- Todd J, H., De Miranda J, R., Ball B, V. (2007) Incidence and molecular characterization of viruses found in dying New Zealand honey bee (*Apis mellifera*) colonies infested with *Varroa destructor*. *Apidologie* **38**(4), 354-367.
- Toma B, Bénet J-J, Dufour B, Eloit M, Moutou F, Sanaa M (1991) 'Glossaire d'épidémiologie animale.' (Maisons-Alfort, 365 pages)
- Toomemaa K, Martin A, Williams I (2010) The effect of different concentrations of oxalic acid in aqueous and sucrose solution on *Varroa* mites and honey bees. *Apidologie* **41**(6), 643-653.
- Toplak I, Jamnikar Ciglencéki U, Aronstein K, Gregorc A (2013) Chronic Bee Paralysis Virus and *Nosema ceranae* Experimental Co-Infection of Winter Honey Bee Workers (*Apis mellifera* L.). *Viruses* **5**(9), 2282-2297.
- Topley E, Davison S, Leat N, Benjeddou M (2005) Detection of three honeybee viruses simultaneously by a single Multiplex Reverse Transcriptase PCR. *African Journal of Biotechnology* **4**(8), 763-767.
- Topping C, Dalkvist T, Forbes V, Grimm V, Sibly R (2009) The Potential for the Use of Agent-Based Models in Ecotoxicology. In 'Ecotoxicology Modeling. Vol. 2.' Ed. J Devillers) pp. 205-235. (Springer US)
- Traver BE, Fell RD (2011) *Nosema ceranae* in drone honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of invertebrate pathology* **107**(3), 234-236.
- Traver BE, Fell RD (2012) Low natural levels of *Nosema ceranae* in *Apis mellifera* queens. *Journal of invertebrate pathology* **110**(3), 408-410.
- Underwood R, Currie R (2003) The effects of temperature and dose of formic acid on treatment efficacy against *Varroa destructor* (Acari: Varroidae), a parasite of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Exp. Appl. Acarol.* **29**, 303-313.
- Underwood RM, Currie RW (2004) Indoor winter fumigation of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) colonies infested with *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) with formic acid is a potential control alternative in northern climates. *J Econ Entomol* **97**(2), 177-86.
- USFDA (2012) FDA Approved Animal Drug Products Online Database System Drug Product Abstract (2012) NADA number: 009-252. Available: [http://www.accessdata.fda.gov/scripts/animaldrugsatfda/report\\_details.cfm?dn=009-252](http://www.accessdata.fda.gov/scripts/animaldrugsatfda/report_details.cfm?dn=009-252).



USFDA (2014) (US Food and Drug Administration). FDA Center for veterinary medicine FDA approved animal drugs products. Animal drugs @FDA. <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/animaldrugsatfda/> (accessed on 1 February 2014).

van der Sluijs JP, Amaral-Rogers V, *et al.* (2015) Conclusions of the Worldwide Integrated Assessment on the risks of neonicotinoids and fipronil to biodiversity and ecosystem functioning. *Environmental Science and Pollution Research* **22**(1), 148-154.

van der Sluijs JP, Simon-Delso N, Goulson D, Maxim L, Bonmatin J-M, Belzunces LP (2013) Neonicotinoids, bee disorders and the sustainability of pollinator services. *Current Opinion in Environmental Sustainability* **5**(3-4), 293-305.

Van der Steen J, Cornelissen B, Donders J, Blacquiere T, Van Dooremalen C (2012) How honey bees of successive age classes are distributed over a one storey, ten frames hive. *Journal of Apicultural Research* **51**(2), 174-178.

van Dooremalen C, Stam E, Gerritsen L, Cornelissen B, van der Steen J, van Langevelde F, Blacquiere T (2013) Interactive effect of reduced pollen availability and *Varroa destructor* infestation limits growth and protein content of young honey bees. *Journal of Insect Physiology* **59**(4), 487-93. [In eng]

Vandame R, Belzunces LP (1998) Joint actions of deltamethrin and azole fungicides on honey bee thermoregulation. *Neuroscience Letters* **251**(1), 57-60.

