Diversité des agents pathogènes de l'abeille dans le Sud-Ouest de l'Océan Indien dans un contexte d'invasion récente de Varroa destructor et mortalités associées

Olivier Esnault

▶ **To cite this version:**

Olivier Esnault. Diversité des agents pathogènes de l'abeille dans le Sud-Ouest de l'Océan Indien dans un contexte d'invasion récente de Varroa destructor et mortalités associées. Sciences agricoles. Université de la Réunion, 2018. Français. NNT : 2018LARE0044 . tel-02307585

HAL Id: tel-02307585
https://theses.hal.science/tel-02307585

Submitted on 7 Oct 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ DE LA RÉUNION

Ecole Doctorale Sciences, Technologies et Santé

UMR PVBMT Peuplement Végétaux et Bioagresseurs en Milieu Tropical
CIRAD – Université de La Réunion

THESE

Présentée à l'Université de La Réunion pour obtenir le
DIPLOME DE DOCTORAT EN SCIENCES
Discipline : Biologie animale

Diversité des agents pathogènes de l'abeille dans le Sud-Ouest de l'Océan Indien dans un contexte d'invasion récente de *Varroa destructor* et mortalités associées

Par

Olivier ESNAULT

Soutenue le 13 décembre 2018 en Amphi 120D, sur le Campus du Tampon de l'Université de la Réunion, devant le jury suivant :

Bernard Reynaud, Professeur, Université de La Réunion	**Président du Jury**
Pascal Hendrickx, Vétérinaire, Directeur de Recherche, ANSES, Lyon	**Rapporteur**
Nicolas Blot, Maître de conférences, HDR, Université Clermont-Ferrand	**Rapporteur**
Fanny Mondet, Dr. Ingénieur de recherche, INRA, Avignon	**Examinatrice**
Monique L'Hostis, Vétérinaire, Professeur Ecole vétérinaire de Nantes	**Examinatrice**
Hélène Delatte, Chercheur, HDR, CIRAD, La Réunion	**Directrice de thèse**
Encadrement de thèse	
Marie-Pierre Chauzat, Chercheur, HDR, ANSES, Maisons Alfort	**Encadrante de thèse**

UNIVERSITÉ DE LA RÉUNION

Pôle Recherche
Ecoles doctorales

LETTRE D'ENGAGEMENT DE NON-PLAGIAT

Je, soussigné Olivier Esnault en ma qualité de doctorant de l'Université de La Réunion, déclare être conscient que le plagiat est un acte délictueux passible de sanctions disciplinaires. Aussi, dans le respect de la propriété intellectuelle et du droit d'auteur, je m'engage à systématiquement citer mes sources, quelle qu'en soit la forme (textes, images, audiovisuel, internet), dans le cadre de la rédaction de ma thèse et de toute autre production scientifique, sachant que l'établissement est susceptible de soumettre le texte de ma thèse à un logiciel anti-plagiat.

Fait à Saint-Denis le : 14/11/2018

Signature :

Extrait du Règlement intérieur de l'Université de La Réunion
(validé par le Conseil d'Administration en date du 11 décembre 2014)

Article 9. Protection de la propriété intellectuelle – Faux et usage de faux, contrefaçon, plagiat

L'utilisation des ressources informatiques de l'Université implique le respect de ses droits de propriété intellectuelle ainsi que ceux de ses partenaires et plus généralement, de tous tiers titulaires de tes droits.
En conséquence, chaque utilisateur doit :
- utiliser les logiciels dans les conditions de licences souscrites ;
- ne pas reproduire, copier, diffuser, modifier ou utiliser des logiciels, bases de données, pages Web, textes, images, photographies ou autres créations protégées par le droit d'auteur ou un droit privatif, sans avoir obtenu préalablement l'autorisation des titulaires de ces droits.

La contrefaçon et le faux
Conformément aux dispositions du code de la propriété intellectuelle, toute représentation ou reproduction intégrale ou partielle d'une œuvre de l'esprit faite ans le consentement de son auteur est illicite et constitue un délit pénal.
L'article 444-1 du code pénal dispose : « Constitue un faux toute altération frauduleuse de la vérité, de nature à cause un préjudice et accomplie par quelque moyen que ce soit, dans un écrit ou tout autre support d'expression de la pensée qui a pour objet ou qui peut avoir pour effet d'établir la preuve d'un droit ou d'un fait ayant des conséquences juridiques ».
L'article L335_3 du code de la propriété intellectuelle précise que : « Est également un délit de contrefaçon toute reproduction, représentation ou diffusion, par quelque moyen que ce soit, d'une œuvre de l'esprit en violation des droits de l'auteur, tels qu'ils sont définis et réglementés par la loi. Est également un délit de contrefaçon la violation de l'un des droits de l'auteur d'un logiciel (…) ».

Le plagiat est constitué par la copie, totale ou partielle d'un travail réalisé par autrui, lorsque la source empruntée n'est pas citée, quel que soit le moyen utilisé. Le plagiat constitue une violation du droit d'auteur (au sens des articles L 335-2 et L 335-3 du code de la propriété intellectuelle). Il peut être assimilé à un délit de contrefaçon. C'est aussi une faute disciplinaire, susceptible d'entraîner une sanction.
Les sources et les références utilisées dans le cadre des travaux (préparations, devoirs, mémoires, thèses, rapports de stage…) doivent être clairement citées. Des citations intégrales peuvent figurer dans les documents rendus, si elles sont assorties de leur référence (nom d'auteur, publication, date, éditeur…) et identifiées comme telles par des guillemets ou des italiques.

Les délits de contrefaçon, de plagiat et d'usage de faux peuvent donner lieu à une sanction disciplinaire indépendante de la mise en œuvre de poursuites pénales.

A Hélène,

A Loïc et Margot ;

A mes parents ;

A ma famille ;

A mon chien, à mes chats, à mes poissons ;

Et à mes abeilles, ce qu'il en reste.

« *Je crois au moment. S'il n'y a pas le moment, à ce moment-là,*

il faut arriver à ce moment-là, au moment qu'on veut »

Jean-Claude Van Damme, acteur.

« *Inconsciemment, il ne faut pas s'endormir* ».

Franck Ribéry, joueur de football.

Remerciements

Vétérinaire épidémiologiste de formation j'ai profité de ces quelques années passées au pôle de protection des plantes au sein de l'UMR PVBMT pour découvrir ce petit monde des plantes, des légumes et des agros (parfois synonyme). L'abeille fait très bien cette jonction trop négligée entre santé animale, santé végétale et impacts écosystémiques (la fameuse approche One Health). J'ai passé 5 années formidables au sein du 3P. Et ce qui est bien, c'est que ça ne va pas s'arrêter là !

En premier lieu je voudrais remercier mes deux co-encadrantes de thèse. Marie-Pierre Chauzat tout d'abord qui a assuré à distance et qui a été précieuse dans la relecture des articles et m'a fait profiter de sa grande connaissance bibliographique. Enfin au quotidien, ce ne sont plus des remerciements que mérite Hélène Delatte mais une statue en or massif qui doit être érigée à sa gloire pour sa gentillesse, sa bienveillance, sa présence dans les moments parfois difficiles, sa résilience et sa disponibilité dont elle a su faire preuve avec moi et pour le suivi décousu que je lui ai imposé (entre autres).

Je souhaite ensuite remercier Nicolas Blot et Pascal Hendricks d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail. Je voulais aussi particulièrement remercier Fanny Mondet et Monique L'Hostis de faire partie du jury. C'est un honneur pour moi de les avoir dans mon jury puisque quand j'étais tout jeune initié de l'abeille et de ses maladies, j'ai pu assister à la présentation magistrale de Fanny sur l'invasion de varroa en Nouvelle-Zélande et ses conséquences sur les virus au congrès EURBEE 6. J'avais trouvé cette présentation formidable et malheureusement, quelques années après, elle a résonné tristement quand varroa a été détecté à La Réunion. Quant à Monique, le dévouement sacerdotal mis au service de la profession vétérinaire pour accompagner la filière apicole est admirable et ne peut-être que salué à sa juste valeur. Enfin et là c'est personnel, mais merci Monique de m'avoir remis les pieds sur terre quand vous êtes venue en mission à La Réunion. Sans vous, je serais encore à battre la campagne pour convaincre les apiculteurs de la gravité de la situation sanitaire. Merci de m'avoir dit que ma part de travail était accomplie et que désormais la balle était dans le camp des apis. Finalement je vous ai écouté et cette thèse a pu voir le jour.

Je voulais remercier Bernard Reynaud, directeur du 3P et directeur de l'UMR PVBMT pour l'accueil et cette opportunité mais aussi pour accepter d'être le président du jury.

Cette thèse s'est déroulée dans le cadre de mes activités professionnelles et je voulais remercier Jérôme Huet, président du GDS Réunion et son conseil d'administration d'avoir pu me donner cette opportunité et ainsi de valoriser les interactions entre la recherche, le développement et le conseil.

Cette thèse n'aurait pas pu se réaliser sans le concours de l'équipe technique apicole du GDS Réunion. Sont forcément associés à ce travail Bernard Xavier, Jérémy Hascoat, Alexandre Dorseuil, Angélique Dupuy, Abalhassani Saïd et Nicolas Cazanove. Spéciale dédicace aussi à la team CIRAD : Christophe Simiand, Gérard Lebreton et Antoine Franck.

Le soutien de la filière apicole réunionnaise a été important dans la réalisation de cette thèse. Ce travail est dédié à l'ensemble de la filière et à tous les apiculteurs réunionnais sans exception. Je voulais remercier de la manière la plus chaleureuse François Payet, président du Syndicat Apicole de La Réunion, Camille Perrault, président de la COOPEMIEL ainsi que les présidents de l'Association pour le Développement de l'Apiculture de La Réunion que j'ai pu côtoyer, Pascal Faustin et Jean-François Vauldin. Et sans Henri Bègue de la Chambre d'Agriculture, la filière ne serait pas la même.

Je voulais remercier tous ceux qui m'ont permis de m'éclipser de mes tâches professionnelles habituelles pour la phase de rédaction. Ces remerciements s'adressent particulièrement à Didier Guilhen, directeur technique du GDS Réunion, Pascale Achard, animatrice RITA, Mathilde Heurtault et Jean-Marc Thévenin animateurs nationaux du RITA et des projets inter-DOM.