vanDooremalen C, Stam E, Gerritsen L, Cornelissen B, van der Steen J, van Langevelde F, Blacquiere T (2013) Interactive effect of reduced pollen availability and *Varroa destructor* infestation limits growth and protein content of young honey bees. *Journal of Insect Physiology* **59**(4), 487-93. [In eng]

vanEngelsdorp D, Evans JD, *et al.* (2009) Colony Collapse Disorder: A Descriptive Study. *PLoS ONE* **4**(8), e6481.

vanEngelsdorp D, Hayes J, Jr., Underwood RM, Pettis J (2008) A Survey of Honey Bee Colony Losses in the U.S., Fall 2007 to Spring 2008. *PLoS ONE* **3**(12), e4071.

vanEngelsdorp D, Lengerich E, *et al.* (2013a) Standard epidemiological methods to understand and improve *Apis mellifera* health. *Journal of Apicultural Research* **52**(1), 1-16.

vanEngelsdorp D, Meixner M (2010) A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. *Journal of Invertebrate Pathology* **103**, S80-S95.

vanEngelsdorp D, Speybroeck N, *et al.* (2010) Weighing risk factors associated with bee colony collapse disorder by classification and regression tree analysis. *J Econ Entomol* **103**, 1517-1523.

vanEngelsdorp D, Tarry DR, Lengerich EJ, Pettis JS (2013b) Idiopathic brood disease syndrome and queen events as precursors of colony mortality in migratory beekeeping operations in the eastern United States. *Preventive Veterinary Medicine* **108**(2-3), 225-233.

vanEngelsdorp D, Underwood R, Caron D, Hayes J (2007) An estimate of managed colony losses in the winter of 2006-2007 : a report commissioned by the apiary inspectors of America. *American Bee Journal* **147**(7), 599-609.

Varro (2007) The Varro Vaporizer. *HiveLights* **20**, 16.

Vasquez A, Forsgren E, Fries I, Paxton RJ, Flaberg E, Szekely L, Olofsson TC (2012) Symbionts as Major Modulators of Insect Health: Lactic Acid Bacteria and Honeybees. *Plos One* **7**(3).

Vasquez A, Olofsson TC (2009) The lactic acid bacteria involved in the production of bee pollen and bee bread. *Journal of Apicultural Research* **48**(3), 189-195. [In English]

Vavra J, Lukes J (2013) Microsporidia and 'the art of living together'. *Advances in Parasitology* **82**, 253-319.

Vidau C (2015) Exposition des colonies d'abeilles aux résidus de pesticides. 3èmes journées de la recherche apicole, 4 février 2015, Paris.