Je tenais à saluer intégralement toute l'équipe de dalons du GDS. Il y a un peu de vous dans chacune de ces pages. Merci à tous ! Yannick, c'est toi le prochain !

A travers ces mots de remerciements, je voulais adresser mes pensées les plus affectueuses à ceux qui m'ont « donné le goût de la chose » à savoir Jérémy Bouyer et Thierry Baldet.

Je remercie l'équipe de la CIRAD pour tous ces bons moments et particulièrement sa machine à café increvable, lieu de rendez-vous des poètes.

Je profite de cette tribune pour saluer les travaux formidables du « club of english » et particulièrement Ibrahima Traoré avec qui nous assurons une co-présidence harmonieuse depuis 2007. Nous rappelons aux membres que nous œuvrons pour la paix mondiale et que nous sommes « co-présis » à vie. Nous n'hésiterons d'ailleurs même pas à modifier les statuts de notre règlement intérieur pour rester co-présis à vie, même après notre mort. C'est pourquoi les risibles tentatives de déstabilisation des sankaristes putschistes que sont Raphaëlle Métras et Mamadou « Joe Kokker » Coulibaly ne nous affectent même pas.

J’en profite pour saluer Manuel G. et William M. pour leur soutien à distance pendant la rédaction du manuscrit, leur amour inconditionnel pour le rhum, les jolies filles et les causes perdues. Par contre les gars, et ce n'est pas grave mais sachez que la palmophilie est moins fréquente dans nos sociétés mais peut-être mieux acceptée que la zoophilie ou la gérontophilie.

Rien à voir avec tout ça, mais j’en profite pour faire un énorme bisou à Maéva T. A Sohini aussi d’ailleurs.

Je m’arrête là pour les remerciements personnels, parce que nommer les gens c’est prendre le risque d’en oublier. Merci à tous d’avoir été là, puisque me supporter, quelque part c’est m’encourager.

#LaBase

#Canapute

#DesAmandesAuMiel

Résumé

L'abeille mellifère (*Apis mellifera*) est une espèce clé dans son aire d'origine tant pour les services écosystémiques rendus que pour les productions apicoles. Toutefois, ses populations sont soumises à différents facteurs de stress biotiques responsables de mortalités importantes. Dans les îles du Sud-Ouest de l'Océan Indien (SOOI) la sous-espèce d'abeille endémique est *A. m. unicolor*. Toutefois, aucune étude n'avait été réalisée sur sa pathosphère et ce n'est que depuis 2010 où l'ectoparasite *Varroa destructor* a envahi certaines de ces îles, menaçant cette sous-espèce, que de premières études ont été conduites. Dans ce travail de thèse, nous avons réalisé un état des lieux général de la santé des cheptels d'abeilles grâce à des enquêtes épidémiologiques descriptives dans la majorité des îles : La Réunion, Maurice, Rodrigues, Madagascar et les Seychelles. Nous avons pu montrer des faciès épidémiologiques assez similaires entre les îles, marqués par une dominance de *Nosema ceranae* particulièrement dans les petites îles (80-100%) et la présence de 3 virus : BQCV (4-89%), CBPV (2-51% excepté à Rodrigues) et DWV (4-40% excepté à La Réunion). D'autres agents pathogènes n'ont été retrouvés que sur certains territoires comme *Aethina tumida*, *Braula pretoriensis*, *Acarapis sp.* ou *Melissococcus plutonius*. L'analyse de la diversité génétique réalisée sur les 3 virus a montré une proximité des souches virales au sein du SOOI. Les enquêtes réalisées dans un contexte sans varroa ont montré une bonne santé des colonies avec une absence de signes cliniques. Les mortalités constatées n'ont concernées que les territoires envahis par varroa : Madagascar, Maurice, La Réunion. Varroa semble donc être le principal responsable des mortalités aiguës de colonies dans la zone bien avant les autres agents pathogènes ou les causes environnementales. Son impact sur les populations d'abeilles et *in fine* sur les écosystèmes indigènes sera à évaluer dans les années futures.

Mots-clés : *Varroa destructor*, Abeille mellifère, Sud Ouest Océan Indien, invasion, santé, mortalité, diversité, agents pathogènes de l'abeille, épidémiologie, facteurs de risque, DWV, BQCV, *Nosema ceranae*, *Braula pretoriensis*

Abstract

The honeybee (*Apis mellifera*) is a key species in its native range for both ecosystem services offerred and for bee products. However, its populations are subject to various biotic stressors responsible for significant mortalities. In the South-West Indian Ocean region the endemic bee subspecies is *A. m.unicolor*. However, no studies had been carried out on its pathosphere and it is only since 2010 where the ectoparasite Varroa destructor invaded some of these islands, threatening this subspecies, that first studies were conducted. In this thesis work, we carried out a general inventory of the health of honeybee herds through descriptive epidemiological surveys in the majority of islands: Réunion, Mauritius, Rodrigues, Madagascar and Seychelles. We were able to show quite similar epidemiological facies between islands, characterized by a dominance of *Nosema ceranae* especially in small islands (80-100%) and the presence of 3 viruses: BQCV (4-89%), CBPV (2- 51% except in Rodrigues) and DWV (4-40% except in Reunion). Other pathogens have only been found in certain territories such as Aethina tumida, Braula pretoriensis, Acarapis sp. or Melissococcus plutonius. The analysis of the genetic diversity carried out on the 3 viruses showed a proximity of viral strains within the SOOI. Surveys conducted in a context without varroa showed good colony health with no clinical signs. The observed mortalities concerned only the territories invaded by varroa: Madagascar, Mauritius, Reunion. Varroa therefore appears to be the main cause of acute colony mortality in the area long before other pathogens or environmental causes. Its impact on bee populations and ultimately on native ecosystems will be evaluated in future years.

Keywords: *Varroa destructor*, Honeybee, South West Indian Ocean, invasion, health, mortality, diversity, honeybee pathogens, epidemiology, risk factors, DWV, BQCV, *Nosema ceranae*, *Braula pretoriensis*

Table des matières

Remerciements 7
Résumé 11
Abstract 13
Table des matières 15
Liste des figures 23
Liste des tables 31
Préface 33
Bibliographie 37
1. Epidémiologie animale : les grands principes 39
1.1. Notions de base en pathologie infectieuse 39
1.2. L'épidémiologie 41
1.3. Les indicateurs épidémiologiques 43
1.3.1. Définition du critère d'identification de la maladie 43
1.3.2. Définition de la population et choix de l'unité épidémiologique 45
1.3.3. Prévalence et incidence 45
1.3.4. Les formes épidémiologiques des maladies 45
1.3.5. Les indicateurs bruts et spécifiques 47
1.3.6. L'échantillonnage et l'interprétation des données obtenues 47
1.3.7. La gestion des maladies animales et la hiérarchisation des dangers sanitaires 49
1.3.7.1. Rôles de l'organisation mondiale des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) et de l'organisation mondiale de la santé animale (OIE) 51
1.3.7.2. Exemple de l'organisation sanitaire française 51
1.3.7.3. Surveillance épidémiologique à La Réunion 55
2. Interactions hôtes-pathogènes 55
2.1. Le parasitisme : définition 55
2.2. Les différents types de parasitisme 57
2.3. Evolution hôte-parasite 57
2.3.1. Coévolution parasitaire 57
2.3.2. Filtre de rencontre 59
2.3.3. Filtre de compatibilité 61
2.4. Résistance et résilience 61

3. Invasions biologiques et pathogènes émergents 61
3.1. Définitions 61
3.2. Les étapes d'une invasion biologique 63
3.3. Maladies et pathogènes émergents 67
4. L'abeille et sa pathosphère 69
4.1. L'abeille mellifère 69
4.1.1. Classification 69
4.1.2. Les différentes sous-espèces d'*Apis mellifera* 71
4.1.3. Biologie de l'abeille 71
4.1.4. Les castes d'abeilles 73
4.1.5. Cycle de vie 73
4.1.6. Le polyéthisme temporel ou lié à l'âge 75
4.2. La pathosphère de l'abeille mellifère 77
4.3. *Varroa destructor* 77
4.3.1. Systématique 77
4.3.2. Cycle de vie 79
4.3.3. Origine et dispersion 81
4.3.4. Varroose et impact sanitaire de *V. destructor* 81
4.4. Les bactéries 85
4.4.1. *Paenibacillus larvae* 87
4.4.2. *Melissococcus plutonius* 89
4.5. Les microsporidies 93
4.5.1. Biologie 93
4.5.2. *Nosema apis* 95
4.5.3. *Nosema ceranae* 95
4.6. Virus 97
4.6.1. Virus de la famille des Dicistroviridae 103
4.6.1.1. Taxonomie 103
4.6.1.2. Genre *Aparavirus* : le complexe AKI 103
4.6.1.2.1. ABPV 103
4.6.1.2.2. IAPV 105
4.6.1.2.3. KBV 105
4.6.1.2.4. Genre *Cripavirus* : BQCV 105
4.6.2. Virus de la famille des Iflaviridae 107
4.6.2.1. DWV et les virus proches 107
4.6.2.2. SBV 109

4.6.3. Cas particulier du CBPV 111
4.7. Les arthropodes impactant la santé de la colonie (hors varroa) 113
4.7.1. Les acariens du genre *Acarapis* 113
4.7.2. *Aethina tumida* 115
4.7.3. *Braula pretoriensis* 119
5. Les mécanismes de défense de l'abeille mellifère contre les agents pathogènes 121
5.1. A l'échelle individuelle 121
5.1.1. La réponse immunitaire 121
5.1.2. La réponse protéique 121
5.1.3. Le microbiote 123
5.2. Les interactions sociales et mécanismes de défenses comportementaux 123
5.2.1. Les comportements d'épouillage 123
5.2.2. La nécrophorie 125
5.2.3. La régulation de la température 125
5.2.4. Le comportement hygiénique 125
5.2.5. Le comportement VSH (varroa sensitive hygiene) 127
5.2.6. Le comportement SMR (Suppression Mite Reproduction) 127
5.3. La propolis 129
5.4. Les stratégies de gestion d'*A. tumida* par la colonie 129
6. La santé de l'abeille et les facteurs de risque de mortalités 129
6.1. Définitions de la santé 129
6.2. Les facteurs influençant la santé de l'abeille 131
6.2.1. Les pesticides 131
6.2.2. Les synergies pesticides agents pathogènes 133
6.2.3. Les synergies pathogènes-pathogènes 135
6.2.4. La réduction de la biodiversité 135
6.2.5. Le rôle de l'apiculteur dans le maintien de ses colonies en bonne santé dans un contexte apicole mondialisé 137
7. Le déclin des abeilles 139
7.1. Historique 139
7.2. Le syndrome d'effondrement des colonies (SED) 139
7.3. Les mortalités aiguës 141
7.4. L'abeille mellifère, espèce phare de la disparition des butineurs 141
8. Le Sud-Ouest de l'Océan Indien (SOOI) 143
8.1. Le hotspot de biodiversité malgache 143
8.2. Les différentes îles de l'Océan Indien 143

8.2.1. Madagascar, une île continentale à forte tradition apicole 143
8.2.2. Les Seychelles, un archipel continental à la tradition apicole modérée. 145
8.2.3. Les Mascareignes, un archipel de point chaud volcanique à l'anthropisation récente et de forte tradition apicole 145
8.2.3.1. La Réunion 147
8.2.3.2. Maurice 149
8.2.3.3. Rodrigues 151
8.3. Les abeilles de l'Océan Indien 151
Objectifs 155
Chapitre 1 Dynamique d'invasion de *Varroa destructor* à Madagascar de 2015 à 2017 et enquête épidémiologique descriptive des pathogènes de l'abeille mellifère 159
Chapitre 2 : Un contexte épidémiologique contrasté sur trois territoires du Sud-Ouest de l'Océan Indien: cas de Maurice, Rodrigues et des Seychelles 197
Chapitre 3 : Etat sanitaire et diversité des agents pathogènes des colonies à La Réunion avant et après l'introduction de varroa 231
Chapitre 4 : Interactions pathogène/pathogène ou comment la présence nouvelle de varroa à Maurice impacte la prévalence intra colonie de *Braula pretoriensis* 287
Discussion générale 301
1. Enquêtes épidémiologiques descriptives 303
1.1. Echantillonnage et précision relative des résultats 303
1.2. Diversité des maladies notifiables à l'OIE dans la zone SOOI 305
1.3. Diversité des virus pathogènes dans la zone SOOI 313
1.3.1. BQCV et CBPV 313
1.3.2. Le DWV 317
2. Interactions entre agents pathogènes, hôtes-pathogènes et dynamique d'invasion 323
2.1. Interactions 323
2.2. L'invasion du SOOI par varroa est en cours 325
3. Les mortalités de colonies dans le SOOI sont liées à l'introduction de varroa 329
Conclusion et perspectives 333
Références bibliographiques 341
Annexes 375

Liste des figures

Figure 1 : Représentation des différentes catégories de maladies contagieuses et transmissibles. En bas de la matrice des exemples de maladies animales sont cités : PPA : peste porcine africaine ; FA : fièvre aphteuse ; AIE : anémie infectieuse des équidés ; IST infections sexuellement transmissibles ; S :strongylose ; AV : arbovirose. D'après Toma et al., 2001 40

Figure 2 : Représentation schématique de différentes catégories de porteurs de germes par rapport au moment de l'expression clinique de la maladie d'après Toma et al. 2001 42

Figure 3: Organisation sanitaire française en place depuis 2011. (DS = danger sanitaire : OVS = organisme à vocation sanitaire ; ASR : association sanitaire régionale ; OVVT : organisme à vocation vétérinaire technique ; CR(N)OPSAV : comité régional (national) d'orientation des politiques sanitaires animales et végétales ; DRAAP : direction régionale de l'alimentation, de l'agriculture et de la forêt ; DDPP : direction départementale de la protection des populations : SRMDS : schéma régional de maîtrise des dangers sanitaires; PCV : programme collectif volontaire) 52

Figure 4: Présentation du réseau de ruchers sentinelles utilisées en 2017 par le réseau SEA et principales destinations des aéroports internationaux de La Réunion..... 54

Figure 5 : Filtres de rencontre et de compatbilité. Le parasite possède des gènes capables d'ouvrir ces deux filtres alors que l'hôte possède des gènes qui lui permettent de fermer ces diaphragmes aboutissant à une relation hôte-parasite. D'après Combes, 2005..... 58

Figure 6 : Classification des impacts dus aux insectes envahissants et cause des coûts générés pour y faire face (coûts de prévention, de dommage ou de réparation, en lisant la figure de manière centrifuge (Bradshaw et al., 2016)..... 62

Figure 7: Représentation du processus d'invasion biologique où les quatre étapes du processus d'invasion sont représentées en vert. Modifié d'après Jacquet, 2015..... 64

Figure 8: Phylogénie d'*Apis mellifera* d'après Han et al., 2012 & Johnson et al., 2013 68

Figure 9 : Illustrations des trois castes d'abeilles mellifères. La reine (à gauche) est reconnaissable à la longueur caractéristique de son abdomen ; le mâle ou faux-bourdon (au centre) est reconnaissable à la taille de ses yeux et à son aspect trapu ; l'ouvrière (à droite) 72

Figure 10 : Cycle de développement de la colonie d'*Apis mellifera* 74

Figure 11 : Polyéthisme lié à l'âge chez l'abeille domestique. D'après Michener, 1974 (repris de A. Maisonasse , 2010)..... 74

Figure 12: Représentation de la pathosphère de l'abeille mellifère – inspiré de Evans and Schwarz, 2011..... 76

Figure 13 : Faces dorsale et ventrale de femelles adultes en microscopie électronique de (a) et (b) *V. jacobsoni* (haplotype de Java), (c) et (d) *V. destructor* (haplotype K), (e) *V. rindereri* et (f) *V. underwoodi*
La taille de l'échelle est de 500 µm. Illustration tirée de (Anderson and Trueman, 2000)..... 78
Figure 14: Phylogénie de différentes espèces du genre *Varroa* en fonction des localités identifiées (Anderson and Trueman, 2000) 80

Figure 15 : Femelle *V. destructor* sur nymphe d'*A. mellifera unicolor*. L'appareil piqueur (gnathosome) est bien distinct. Photo Antoine Franck – CIRAD 80

Figure 16 : Cycle de développement de *Varroa destructor* dans le couvain d'ouvrière et de faux-bourdon (source : http://varroa.fr/) 82

Figure 17: Dispersion de *V. destructor* à l'échelle mondiale (Wilfert et al., 2016) 84

Figure 18 : Signes cliniques de loque américaine (couvain en mosaïque, opercules percés) avec l'aspect filant du contenu de la cellule infectée (signe de l'allumette) (© Margot Camoin) 90

Figure 19 : Spores de *Nosema sp.* en microscopie électronique (Ptaszynska et al., 2012) 94

Figure 20 : Représentation du cycle parasitaire des *Nosema sp.* parasitant le tube digestif de l'abeille © Springer Life Scientific 94

Figure 21 : Arbre phylogénétique basé sur les séquences d'acides aminés des protéines structurales des Dicistroviridae. L'outgroup est constitué par le virus de l'hépatite A. 104

Figure 22 : Structure du génome du virus de la paralysie du criquet (CrPV) – espèce type 104

Figure 23 : Structure du génome du virus infectieux de flacherie (IFV) – espèce type 106

Figure 24 : Phénogramme des différentes familles de virus basé sur le domaine RdRp des protéines non-structurales de l'ordre des Picornavirales (Picornaviridae, Dicistroviridae, Marnaviridae et Secoviridae) 106

Figure 25 : Ouvrière présentant les symptômes du DWV (©Olivier Esnault) 108

Figure 26 : Schémas des recombinaisons détectées entre des virus DWV et VdV-1 chez 4 souches recombinantes (Dalmon et al., 2017) 108

Figure 27 : Organisation du génome du CBPV (Ribiere et al., 2010) 110

Figure 28 : Photographie d'individu adulte Aethina tumida présentant ses signes caractéristiques : (a) antennes en massue, (b) pronotum bien séparé de la tête et de l'abdomen, (c) élytres ne recouvrant pas complètement l'abdomen (UK Crown Copyright ©) 114

Figure 29: Carte de répartition mondiale d'*Aethina tumida* et les périodes d'invasion hors de sa zone d'endémie (Afrique subsaharienne) 116

Figure 30: *Braula pretoriensis* adultes sur le thorax d'une reine (*A. mellifera ligustica* à Rodrigues) ;

ponte de *B. pretoriensis* sur colonie infestée par *V. destructor* (Maurice) (©Olivier Esnault) 118

Figure 31: Présentation des différents niveaux de défense chez l'abeille mellifère : (a) défenses individuelles (b) défense deux à deux : cas du grooming, (c) polyéthisme temporel premettant la différenciation des tâches, (d) limitation de l'entrée d'agents pathogènes et (e) utilisation de résines ou d'autres éléments présents dans l'environnement permettant la protection de la colonie (Evans and Spivak, 2010) 120

Figure 32 : L'immunité antivirale chez Apis mellifera (Brutscher et al., 2015) 122

Figure 33 : Représentations des interactions multiples jouant sur la santé de l'abeille. D'après (Nazzi and Pennacchio, 2014) 130

Figure 34 : Relations entre nutrition, immunité et quantités de virus (liés à varroa) influençant la santé de l'abeille (DeGrandi-Hoffman and Chen, 2015) 134

Figure 35 : Synthèse des stresseurs des abeilles sauvages et domestiques qui met l'accent sur des interactions pesticides/ressources florales et parasites/pathogènes (Goulson et al., 2015) 136

Figure 36: Relations phylogénétiques des différentes souches de DWV à l'échelle mondiale en relation avec la pandémie mondiale de varroa (Wilfert et al., 2016) avec deux focus particuliers sur la diversité des souches de DWV à Hawaii (à gauche) suite à l'introduction de V. destructor (Martin et al., 2012)et en Nouvelle-Zélande sur le front de colonisation du varroa (Mondet et al., 2014) 138

Figure 37 : Point chaud de diversité malgache avec la représentation des îles du Sud-ouest de l'Océan Indien étudiées (© IUCN) 140

Figure 38 : Ruchers de Madagascar : en haut à gauche : ruche tronc ; en haut à droite : caisse en bois servant de ruche : au milieu à gauche : ruche artisanale en cœur de village ; au milieu à droite : rucher traditionnel avec des ruches de différentes tailles ; en bas à gauche : ruches de type Langstroth financées dans le cadre d'un projet de développement ; en bas à droite : caisse placée en hauteur dans des eucalyptus (>10m) pour piéger des essaims (© Olivier Esnault)..... 142