- Vidau C, Diogon M, *et al.* (2011) Exposure to sublethal doses of fipronil and thiacloprid highly increases mortality of honeybees previously infected by *Nosema ceranae*. *PLoS ONE* **6**, e21550.
- Villemant C, Barbet-Massin M, Perrard A, Muller F, Gargominy O, Jiguet F, Rome Q (2011) Predicting the invasion risk by the alien bee-hawking Yellow-legged hornet *Vespa velutina nigrithorax* across Europe and other continents with niche models. *Biological Conservation* **144**(9), 2142-2150.
- Visscher PK, Seeley TD (1982) Foraging Strategy of Honeybee Colonies in a Temperate Deciduous Forest. *Ecology* **63**(6), 1790-1801.
- Vita Europe Ltd (2009) ApiGuard <http://www.vita-europe.com/> (dernière consultation le 24 février 2014).
- Vojvodic S, Jensen AB, Markussen B, Eilenberg J, Boomsma JJ (2011) Genetic Variation in Virulence among Chalkbrood Strains Infecting Honeybees. *PLoS ONE* **6**(9), e25035.
- von der Ohe W (2003) Control of American Foulbrood by using alternatively eradication method and artificial swarms. *Apiacta*(38), 137-139.
- von Frisch K (1987) 'The dance language and orientation of bees.' (Belknap Press, Harvard University Press, Cambridge)
- Waddington K, Rothenbuhler W (1976) Behavior associated with hairless-black syndrome of adult honeybees. *Journal of Apicultural Research* **15**, 35-41.
- Wahl O, Ulm K (1983) Influence of pollen feeding and physiological condition on pesticide sensitivity of the honey bee *Apis mellifera carnica*. *Oecologia* **59**, 106-128.
- Wallner K (1999) Varroacides and their residues in bee products. *Apidologie* **30**(2-3), 235-248.
- Wallner W (2009) Sprayed and seed dressed pesticides in pollen, nectar and honey of oilseed rape. Hazards of pesticides to bees. *10th International Symposium of the ICP-Bee Protection Group. Julius-Kühn-Archiv.* (423), 152-153.
- Wang DI, Moeller FE (1970) The division of labor and queen attendance behavior of *Nosema* infected worker honeybees. *J. Econ. Entomol.* **63**, 1539-1541.
- Wang J, Kliks M, Jun S, Li Q (2010) Residues of Polybrominated Diphenyl Ethers in Honeys from Different Geographic Regions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **58**(6), 3495-3501.
- Wang R, Liu Z, Dong K, Elzen P, Pettis J, Huang Z (2002) Association of novel mutations in a sodium channel gene with fluvalinate resistance in the mite, *Varroa destructor*. *J. Apic. Res.* **41**, 17-25.
- Ward L, Waite R, Boonham N, Fisher T, Pescod K, Thompson H, Chantawannakul P, Brown M (2007) First detection of Kashmir bee virus in the UK using real-time PCR. *Apidologie* **38**(2), 181-190.
- Watmough J, Camazine S (1995) Self-Organized Thermoregulation of Honeybee Clusters. *Journal of Theoretical Biology* **176**(3), 391-402.
- Webster T (1994) Fumagillin Affects *Nosema-Apis* and Honey-Bees (Hymenoptera: Apidae). *J Econ Entomol* **87**, 601-604.
- Weinstein-Teixeira E, Chen Y, Message D, Pettis J, Evans JD (2008) Virus infections in Brazilian honey bees. *Journal of invertebrate pathology* **99**(1), 117-119.
- Welch A, Drummond F, Tewari S, Averill A, Burand J (2009) Presence and Prevalence of Viruses in Local and Migratory Honeybees (*Apis mellifera*) in Massachusetts. *Applied and environmental microbiology* **75**(24), 7862-7865.
- Wenning C (2001) Autumn hive depopulation revisited. *American Bee Journal* (141), 557-559.
- Wheeler MM, Robinson GE (2014) Diet-dependent gene expression in honey bees: honey vs. sucrose or high fructose corn syrup. *Sci Rep* **4**, 5726. [In eng]
- White GF (1917) Sacbrood. United States Department of Agriculture. Bulletin n° 341.

- Whitfield CW, Behura SK, *et al.* (2006) Thrice out of Africa: ancient and recent expansions of the honey bee, *Apis mellifera*. *Science* **314**, 642-645.
- Whittington R, Winston M, Melathopoulos A, Higo H (2000) Evaluation of the botanical oils neem, thymol, and canola sprayed to control *Varroa jacobsoni* Oud. (Acari: Varroidae) and *Acarapis woodi* (Acari: Tarsonemidae) in colonies of honey bees (*Apis mellifera* L., Hymenoptera: Apidae). *Am. Bee J.* **140**, 565-572.
- Williams G, Shutler D, Little C, Burgher-MacLellan K, Rogers R (2011) The microsporidian *Nosema ceranae*, the antibiotic Fumagilin-B (R), and western honey bee (*Apis mellifera*) colony strength. *Apidologie* **42**, 15-22.
- Williams GR, Rogers RE, Kalkstein AL, Taylor BA, Shutler D, Ostiguy N (2009) Deformed wing virus in western honey bees (*Apis mellifera*) from Atlantic Canada and the first description of an overtly-infected emerging queen. *Journal of Invertebrate Pathology* **101**(1), 77-9.
- Williams GR, Sampson MA, Shutler D, Rogers REL (2008) Does fumagillin control the recently detected invasive parasite *Nosema ceranae* in western honey bees (*Apis mellifera*)? *Journal of invertebrate pathology* **99**(3), 342-344.
- Williamson SM, Wright GA (2013) Exposure to multiple cholinergic pesticides impairs olfactory learning and memory in honeybees. *The Journal of Experimental Biology* **216** 1799-1807.
- Wilmart O, Reybroeck W, De Meulenaer B, De Graff D, Nguyen B, Huyghebaert A, Saegerman C (2011) Analyse du risque posé en santé animale par la présence de l'hydroxyméthylfurfural dans les sirops de nourrissage des abeilles domestiques. *Annales de Médecine Vétérinaire* **155**, 53-60.
- Wilson-Rich N, Dres ST, Starks PT (2008) The ontogeny of immunity: development of innate immune strength in the honey bee (*Apis mellifera*). *Journal of Insect Physiology* **54**(10-11), 1392-9. [In eng]
- Wilson-Rich N, Spivak M, Fefferman NH, Starks PT (2009) Genetic, individual, and group facilitation of disease resistance in insect societies. *Annu Rev Entomol* **54**, 405-423.
- Wilson WR (1962) Control of European foulbrood using two erythromycin formulations and yearly disease recurrence. *Am. Bee J.* **102**, 33-34.
- Wilson WT, Moffett JO (1957) The Effect of Erythromycin and Other Antibiotics on the Control of European Foulbrood of Honeybees. *Journal of Economic Entomology* **50**(2), 194-196.
- Wilson WT, Pettis JS, Henderson CE, Morse RA (1997) Tracheal Mites. In: *Honey Bee Pests, Predators, and Diseases*. (Eds. R.A. Morse and K. Flottum), Third ed. A.I.Root Co., Medina, OH. p. 253-278.
- Winston ML (1987) 'The biology of the honey bee.' (Harvard University Press, Cambridge) 294 p
- Wu JY, Smart MD, Anelli CM, Sheppard WS (2012) Honey bees (*Apis mellifera*) reared in brood combs containing high levels of pesticide residues exhibit increased susceptibility to *Nosema* (Microsporidia) infection. *Journal of invertebrate pathology* **109**(3), 326-329.
- Wynns AA, Jensen AB, Eilenberg J (2013) *Ascosphaera callicarpa*, a New Species of Bee-Loving Fungus, with a Key to the Genus for Europe. *PLoS ONE* **8**(9), e73419.
- Xu J, James R (2012) Temperature stress affects the expression of immune response genes in the alfalfa leafcutting bee, *Megachile rotundata*. *Insect Molecular Biology* **21**(2), 269-280.
- Xu J, Strange J, Welker D, James R (2013) Detoxification and stress response genes expressed in a western North American bumble bee, *Bombus huntii* (Hymenoptera: Apidae). *BMC Genomics* **14**(1), 874.
- Yañez O, Jaffé R, Jarosch A, Fries I, Moritz RA, Paxton R, de Miranda J (2012) Deformed wing virus and drone mating flights in the honey bee (*Apis mellifera*): implications for sexual transmission of a major honey bee virus. *Apidologie* **43**(1), 17-30.