Figure 39 : Ruchers des Seychelles : en haut à gauche : ruches à barrettes traditionnelles ; en haut à droite : barrettes faites par l'apiculteur et sur laquelle les abeilles construisent les rayons ; en bas à gauche : ruches modernes de type Dadant 10 cadres ; en bas à droite : ruche à barrettes d'un format différent de celles en haut (© Olivier Esnault)..... 144

Figure 40 : Ruchers à La Réunion : en haut à gauche : rucher avec des ruches connectées de type langstroth ; en haut à droite : rucher à barrettes traditionnel dans le cirque de Mafate ; en bas à gauche : rayon construit sur barrette ; en bas à droite : rucher de ruches bourbon (© Olivier Esnault) 146

Figure 41: Ruchers à Maurice : en haut à gauche : essaim maintenu dans un pneu et recouvert d'un morceau de tôle ondulée ; en haut à droite : ruche de type langstroth 12 cadres isolée ; en bas : ruches de type langstroth 12 cadres posées sur le toit d'une habitation (© Olivier Esnault)..... 148

Figure 42: calendrier des miellées pour l'île Rodrigues (Belmin, 2010) 150

Figure 43 : Rucher à Rodrigues : à gauche : rucher avec une ruchette et des ruches Dadant 12 cadres ; à droite : cadre de miel d'Eucalyptus prêt à être récolté (© Olivier Esnault)..... 150

Figure 45 : Structuration génétique des populations d'*Apis mellifera* du Sud-Ouest de l'Océan Indien. La ligne en haut désigne les assignations des ADN mitochondriaux des quatre groupes identifiés. Les lignes suivantes représentent les mélanges représentés pour 6 à 8 fonds génétiques (Wragg et al., 2018)..... 150

Figure 44 : Représentation des lignées évolutives des abeilles du Sud-Ouest de l'Océan Indien basé sur les analyses des régions CO1-CO2 de l'ADN mitochondrial. D'après Techer et al., 2017a 152

Figure 46 : Arbre bayésien de diversité des séquences obtenues du virus BQCV pour la zone SOOI avec les probabilités affichées sur chaque nœud pour chaque séquence a posteriori d'appartenir à chaque nœud. Le modèle choisi est GTR+I+G..... 316

Figure 47 : Arbre bayésien de diversité des séquences de DWV obtenues dans le SOOI. L'arbre est construit avec 9 séquences (2 de Madagascar, 3 de Maurice, 2 de Rodrigues et 2 des Seychelles). Les nombres placés sur les nœuds indiquent la probabilité a posteriori d'appartenir à tel nœud. Le modèle choisi pour construire l'arbre est le modèle suivant : GTR+I+G..... 318

Figure 48 : Projection en deux dimensions des données sanitaires pour chaque territoire suite à une analyse en composantes principales (ACP)..... 320

Figure 49 : Représentations du spectre du stress des abeilles mellifères mis à jour en ajoutant la situation dans le SOOI. Inspiré de Roberts etal., 2017. 330

Liste des tables

Tableau 1 : Liste des différentes sous-espèces d'*Apis mellifera* en fonction des zones géographiques d'après Techer, 2015 70

Tableau 2 : Synthèse des caractéristiques des différents génotypes de *P. larvae* d'après (Genersch, 2010) et (Vidal-Naquet, 2015). LT_{100} représente la période de temps au bout de laquelle 100% des individus infectés sont morts 88

Tableau 3: Présentation des virus connus affectant *A. mellifera*, les vecteurs ainsi que le mode de transmission sont détaillés, les symptômes quand ils sont disponibles ainsi que leur répartition géographique 98

Tableau 4 : Critères de diagnose des différentes espèces d'*Acarapis* d'après Delfinado-Baker and Baker, 1982 112

Tableau 5 : Présence et/ou prévalence observée des agents pathogènes étudiés. La précision relative est inscrite entre parenthèses sous les prévalences observées. 304

Préface

L'abeille mellifère (*Apis mellifera*) est un insecte pollinisateur majeur qui fournit des services écosystémiques variés aussi bien dans les écosystèmes agricoles que naturels. Depuis le début des années 2000, les populations d'abeilles mellifères subissent des mortalités importantes, particulièrement médiatisées depuis quelques années. Ces mortalités, ou effondrements de colonies, sont surtout rencontrés en Europe et en Amérique du Nord. Parallèlement, on assiste dans l'hémisphère Nord à une érosion importante de la biodiversité et entre autres, on assiste à la disparition d'autres pollinisateurs comme les bourdons ou les abeilles solitaires.

Les causes de ces mortalités sont complexes à définir. L'exposition aux pesticides (insecticides, fongicides…), la difficulté d'accès à des ressources alimentaires diversifiées ou encore les mauvaises pratiques apicoles peuvent constituer un pan de facteurs explicatifs. L'autre pan serait constitué par la diversité des agents pathogènes affectant l'abeille mellifère. En premier lieu, *Varroa destructor* est considéré comme l'une des menaces sanitaires les plus importantes mais d'autres agents pathogènes comme des virus, des bactéries ou des microsporidies peuvent également affecter gravement la santé de l'abeille. Tous ces agents de stress interagissent entre eux et peuvent créer différents types de synergies au détriment de la bonne santé des colonies.

Si la situation sanitaire des abeilles est bien connue dans les pays du Nord, peu de données sont disponibles pour les zones tropicales et plus particulièrement en Afrique. La région du Sud-Ouest de l'Océan Indien (SOOI) appartient au point chaud de biodiversité malgache. Ces écosystèmes îliens sont sensibles aux invasions biologiques. L'abeille mellifère y est établie dans toutes les îles et appartient majoritairement à la sous-espèce appartenant à la lignée évolutive africaine, *Apis mellifera unicolor* (Latreille, 1804), endémique de Madagascar et indigène dans la plupart des îles. L'apiculture est particulièrement importante sur ces îles où elle peut revêtir une importance socio-économique majeure comme à Rodrigues, Madagascar ou à La Réunion et plus modérée à Maurice ou aux Seychelles. Quasiment aucune donnée sanitaire n'était disponible au début de ces travaux si ce n'est la description de l'introduction récente de *V. destructor* en 2010 à Madagascar avec des conséquences sanitaires particulièrement importantes sur la population d'abeille locale (mortalités massives). L'état de santé des abeilles était alors présumé bon sur les autres îles du SOOI étudiées avec une absence de mortalités aiguës. Malheureusement au cours des travaux de thèse, l'invasion de varroa ne s'est pas cantonnée à Madagascar mais a touché en 2014 Maurice et en 2017 La Réunion.

Au démarrage de ma thèse, la situation sanitaire dans le SSOI peut être ainsirésumée par les éléments suivants :

- situations sanitaires inconnues sur les îles de l'Océan Indien
- mais un état de santé des colonies présumé bon
- un contexte écologique particulier
- l'invasion de varroa référencée à Madagascar

Dans ce contexte particulier, je me suis attaché à décrire au mieux la diversité des situations sanitaires sur les différentes îles tout en essayant de mesurer les effets de l'invasion de varroa. C'est ce que ce travail de thèse propose à travers la réalisation de différentes enquêtes épidémiologiques descriptives réalisées sur les îles de La Réunion, de Maurice, Rodrigues, Madagascar et les trois principales îles des Seychelles.

émergence d'une jeune abeille (© Olivier Esnault)

Bibliographie

1. Epidémiologie animale : les grands principes

Les principales notions d'épidémiologie animales ainsi que les concepts et définitions essentiels définis dans l'introduction de cette thèse sont tirés de (Toma *et al.*, 2001) et (Dohoo *et al.*, 2003).

1.1. Notions de base en pathologie infectieuse

Les organismes peuvent être exposés à des maladies transmissibles[1] à partir d'agents pathogènes[2] pouvant causer une maladie infectieuse[3] et/ou contagieuse[4] (Figure 1).

Différents paramètres comme la réceptivité[5] ou la sensibilité[6] de l'organisme hôte feront qu'en fonction de la dose[7] de l'agent pathogène rencontré, l'organisme sera ou non infecté[8] et après ou non incubation[9], une maladie[10] sera cliniquement exprimée ou non.

Une maladie comporte généralement 6 phases successives :

① Phase d'incubation

② Phase d'invasion : période transitoire caractérisée par les premiers symptômes généralement non spécifiques

③ Phase clinique : période des manifestations cliniques habituelles de la maladie

④ Phase de défervescence : période correspondant à la diminution graduelle de l'intensité des manifestations de la maladie et à la disparition progressive des symptômes

⑤ Phase de convalescence : période de restauration graduelle de la fonction et de la morphologie des organes et des systèmes corporels ainsi que du rétablissement des facultés de restauration et d'adaptation de l'organisme aux facteurs environnementaux

⑥ Phase de santé restaurée : L'issue d'une maladie débouche généralement sur la mort de l'organisme ou sa guérison. L'organisme

[1] Maladie dont l'agent peut être transmis et retransmis à d'autres organismes
[2] Agent mécanique, physique, biologique, comportemental ou social dont la présence, l'excès ou l'insuffisance joue un rôle dans l'apparition de la maladie
[3] Maladie due à un microbe qui se multiplie dans l'organisme hôte
[4] Maladie transmise par contact direct ou indirect avec un organisme source de l'agent pathogène
[5] Aptitude à héberger un agent pathogène, à en permettre le développement ou la multiplication, sans forcément en souffrir
[6] Aptitude à exprimer cliniquement l'action d'un agent pathogène
[7] La dose infectante est la quantité de germes capables de provoquer une infection chez des organismes d'une catégorie définie, dans des conditions définies.
[8] Infection : pénétration et reproduction dans un organisme réceptif d'une entité étrangère capable de s'y multiplier et de reproduire des entités identiques
[9] Délai séparant la rencontre entre l'agent pathogène et l'organisme, de l'apparition des symptômes de la maladie
[10] Perturbation non compensée d'une ou plusieurs fonctions d'un organisme vivant. Entité morbide due à un agent pathogène sévissant dans une population sensible.

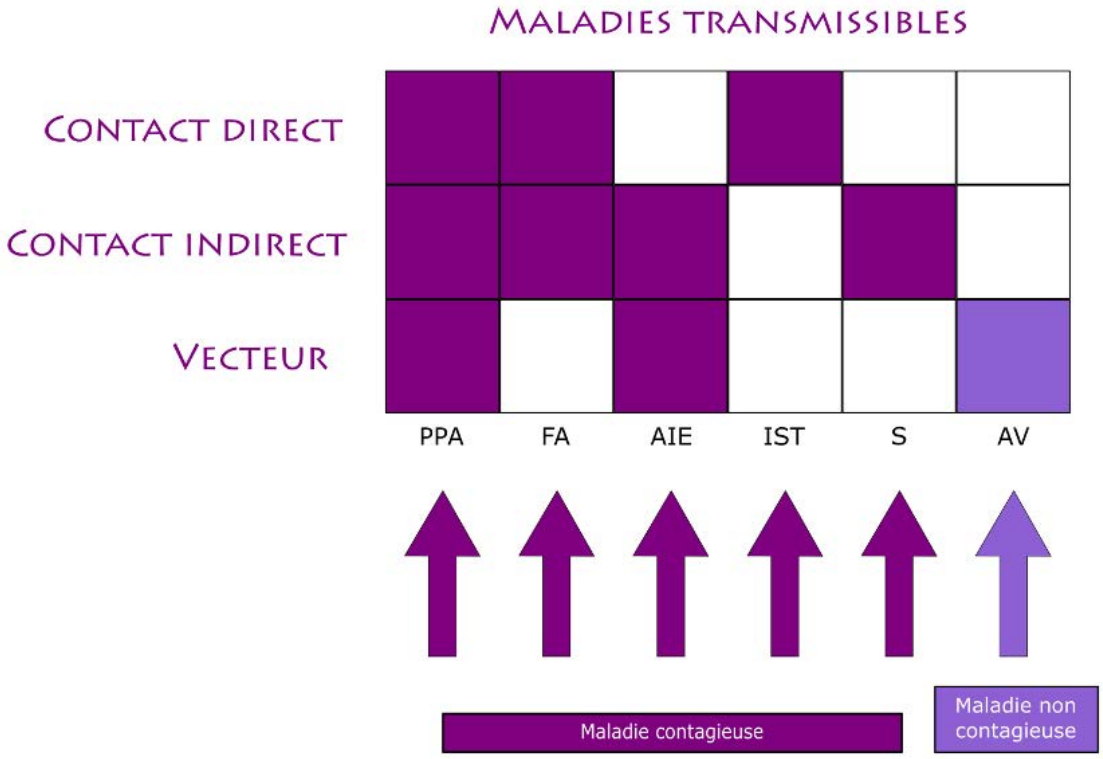


Figure 1 : Représentation des différentes catégories de maladies contagieuses et transmissibles. En bas de la matrice des exemples de maladies animales sont cités : PPA : peste porcine africaine ; FA : fièvre aphteuse ; AIE : anémie infectieuse des équidés ; IST infections sexuellement transmissibles ; S :strongylose ; AV : arbovirose. D'après (Toma et al., 2001)

malade peut être source d'infection pour d'autres organismes de manière intermittente ou continue, et directe ou indirecte (Figure 2). Des vecteurs[11] ou des réservoirs[12] peuvent aussi être impliqués comme étant source d'infection. Généralement, une immunité se met en place permettant la guérison mais des épisodes de récidive[13] ou de récurrence[14] peuvent survenir.

1.2. L'épidémiologie

Les caractéristiques épidémiologiques des maladies animales transmissibles résultent des interactions entre l'agent pathogène (spectre zoologique, résistance, tropisme d'organe, etc.), la population (espèces réceptives, nombre d'individus, race, sexe, âge, etc.) et le milieu (pratiques d'élevage, climat, ressources alimentaires, vecteurs, etc.). *In fine*, l'épidémiologie permet de développer des méthodes de lutte contre les maladies et alimente de manière permanente la médecine préventive ou la prophylaxie[15].

Les différents domaines de l'épidémiologie peuvent être abordés comme une succession temporelle ou logique :

- → L'épidémiologie descriptive va s'atteler à décrire de la manière la plus précise possible les caractéristiques spatio-temporelles d'une maladie atteignant, se développant ou étant présente dans une population. Celle-ci va fournir une « photographie » de la situation sanitaire en cours.
- → L'épidémiologie analytique, s'efforcera quant à elle d'analyser les mécanismes épidémiologiques du développement de la maladie étudiée dans la population et d'expliquer son fonctionnement. Cette épidémiologie analytique se nourrira entre autres de facteurs de risque. Les études écopathologiques[16] rentrent dans ce cadre d'épidémiologie analytique (Faye *et al.*, 1994).

[11] Etre vivant qui, à l'occasion de relations écologiques, acquiert un agent pathogène sur un hôte, et le transmet ensuite à un autre hôte.
[12] Espèce(s), milieu(x) ou mécanisme(s) permettant la survie d'un agent pathogène considéré en tant qu'espèce.
[13] Réapparition des symptômes d'une maladie, plus ou moins longtemps après sa guérison et à la suite d'une nouvelle infection ou infestation.
[14] Réapparition des symptômes d'une maladie chez un sujet apparemment guéri, sans nouveau contact avec l'agent pathogène.
[15] La prophylaxie correspond à l'ensemble des mesures médicales et hygiéniques visant à prévenir l'apparition d'une maladie, à en limiter le développement et à en assurer la disparition.
[16] L'écopathologie animale a été élaborée pour apporter des solutions économiquement viables aux problèmes posés par la pathologie multifactorielle dans les élevages. Elle s'intéresse aussi bien aux élevages intensifs des pays développés que des élevages extensifs des pays en voie de développement.

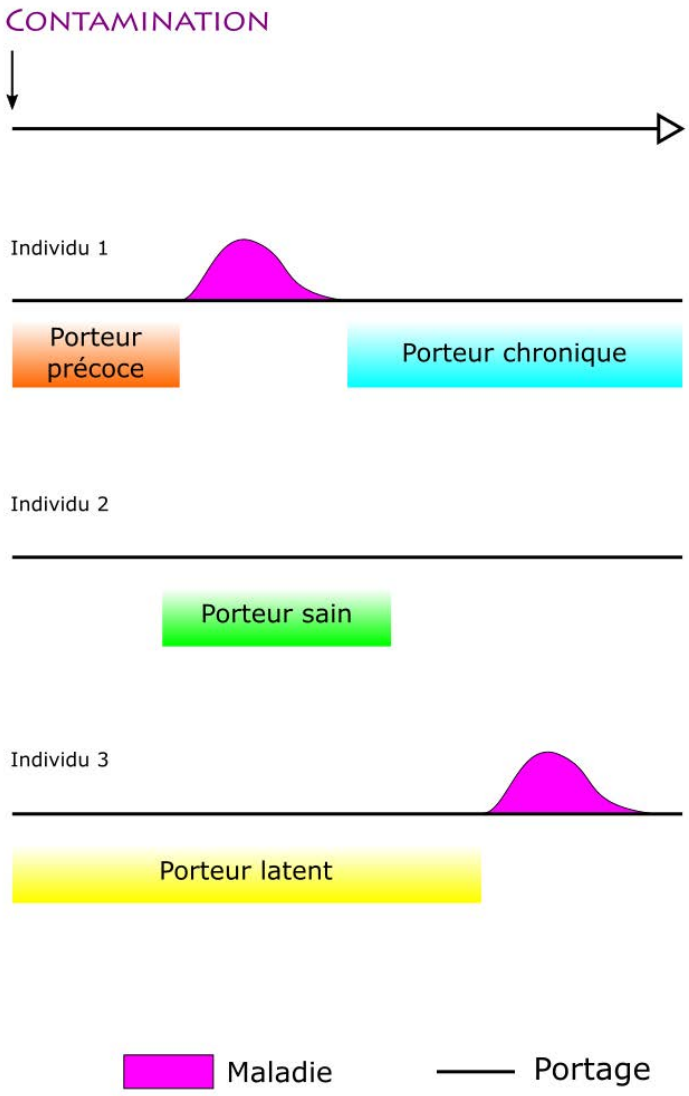


Figure 2 : Représentation schématique de différentes catégories de porteurs de germes par rapport au moment de l'expression clinique de la maladie d'après Toma et al. 2001

→ L'épidémiologie opérationnelle s'appuie sur la méthode épidémiologique pour étudier les problèmes concrets concernant une maladie et de prendre des décisions quant à sa gestion. L'analyse de risque[17] rentre dans cette démarche d'épidémiologie opérationnelle.

→ L'épidémiologie évaluative se concentrera sur l'évaluation des résultats et des modalités des programmes de lutte mis en place dans le cadre de la gestion de maladies d'importance.

Tous ces domaines se nourrissent et vont nourrir le champ de l'épidémiologie théorique.

1.3. Les indicateurs épidémiologiques

Les indicateurs épidémiologiques permettent, en fonction des domaines de l'épidémiologie de pouvoir quantifier les évènements. Il pourra s'agir de la description d'une situation à un instant t (la photographie), d'un échantillon de la population étudiée (utilisé en épidémiologie descriptive) ou bien encore de recueillir des données pour étudier des facteurs de risque ou des facteurs explicatifs.

Tout au long de mon travail de thèse, ces notions et indicateurs seront utilisés pour étudier l'épidémiologie des maladies ou des agents pathogènes de l'abeille et méritent ainsi d'être définis ci-après.

1.3.1. Définition du critère d'identification de la maladie

Dans le cas où la maladie est identifiée de manière clinique, le recensement des symptômes peut suffire sans avoir à recourir à des examens complémentaires de laboratoire (PCR, sérologie, etc.). Cependant ceux-ci sont parfois nécessaires pour confirmer ou non la présence de maladies, particulièrement dans le cas de symptômes non spécifiques.

Dans ce cadre, un cas va être défini avec un certains nombres de symptômes évocateurs qui permettra à tous les intervenants (vétérinaires, techniciens, etc.) d'avoir une approche similaire.

Quand la maladie étudiée ou recherchée est infra-clinique, le recensement des cas se fera par des analyses de laboratoire standardisées permettant ainsi une standardisation des observations.

[17] L'analyse de risque est une manière d'organiser les informations disponibles sur un évènement potentiel donné, de les traduire en probabilités en tenant compte d'hypothèses, de la variabilité et de l'incertitude et d'en déduire logiquement des décisions.

1.3.2. Définition de la population et choix de l'unité épidémiologique

La population étudiée sera définie par sa nature (réceptivité, exposition au risque) ainsi que par sa position dans l'espace et son effectif dans le temps.