- Yang E-C, Chang H-C, Wu W-Y, Chen Y-W (2012) Impaired Olfactory Associative Behavior of Honeybee Workers Due to Contamination of Imidacloprid in the Larval Stage. *PLoS ONE* **7**(11), e49472.
- Yang E, Wu P, Chang H, Chen Y Effect of sub-lethal dosages of insecticides on honeybee behavior and physiology. In 'Proceedings of International Seminar on Enhancement of Functional Biodiversity Relevant to Sustainable Food Production in ASPAC, November 9-11, 2010', 2010, Tsukuba, Japan (<http://www.niaes.affrc.go.jp/sinfo/sympo/h22/1109/>, Accessed on January 3, 2013),
- Yang EC, Chuang YC, Chen YL, Chang LH (2008) Abnormal Foraging Behavior Induced by Sublethal Dosage of Imidacloprid in the Honey Bee (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Economic Entomology* **101**(6), 1743-1748.
- Yang X, Cox-Foster D (2007) Effects of parasitization by *Varroa destructor* on survivorship and physiological traits of *Apis mellifera* in correlation with viral incidence and microbial challenge. *Parasitology* **134**(03), 405-412.
- Yang X, Cox-Foster DL (2005) Impact of an ectoparasite on the immunity and pathology of an invertebrate: evidence for host immunosuppression and viral amplification. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(21), 7470-5.
- Yoo M-S, Thi KCN, Van Nguyen P, Han S-H, Kwon S-H, Yoon B-S (2012) Rapid detection of sacbrood virus in honeybee using ultra-rapid real-time polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods* **179**(1), 195-200.
- Yoshiyama M, Kimura K, Saitoh K, Iwata H (2011) Measuring colony development in honey bees by simple digital analysis. *Journal of Apicultural Research* **50**, 170-172.
- Yue C, Genersch E (2005) RT-PCR analysis of Deformed wing virus in honeybees (*Apis mellifera*) and mites (*Varroa destructor*). *Journal of General Virology* **86**(12), 3419-3424.
- Yue C, Schroder M, Bienefeld K, Genersch E (2006) Detection of viral sequences in semen of honeybees (*Apis mellifera*): evidence for vertical transmission of viruses through drones. *Journal of Invertebrate Pathology* **92**(2), 105-8.
- Yue C, Schroder M, Gisder S, Genersch E (2007) Vertical-transmission routes for deformed wing virus of honeybees (*Apis mellifera*). *J Gen Virol* **88**(Pt 8), 2329-36.
- Yue D, Nordhoff M, Wieler L, Genersch E (2008) Fluorescence in situ hybridization (FISH) analysis of the interactions between honeybee larvae and *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood of honeybees (*Apis mellifera*). *Environmental microbiology* **10**(6), 1612-1620.
- Zander E (1909) Tierische Parasiten als Krankheitserreger bei der Biene. *Münchener Bienenzeitung* **31**, 196-204.
- Zayed A, Whitfield CW (2008) A genome-wide signature of positive selection in ancient and recent invasive expansions of the honey bee *Apis mellifera*. *Proceedings of National Academic of Science, USA* **105**, 3421-3426.
- Zhang Q, Ongus J, Boot W, Calis J, Bonmatin J, Bengsch E, Peters D (2007) Detection and localisation of picorna-like virus particles in tissues of *Varroa destructor*, an ectoparasite of the honey bee, *Apis mellifera*. *Journal of invertebrate pathology* **96**(2), 97-105.
- Zhang SW, Bartsch K, Srinivasan MV (1996) Maze Learning by Honeybees. *Neurobiology of Learning and Memory* **66**(3), 267-282.
- Zhang Y, Liu X, Zhang W, Han R (2010) Differential gene expression of the honey bees *Apis mellifera* and *A. cerana* induced by *Varroa destructor* infection. *J Insect Physiol* **56**(9), 1207-18.
- Zhou J, Shen J, Xue X, Zhao J, Li Y, Zhang J, Zhang S (2007) Simultaneous Determination of Nitroimidazole Residues in Honey Samples by High-Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet Detection. *Journal of AOAC International* **90**(3), 872-878.

Zhu W, Schmehl D, Mullin C, Frazier J (2014) Four Common Pesticides, Their Mixtures and a Formulation Solvent in the Hive Environment Have High Oral Toxicity to Honey Bee Larvae. *PLoS ONE* **9**(1), e77547.

Zirbes L, Nguyen B, de Graaf D, De Meulenaer B, Reybroeck W, Haubruge E, Saegerman C (2013) Hydroxymethylfurfural: A Possible Emergent Cause of Honey Bee Mortality? *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **61**(49), 11865-11870.

## 7.2 Normes

NF X 50-110 (mai 2003) Qualité en expertise – Prescriptions générales de compétence pour une expertise. AFNOR (indice de classement X 50-110).

## 7.3 Législation et réglementation

Arrêté du 7 avril 2010 relatif à l'utilisation des mélanges extemporanés de produits visés à l'article L. 253-1 du Code rural

Arrêté du 28 novembre 2003 relatif aux conditions d'utilisation des insecticides et acaricides à usage agricole en vue de protéger les abeilles et autres insectes pollinisateurs

Arrêté du 22 janvier 2013 interdisant sur le territoire national l'introduction de spécimens du frelon à pattes jaunes *Vespa velutina*

Arrêté ministériel du 29 juillet 2013 relatif à la définition des dangers sanitaires de première et deuxième catégorie pour les espèces animales

Communication de la Commission dans le cadre de la mise en oeuvre du règlement (UE) n° 283/2013 de la Commission du 1<sup>er</sup> mars 2013 établissant les exigences en matière de données applicables aux substances actives, conformément au règlement (CE) n° 1107/2009 du Parlement européen et du Conseil concernant la mise sur le marché des produits phytopharmaceutiques

Communication de la Commission dans le cadre de la mise en oeuvre du règlement (UE) n° 284/2013 de la Commission du 1<sup>er</sup> mars 2013 établissant les exigences en matière de données applicables aux produits phytopharmaceutiques, conformément au règlement (CE) n° 1107/2009 du Parlement européen et du Conseil concernant la mise sur le marché des produits phytopharmaceutiques