Le choix de l'unité épidémiologique sera réalisé en fonction des caractéristiques des maladies étudiées (quand elles sont connues). Les études pourront se focaliser sur l'animal individuel ou le troupeau exprimant des signes cliniques ou des mortalités. Dans le cas de l'épidémiologie des maladies des abeilles, plusieurs unités peuvent être définies comme l'abeille individuelle, la colonie ou encore le rucher (analogue du troupeau).

D'autres unités épidémiologiques peuvent être définies comme par exemple le nombre d'épisodes cliniques enregistrés. Parfois il pourra aussi s'agir de combinaisons du nombre d'animaux malades pendant un laps de temps donné.

1.3.3. Prévalence et incidence

Ces deux indicateurs constituent la base de l'épidémiologie descriptive et permettent ainsi de décrire la situation d'une maladie à un moment donné, de suivre son évolution et de pouvoir dresser des bilans.

La prévalence correspond au nombre total de cas ou de foyers d'une maladie dans une population déterminée, au cours d'une période donnée ou à un instant donné. L'incidence, quant à elle ne peut s'appliquer qu'à une période donnée. Elle correspond au nombre de cas ou de foyers nouveaux d'une maladie, dans une population déterminée, au cours d'une période donnée. Ces deux notions sont interdépendantes puisque l'incidence alimente la prévalence qui en retour conditionne le niveau de l'incidence.

1.3.4. Les formes épidémiologiques des maladies

Lorsque l'incidence est stable au cours de périodes successives on parlera de situation enzootique. Lorsque l'incidence d'une maladie subit de fortes variations on parlera d'épizootie. Dans certains cas, l'épizootie peut être définie simplement par une nette augmentation de l'incidence par rapport à l'incidence attendue.

Lorsqu'une épizootie se propage sur de très grandes distances on parlera de panzootie et lorsque l'incidence est faible ou accidentelle séparée par de grandes périodes d'incidence nulle, on parlera d'évènements sporadiques.

Enfin, concernant les maladies non contagieuses pouvant être contractées à partir d'une source commune, on parlera d'anazootie.

Pour illustrer ce propos, le chickungunya a connu une phase épidémique de grande importance à La Réunion en 2005-2006 (Renault *et al.*, 2007, Gerardin *et al.*, 2008). Depuis, la situation s'est stabilisée ; la maladie est désormais en phase endémique avec l'expression clinique de quelques cas sporadiques annuellement. Autre exemple, en 2009 le virus grippal H1N1 a connu une pandémie mondiale. Originaire du Mexique, le virus a touché tous les continents avec des impacts de santé très important (World Health Organization, 2009). Enfin, concernant l'anazootie, l'exemple des farines animales utilisées pour nourrir le bétail et responsables de l'encéphalite spongiforme bovine à partir de sources alimentaires est particulièrement illustratif.

1.3.5. Les indicateurs bruts et spécifiques

Les indicateurs bruts correspondent aux taux de morbidité, d'infection, de mortalité et de létalité au sein des populations cibles.

- $Taux\ de\ morbidité = \frac{Nombres\ de\ malades}{Population\ soumise\ au\ risque}$
- $Taux\ d'infection = \frac{Nombre\ de\ sujets\ infectés}{Population\ soumise\ au\ risque}$
- $Taux\ de\ mortalité = \frac{Nombre\ de\ morts}{Population\ soumise\ au\ risque}$
- $Taux\ de\ létalité = \frac{Nombre\ de\ morts}{Nombre\ de\ malades}$

Les taux spécifiques sont des subdivisons de ces taux bruts en fonction de l'âge, de la race, du sexe, etc.

1.3.6. L'échantillonnage et l'interprétation des données obtenues

En épidémiologie descriptive, les enquêtes sont généralement réalisées sur un échantillon de la population étudiée. L'étude de cet échantillon doit pouvoir permettre d'estimer les caractéristiques de la population. Pour cela l'échantillon doit être exact et précis. L'exactitude d'un échantillon est généralement assurée par une sélection aléatoire des individus sélectionnés. La taille de l'échantillon

assurera quant à elle la précision de l'échantillon. Plus la taille de l'échantillon est grande plus les informations récoltées seront précises.

Concernant les modalités d'échantillonnage nous ne nous intéresserons qu'à l'échantillonnage aléatoire simple, à l'échantillonnage aléatoire stratifié et à l'échantillonnage aléatoire en grappes. L'échantillonnage aléatoire simple est le plus simple à mettre en place. A partir d'une base de données de la population étudiée (ex : les colonies officiellement déclarées à La Réunion), on va générer un tirage au sort aléatoire de colonies à aller échantillonner. Concernant l'échantillonnage stratifié, on va définir des strates au sein de la population (ex : colonies en production sur différentes miellées, taille des ruches (ex : <10 colonies, 10-20 colonies…, etc.) et pour chaque strate on effectuera un tirage aléatoire. Bien sûr la taille de l'échantillon sera déterminée par la prévalence supposée au sein de chaque strate. Enfin, une grappe peut être définie comme un ensemble d'individus. Il peut s'agir d'un rucher qui sera une grappe de colonies ou encore une commune qui peut être une grappe de ruchers ou de colonies.

La ou les prévalences observées sur l'échantillon auront une marge d'incertitude qui peut être définie par un intervalle de confiance. Plus l'échantillon est grand, plus cet intervalle de confiance est petit et donc plus la précision est grande. La précision absolue correspond à la mesure de la dispersion des valeurs autour de la moyenne et correspond à la moitié de l'écart-type. Quant à la précision relative, c'est le rapport de la précision absolue sur la valeur estimée ou mesurée.

1.3.7. La gestion des maladies animales et la hiérarchisation des dangers sanitaires

La lutte contre les maladies animales se base avant tout sur des préoccupations de santé publique (impact zoonotique[18] d'une maladie) mais aussi sur des critères aussi divers que le potentiel de persistance et d'évolution de la maladie de l'infection chez l'animal, l'impact économique et commercial de la maladie dans les élevages touchés, l'impact sociétal de la maladie, l'impact de la maladie sur la biodiversité, les limites à l'efficacité des mesures de lutte, l'impact économique global des mesures de lutte à l'échelon national, et les impacts sociétaux et environnementaux des mesures de lutte (ANSES, 2012).

[18] Les zoonoses sont des maladies et infections qui se transmettent naturellement des animaux vertébrés à l'Homme et réciproquement.

1.3.7.1. Rôles de l'organisation mondiale des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) et de l'organisation mondiale de la santé animale (OIE)

La FAO est une organisation intergouvernementale qui compte 194 états membres et une organisation membre (l'Union européenne). Son objectif est de contribuer à éradiquer la faim dans le monde, à garantir la bonne santé des populations et la durabilité de la production alimentaire. La FAO se base sur une approche holistique de la santé animale (One Health) et centre ses actions sur les maladies zoonotiques, les maladies transfrontalières, les maladies transmises par les insectes, les maladies liées à la production et à l'hygiène, la santé publique vétérinaire, l'approche One Health, la sécurité sanitaire des aliments, le renforcement des systèmes vétérinaires et la résistance aux antimicrobiens.

L'OIE est une organisation intergouvernementale chargée d'améliorer la santé animale dans le monde créée le 25 janvier 1924. Les normes établies par l'organisation sont reconnues par l'Organisation Mondiale du Commerce. Les objectifs de cette organisation semblent assez proches de certaines missions de la FAO mais l'accent est notamment mis sur la transparence concernant la situation des maladies animales dans le monde. Un des autres objectifs est de collecter, analyser et diffuser l'information scientifique, d'apporter son expertise et stimuler la solidarité internationale pour contrôler les maladies animales, de garantir la sécurité du commerce mondial (en élaborant des normes sanitaires pour les échanges internationaux des animaux et de leurs produits dans le cadre du mandat confié à l'OIE par l'accord SPS[19]). Dans ce cadre l'OIE a édité (entre autres) un code sanitaire pour les animaux terrestres ainsi qu'un manuel des normes pour les tests de diagnostic et les vaccins. Dans ces documents sont répertoriées les méthodes standardisées de diagnostic des maladies notifiables à l'organisation. Concernant les abeilles, les maladies notifiables à l'OIE sont les suivantes : acarapisose des abeilles mellifères (agent étiologique : *Acarapis woodi*), infestation des abeilles mellifères par l'acarien *Tropilaelaps*, infestation par le petit coléoptère des ruches (agent étiologique : *Aethina tumida*), loque américaine des abeilles (agent étiologique : *Paenibacillus larvae*), loque européenne des abeilles (agent étiologique : *Melissococcus plutonius*) et la varroose des abeilles (agent étiologique : *Varroa destructor*). Enfin l'OIE assure la promotion des services vétérinaires ainsi que la sécurité sanitaire des aliments et le bien-être animal.

1.3.7.2. Exemple de l'organisation sanitaire française

Toutes ces informations sont tirées des textes réglementaires et du site du ministère de l'agriculture.

[19] L'accord « SPS » est un traité international de l'organisation mondiale du commerce concernant l'application de mesures sanitaires et phytosanitaires relatives à l'innocuité des produits alimentaires ainsi qu'à la protection de la santé animale et la préservation des végétaux. Cet accord est entré en vigueur le 1er janvier 1995.

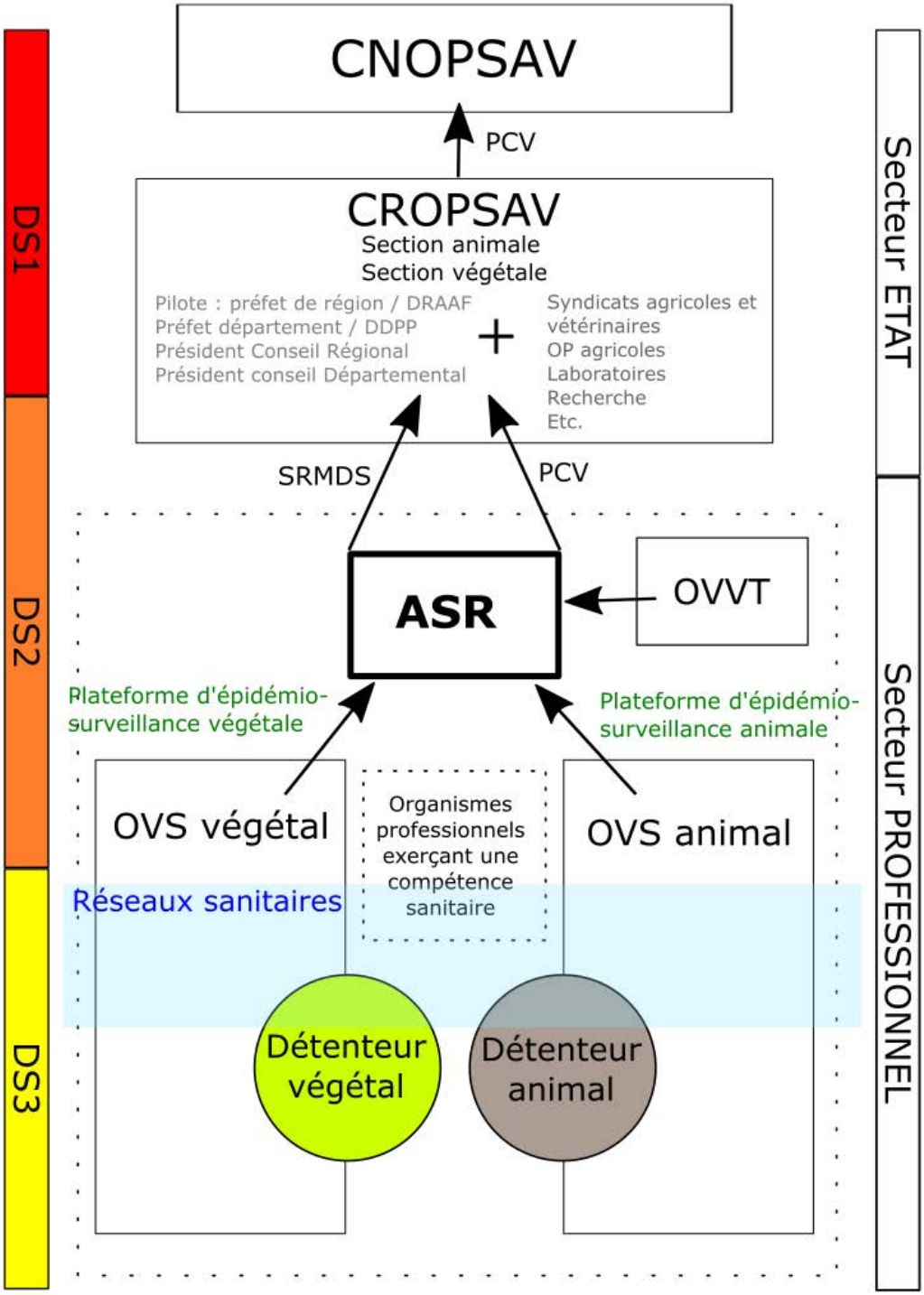


Figure 3 : Organisation sanitaire française en place depuis 2011. (DS = danger sanitaire : OVS = organisme à vocation sanitaire ; ASR : association sanitaire régionale ; OVVT : organisme à vocation vétérinaire technique ; CR(N)OPSAV : comité régional (national) d'orientation des politiques sanitaires animales et végétales ; DRAAP : direction régionale de l'alimentation, de l'agriculture et de la forêt ; DDPP : direction départementale de la protection des populations : SRMDS : schéma régional de maîtrise des dangers sanitaires; PCV : programme collectif volontaire)

En 2011, l'organisation sanitaire française a été bouleversée en changeant la dénomination des maladies réglementées (Ordonnance 2011-862). Les anciennes maladies réputées contagieuses (MRC) et maladies à déclaration obligatoire (MDO) étaient remplacées respectivement par des dangers sanitaires de première et deuxième catégorie (ANNEXE 1). Ces notions sont désormais communes avec le monde végétal.

Il existe dorénavant 3 catégories définies dans le code rural :

- Dangers de première catégorie : dangers dont les manifestations ont des conséquences graves et qui requièrent dans l'intérêt général un encadrement règlementaire
- Dangers de deuxième catégorie : dangers pour lesquels il peut être opportun dans un intérêt collectif de définir des mesures règlementaires ou de reconnaître officiellement l'action menée par certaines filières de production (Fediaevsky *et al.*, 2013)
- Dangers de troisième catégorie : dangers dont la maîtrise relèvent de l'intérêt ou de l'initiative privée (Fediaevsky *et al.*, 2013)

Cette catégorisation restreint le champs du domaine régalien et renforce le rôle des organisation professionnelles pour la gestion des maladies et particulièrement des organismes à vocation sanitaire (OVS) (Figure 3) qui sont dans la majorité des cas des groupements de défense sanitaire (GDS) avec des sections départementales et régionales (FRGDS) et affiliés au sein d'un réseau national (GDS France).

Les dangers sanitaires de première catégorie concernant les abeilles sont : l'infestation à *Aethina tumida*, l'infestation due à *Tropilaelaps sp.*, la loque américaine, la nosémose des abeilles due à *Nosema apis*. Les dangers de deuxième catégorie sont le frelon asiatique (*Vespa velutina*) et la varroose. La liste des dangers sanitaires établie en France est différente de celle de l'OIE.

Concernant la gestion des mortalités aiguës d'abeilles, la Direction Générale de l'Alimentation a sorti une note de service disponible en ANNEXE 2 concernant le cas des mortalités aiguës avec hypothèse d'intoxication (DGAL/SASPP/2018-444 du 12/06/2018). La définition du cas est la suivante : une colonie est considérée victime de mortalité massive aiguë d'abeilles adultes (MMAA) lorsque, brutalement et sur une période inférieure à 15 jours, une des caractéristiques suivantes est vérifiée :

- des abeilles adultes sont retrouvées mortes ou moribondes sous forme d'un tapis devant ou dans la ruche (volume d'abeilles touchées supérieur à un litre),
- la colonie est victime de dépopulation (hors essaimage), c'est à dire qu'il y a disparition d'une grande partie des abeilles adultes avec présence dans la ruche d'une population très réduite d'abeilles avec présence de couvain, de réserves de miel et de pollen en quantité.

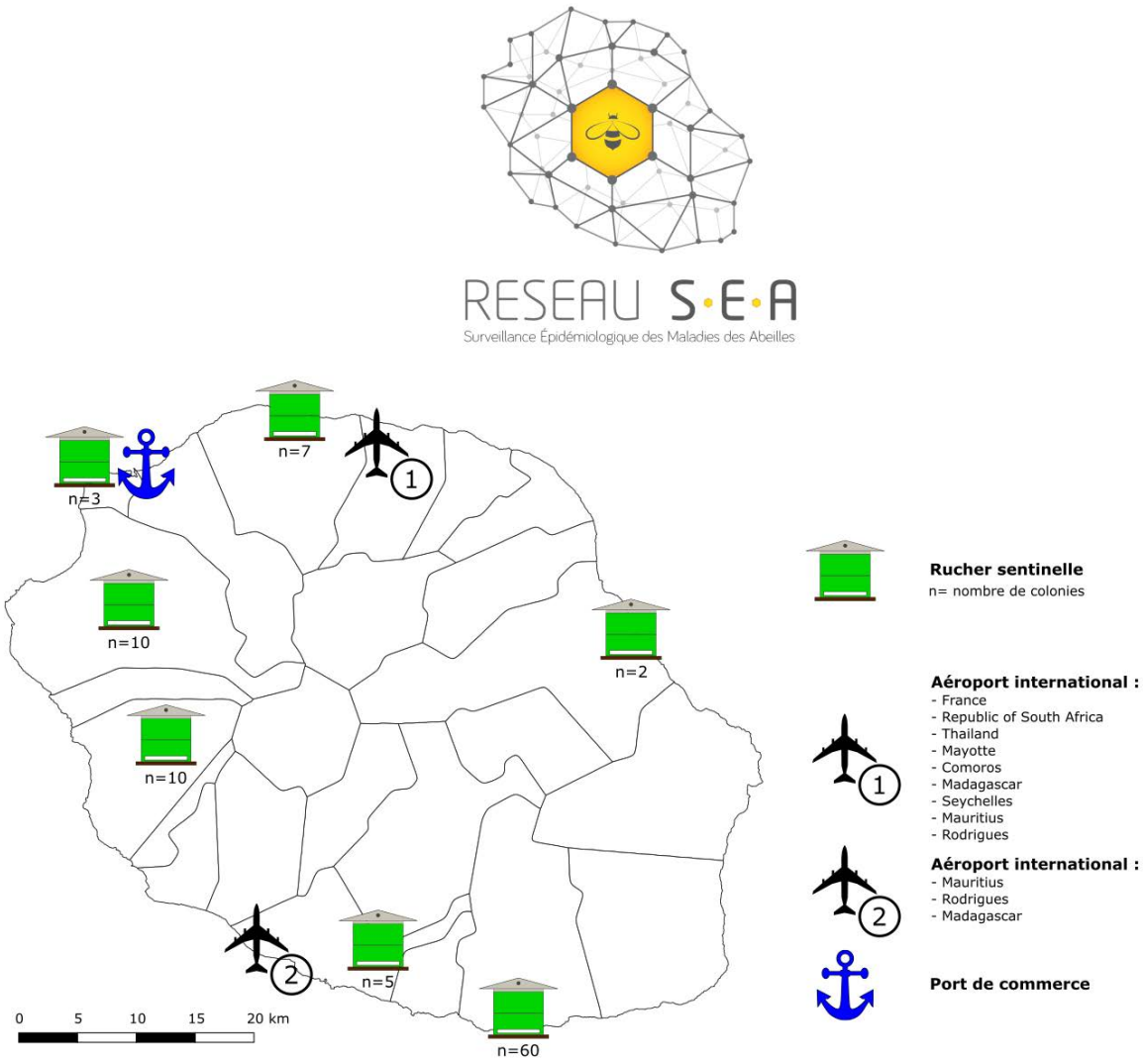


Figure 4 : Présentation du réseau de ruchers sentinelles utilisées en 2017 par le réseau SEA et principales destinations des aéroports internationaux de La Réunion

1.3.7.3. Surveillance épidémiologique à La Réunion

Depuis le 7 janvier 2016 un réseau d'épidémiosurveillance des maladies des abeilles existe à La Réunion. L'objectif fondateur de ce réseau était de pouvoir assurer une détection précoce de varroa en vue d'une reconnaissance européenne du statut indemne de l'île de La Réunion. Ce réseau a pu se développer et se structurer grâce à une enquête d'analyse de risque menée sur tous les agents pathogènes exotiques, montrant alors la vulnérabilité de l'apiculture réunionnaise (ANNEXE 3). Le réseau SEA (Suivi Epidémiologique des maladies des Abeilles) a pour objectif la détection précoce des agents pathogènes exotiques (*V. destructor*, *A. tumida*, *P. larvae* et *Tropilaelaps sp.*) mais aussi des missions d'épidémiosurveillance en réalisant des suivis longitudinaux des agents pathogènes endémiques (*M. plutonius*, virus, etc.) et des mortalités. Ce réseau est animé par le GDS Réunion et ses résultats sont présentés à chaque session de CROPSAV animal ou plénier. Les modalités de surveillance sont variées et se basent sur de la surveillance active via un réseau de ruchers sentinelles (Figure 4) mais également de surveillance passive utilisant la remontée d'évènements sanitaires des apiculteurs vers l'équipe technique du GDS Réunion.