Décret n° 2003-587 du 30 juin 2003 pris pour l'application de l'article L. 214-1 du Code de la consommation en ce qui concerne le miel

Directive 91/414/CEE du Conseil du 15 juillet 1991 concernant la mise sur le marché des produits phytopharmaceutiques

Note de service DGAL/SDSPA/N2002-8045 du 18 mars 2002 relative aux médicaments vétérinaires destinés au traitement de la varroase des abeilles

Note de service DGAL/SDSPA/N2004-8136 du 12 mai 2004 relative aux médicaments vétérinaires destinés au traitement de la varroase des abeilles

Note de service DGAL/SDSPA/SDQPV/N2012-8113 du 6 juin 2012 relative à la surveillance annuelle des troubles des abeilles

Note de service DGAL/SDSPA/2015-134 du 13 février 2015 relative aux conditions d'exercice de certains actes de médecine vétérinaire par les techniciens sanitaires apicoles

Règlement (UE) n° 2377/90 du 26 juin 1990 établissant une procédure communautaire pour la fixation des limites maximales de résidus de médicaments vétérinaires dans les aliments d'origine animale. JO, L224, 1990, 1-8

Règlement (CE) n° 1107/2009 du Parlement européen et du Conseil du 21 octobre 2009 concernant la mise sur le marché des produits phytopharmaceutiques et abrogeant les directives 79/117/CEE et 91/414/CEE du Conseil

Règlement (UE) n° 37/2010 de la Commission du 22 décembre 2009 relatif aux substances pharmacologiquement actives et à leur classification en ce qui concerne les limites maximales de résidus dans les aliments d'origine animale. JO, 2010, 1-72

Règlement (UE) n° 206/2010 de la Commission du 12 mars 2010 établissant des listes des pays tiers, territoires ou parties de pays tiers ou territoires en provenance desquels l'introduction dans l'Union européenne de certains animaux et viandes fraîches est autorisée, et définissant les exigences applicables en matière de certification vétérinaire

Règlement (UE) n° 546/2011 de la Commission du 10 juin 2011 portant application du règlement (CE) n° 1107/2009 du Parlement européen et du Conseil en ce qui concerne les principes uniformes d'évaluation et d'autorisation des produits phytopharmaceutiques

Règlement (UE) n° 283/2013 de la Commission du 1<sup>er</sup> mars 2013 établissant les exigences en matière de données applicables aux substances actives, conformément au règlement (CE) n° 1107/2009 du Parlement européen et du Conseil concernant la mise sur le marché des produits phytopharmaceutiques

Règlement (UE) n° 284/2013 de la Commission du 1<sup>er</sup> mars 2013 établissant les exigences en matière de données applicables aux produits phytopharmaceutiques, conformément au règlement (CE) n° 1107/2009 du Parlement européen et du Conseil concernant la mise sur le marché des produits phytopharmaceutiques

Règlement d'exécution (UE) n° 485/2013 de la Commission du 24 mai 2013 modifiant le règlement d'exécution (UE) n° 540/2011 en ce qui concerne les conditions d'approbation des substances actives clothianidine, thiaméthoxame et imidaclopride et interdisant l'utilisation et la vente de semences traitées avec des produits phytopharmaceutiques contenant ces substances actives

---

# ANNEXES

---

## Annexe 1 : Autosaisine



DECISION N° ANSES-2015-03-097  
MODIFIANT LA DECISION N° ANSES-2013-10-275

### AUTOSAISINE

Le directeur général de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses),

Vu le code de la santé publique, et notamment son article L. 1313-3 conférant à l'Anses la prérogative de se saisir de toute question en vue de l'accomplissement de ses missions,

**Décide :**

**Article 1<sup>er</sup>.**- L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail se saisit afin de réaliser une expertise dont les caractéristiques sont listées ci-dessous.

#### 1.1 Thématiques de l'expertise

- Co-expositions (expositions concomitantes ou successives) des abeilles et des colonies d'abeilles à différents facteurs de stress. L'accent sera mis sur les co-expositions aux agents infectieux et aux facteurs toxiques à des doses sublétales ;
- Mécanismes d'action et rôles (respectifs et conjoints) de ces facteurs dans les phénomènes d'affaiblissement, d'effondrement et de mortalité des colonies d'abeilles.

#### 1.2 Contexte de l'autosaisine

Les phénomènes d'affaiblissement, d'effondrement et de mortalité des colonies d'abeilles ont fait l'objet, au cours des trois dernières années, de plusieurs études visant à comprendre le ou les mécanismes impliqués dans ces troubles. L'Afssa a produit en 2009 un rapport qui en soulignait l'étiologie multifactorielle (facteurs infectieux, chimiques, physiques, climatiques, alimentaires, etc.). Ce rapport concluait notamment sur la nécessité d'évaluer les effets, individuels et conjoints, de l'exposition des abeilles et des colonies d'abeilles aux agents infectieux et aux produits phytopharmaceutiques, et de réaliser des recherches sur les expositions chroniques à des pesticides en présence d'infections latentes, récurrentes, par différents agents pathogènes susceptibles de se potentialiser entre eux. L'Anses a émis en 2012, trois avis portant sur des publications scientifiques (Vidau *et al.*, 2011<sup>1</sup> ; Henry *et al.*, 2012<sup>2</sup>) qui ont rapporté les effets sur les abeilles et/ou les colonies d'abeilles, de doses sublétales de pesticides. L'EFSA a publié, en mai 2012, une « déclaration sur les résultats d'études récentes examinant les effets sublétaux de certains néonicotinoïdes sur les abeilles<sup>3</sup> ». Elle poursuit ce travail par une étude des effets aigus et chroniques de cinq néonicotinoïdes sur la survie et le développement des colonies d'abeilles, étude qui prendra en compte les effets sur les larves et sur le comportement des abeilles.

<sup>1</sup> Vidau C, Diogon M, Aufaivre J, Fontbonne R, Viguès B, Brunet JL, Texier C, Giron DG, Blot N, El Alaoui H, Belzunces LP, Delbac F (2011) Exposure to sublethal doses of fipronil and thiacloprid highly increases mortality of honeybees previously infected by *Nosema ceranae*. Plos One, 6(6), e21550

<sup>2</sup> Henry M, Beguin M, Requier F, Rollin O, Odoux JF, Aupinel P, Aptel J, Tchamitchian S, Decourtye A (2012) A common pesticide decreases foraging success and survival in honeybees. Science 336, 348-350

<sup>3</sup> EFSA (2012) Statement on the findings in recent studies investigating sub-lethal effects in bees of some neonicotinoids in consideration of the uses currently authorized in Europe. EFSA Journal 2012, 10(6):2752.



Dans ce contexte, et compte tenu du travail en cours de l'EFSA sur les effets chroniques de néonicotinoïdes, l'Anses va constituer un groupe de travail chargé d'étudier les co-expositions (expositions concomitantes ou successives) des abeilles et des colonies d'abeilles à différents facteurs de stress, les mécanismes d'action de ces facteurs et leurs rôles respectifs dans les phénomènes de mortalité des colonies d'abeilles. L'accent sera mis sur les interactions entre agents infectieux et parasitaires, d'une part, et facteurs toxiques à des doses sublétales, d'autre part. Les autres facteurs, intrinsèques (génétiques) ou extrinsèques (pratiques apicoles, facteurs environnementaux) seront pris en considération dans leur capacité à moduler ces interactions et leurs effets. En raison du nombre d'individus constituant les colonies, du caractère très structuré de ces dernières, impliquant une spécialisation des individus par fonction, il conviendra de distinguer les effets sur l'individu abeille (à l'échelle moléculaire, cellulaire, tissulaire, de l'organisme entier) des conséquences à l'échelle des colonies.

### 1.3 Questions sur lesquelles portent les travaux d'expertise à mener

Les objectifs du Groupe de travail (GT) sont les suivants :

- (1) mieux comprendre le rôle des agents pathogènes et autres facteurs de stress dans les phénomènes de mortalité et d'effondrement des colonies, en particulier :
  - les co-expositions des abeilles à des agents pathogènes et à des substances chimiques à des doses sublétales,
  - la compréhension des mécanismes d'action (effets additifs, synergiques, potentialisation),
  - le rôle modulateur d'autres facteurs de stress (facteurs génétiques ; facteurs nutritionnels, climatiques, champs électromagnétiques, etc.) sur ces effets individuels ou conjoints,et déterminer, dans la mesure du possible, la part respective de ces facteurs et de leurs interactions en tenant compte également de l'influence des pratiques apicoles ;
- (2) déterminer si l'élaboration de méthodes prenant en compte, dans l'évaluation des produits phytopharmaceutiques, les interactions éventuelles entre agents infectieux et facteurs toxiques serait pertinente et réalisable, notamment de manière standardisée. Le cas échéant, de telles méthodes pourraient être proposées par le GT.
- (3) émettre des recommandations en termes de pratiques apicoles et agricoles, ainsi que des recommandations de recherche.

Les travaux d'expertise comprendront :

- (1) une mise à jour de l'état des lieux sanitaire en filière apicole en France
- (2) une revue des études portant sur les interactions entre différents facteurs de stress :
  - (a) recensement, objectivation des facteurs de stress ;
  - (b) méthodes de mise en évidence des interactions :
    - au niveau individuel et à l'échelle des colonies ;
    - en situation expérimentale, semi-naturelle, ou naturelle ;
  - (c) interactions entre différents agents pathogènes (infectieux, parasitaires) ;
  - (d) interactions entre agents pathogènes et pesticides utilisés en pratiques apicole et agricole ;
  - (e) autres facteurs susceptibles de moduler soit l'exposition à des agents infectieux ou toxiques, soit leurs effets.

Cette revue devra tenir compte de la diversité des conditions d'exposition des abeilles aux facteurs de stress dans les différentes études réalisées (ex : cages de vol, sous tunnel, plein champ), plus ou moins comparables entre elles et plus ou moins proches des conditions naturelles ;

- (3) une revue des mécanismes possiblement mis en jeu ;
- (4) des propositions et recommandations :
  - sur des mesures visant à adapter les pratiques agricoles et apicoles pour réduire l'occurrence et les effets de co-expositions préjudiciables aux abeilles et aux colonies d'abeilles ;
  - de recherche pour améliorer la compréhension des interactions entre facteurs impliqués dans les phénomènes de mortalité des colonies d'abeilles.

#### 1.4 Durée prévisionnelle de l'expertise

Le délai pour la production du rapport est reporté à mai 2015, compte tenu du temps nécessaire pour la finalisation après le traitement des données relatives à l'état des lieux du cheptel apicole français et aux co-expositions des abeilles aux facteurs de stress, achevé en décembre 2014.

**Article 2-** Un avis sera émis et publié par l'Agence à l'issue des travaux.

Fait à Maisons-Alfort, le **15 AVR. 2015**



Marc MORTUREUX  
Directeur général

## Annexe 2 : substances détectées dans l'étude CETIOM/ITSAP

Tableau 16 Détail des 30 substances détectées dans le pollen de 4 ruchers à différentes dates (étude CETIOM/ITSAP)

Site	A										B				C			D									
	2012					2013					2012		2013		2013			2012					2013				
	13-avr	19-avr	24-avr	05-mai	03-mai	11-mai	14-mai	18-mai	27-mai	16-mai	03-mai	16-mai	01-juin	03-mai	14-mai	23-mai	30-avr	07-mai	12-mai	24-mai	29-mai	27-mai	03-juin	04-juin	10-juin		
azaconazole	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
azoxystrobine	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0		
boscalide	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0		
chlorothalonil	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0		
chlorpyrifos.éthyl	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0		
cyhalothrin_lambda	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0		
cymoxanil	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
cyproconazole	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1		
cyprodinyl	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0		
deltaméthrine	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0		
diméthanamide	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
diphénylamine	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
fenpropidine	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0		
fluazifop.P	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
flurochloridon	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
flutolanil	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
metconazole	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0		
metholachlor_metholachlore.S	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
nicosulfuron	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0		
pencycuron	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		

pendiméthaline	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
phenmédiaphame	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
prosulficarbe	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
prothioconazole_ desthio.metab	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
pyrazophos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
tau-fluvalinate	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
tebuconazole	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
imidaclopride	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	NA	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	NA	NA	NA	NA	
thiaclopride	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	NA	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	NA	NA	NA
thiamethoxam	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	NA	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	NA	NA	NA
nombre substances	5	4	4	3	3	1	0	1	1	1	5	14	7	4	15	13	8	6	5	8	5	2	5	5	3	1	1	1	1	1	