2. Interactions hôtes-pathogènes

2.1. Le parasitisme : définition

Les espèces vivantes sont en interactions constantes avec leur environnement ou avec d'autres espèces. Ces interactions entres espèces vivantes peuvent être classées de différentes manières (Mitchell *et al.*, 2006) :

- effets négatifs réciproques : compétition
- effet bénéfique pour une espèce, effet négatif pour une autre : parasitisme ou prédation
- effets bénéfiques réciproques : mutualisme
- effet bénéfique pour une espèce sans effet négatif pour l'autre : commensalisme ou phorésie

Le Larousse médical définit le parasite comme étant « un organisme qui se développe aux dépens de celui qui l'héberge ». Pour autant, la parasitologie humaine et vétérinaire ne s'intéressera qu'à l'étude des protozoaires, helminthes, champignons ou aux arthropodes. Le parasitisme peut être défini de manière plus complète par une « relation durable et obligatoire à au moins un stade de sa vie, au cours de laquelle le parasite utilise l'hôte comme son habitat, lui permettant ainsi de s'abriter, de trouver les nutriments nécessaires à sa survie et à sa reproduction tout en ayant généralement un impact négatif sur la fitness de celui-ci » (Combes, 2005). Cette définition plus généraliste permet ainsi d'englober d'autres entités pathogènes comme les bactéries ou les virus.

2.2. Les différents types de parasitisme

Parmi les paramètres qui différencieront la prédation du parasitisme, la durée joue un rôle déterminant. La rencontre entre le parasite et l'hôte constituera le point de départ de cette interaction puisque l'hôte servira d'habitat au parasite (Combes, 2005).

Une première différenciation se base sur des critères de taille puisque l'on distinguera les microparasites (virus, bactéries, protozoaires) des macroparasites de taille largement supérieure (arthropodes, helminthes, etc.).

Parmi les parasites, on distinguera les parasites obligatoires (nécessitant un hôte pour accomplir tout ou partie de leur développement) des parasites facultatifs qui ont la capacité d'effectuer leur cycle de développement de façon libre ou parasitaire.

Enfin, un dernier critère de différenciation concernera la localisation des parasites. On opposera les ectoparasites qui se cantonneront à la surface de l'hôte aux endoparasites qui se développeront à l'intérieur de l'organisme. Parmi ces derniers, on distinguera les parasites intracellulaires qui vivent à l'intérieur des cellules de leur hôte (Combes, 2005).

2.3. Evolution hôte-parasite

La relation hôte-parasite sera influencée par deux paramètres qui peuvent être comparés à deux filtres (ou diaphragmes) : le filtre de rencontre et le filtre de compatibilité (Figure 5). Pour se défendre, l'hôte va essayer de fermer au maximum ces deux filtres alors que pour se reproduire le parasite fera tout pour les refermer (Combes, 2005).

2.3.1. Coévolution parasitaire

Si le passage par ces filtres est nécessaire pour établir cette relation hôte-parasite, la relation entre l'hôte et le parasite n'est pas figée mais dynamique où pour chaque étape de la vie du parasite (la reproduction particulièrement), celui-ci essaiera de maintenir les filtres ouverts. Si cette relation semble stable il n'en est rien. On parlera alors de coévolution. La coévolution peut être définie comme l'évolution conjointe de deux (ou plusieurs) espèces en interactions, chacune évoluant en réponse à la sélection imposée par l'autre (Thomas *et al.*, 2010). Quand deux espèces sont en compétition, à chaque fois qu'une espèce acquiert un avantage évolutif, elle modifie l'environnement de l'autre, l'obligeant à sélectionner à son tour un avantage compensateur. Ainsi les deux acteurs de cette relation sont en perpétuelle évolution et ce principe est nommé principe de la reine rouge (Van Valen, 1977).

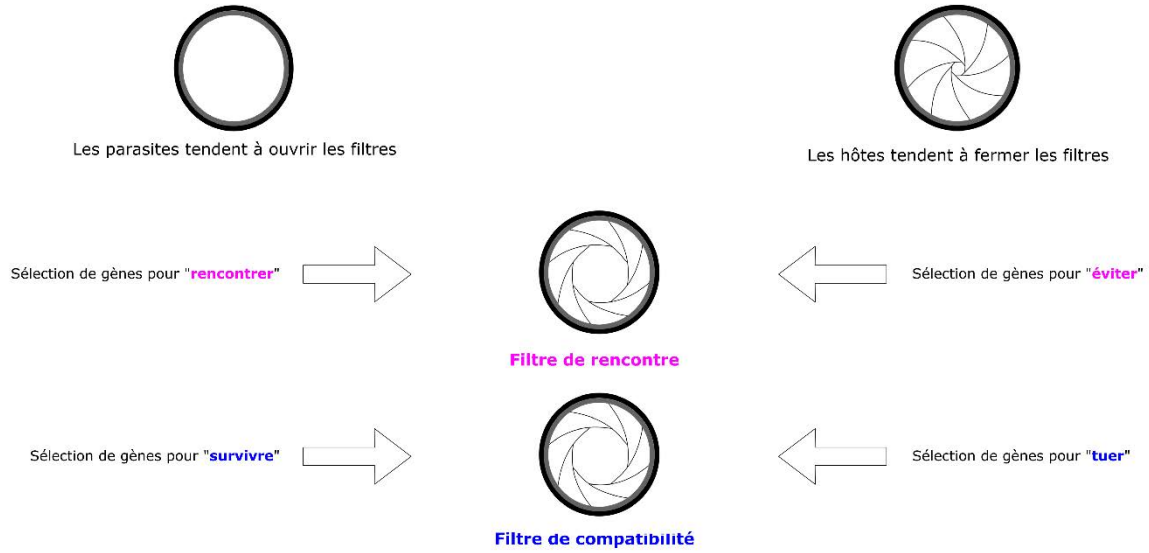


Figure 5 : Filtres de rencontre et de compatbilité. Le parasite possède des gènes capables d'ouvrir ces deux filtres alors que l'hôte possède des gènes qui lui permettent de fermer ces diaphragmes aboutissant à une relation hôte-parasite. D'après Combes, 2005.

Dans ce contexte, le parasite va sélectionner des gènes qui lui permettront de rencontrer son hôte, d'y survivre voire de le modifier afin de pouvoir réaliser son cycle de vie. Un parasite sera capable de modifier le phénotype de son hôte ou son comportement. C'est par exemple le cas de la petite douve *Dicrocoelium dentriticum* qui réalise son cycle chez les ruminants. Elle parasite également les fourmis du genre *Formica* (*F. rufa*, *F. pratensis*, *F. rufibarbis*). Quand la température extérieure est inférieure à 15°C, la fourmi est atteinte de crampes cataleptiques et reste ainsi bloquée à l'apex des feuilles d'herbes, facilitant ainsi leur ingestion par le bétail (Otranto and Traversa, 2002).

A l'inverse, l'hôte sélectionnera alors des gènes qui lui permettront d'éviter de rencontrer le parasite ainsi que des gènes permettant de l'éliminer (Figure 5).

2.3.2. Filtre de rencontre

Afin de se retrouver en contact avec son hôte, le parasite utilisera généralement ses organes sensoriels (odeurs, CO_2), comme c'est le cas pour divers arthropodes piqueurs comme la tique *Amblyomma variegatum* (Steullet and Guerin, 1994) ou bien encore les glossines attirées par l'urine du bétail (Bursell *et al.*, 2009).

Tous les parasites n'ont pas développé de techniques actives de recherche de leur hôte. C'est notamment le cas pour les microparasites qui ont développé des stratégies évolutives différentes. La mise en contact de l'hôte et du parasite est alors effectuée de manière passive via la dissémination de formes de résistance dans le milieu extérieur (spores ou kystes) via les fèces de l'hôte comme cela peut être le cas pour les coccidies du genre *Eimeria* parasites de nombreux vertébrés terrestres ou aquatiques (Doran, 1978, Dyková and Lom, 1981, Lal *et al.*, 2009, Pakandl, 2009).

Enfin, d'autres parasites peuvent utiliser des hôtes intermédiaires qui réaliseront ce contact avec l'hôte définitif. Par exemple, dans la cas du paludisme, le parasite agent causal du paludisme chez l'homme *Plasmodium falciparum* induit chez l'hôte intermédiaire *Anopheles gambiae* une augmentation de la fréquence des piqûres facilitant ainsi sa mise en contact avec son hôte (Koella *et al.*, 1998). C'est également le cas avec *Toxoplasma gondii* qui modifierait le comportement de la souris grise (*Mus musculus*) permettant ainsi sa prédation par l'hôte définitif *Felis cati* (Webster, 2007).

Des mécanismes d'échappement ont été sélectionnés également chez l'hôte pour fermer au maximum ce filtre de rencontre.

2.3.3. Filtre de compatibilité

La variabilité phénotypique[20] sera une des stratégies du parasite pour maintenir le filtre de compatibilité ouvert. En effet, et particulièrement chez les parasites intracellulaires, ceux-ci devront éviter les mécanismes de défense de l'hôte comme l'apoptose des cellules infestées (Kennedy and DeLeo, 2009), l'autophagie, la synthèse d'espèces oxygénées réactives ou encore la dégradation lysosomale (Nathan and Shiloh, 2000). D'autres mécanismes comme les systèmes de reconnaissance Toll Like Receptor doivent aussi être contournés (Kawasaki and Kawai, 2014).

2.4. Résistance et résilience

La résistance et la résilience (également nommée tolérance) permettent de définir l'intensité de la relation hôte-parasite (Råberg *et al.*, 2009). La résistance se définit comme la capacité de l'hôte à limiter le nombre de parasites hébergés ou leur taux de reproduction. Les indices de résistances peuvent consister en une mesure du taux de parasitisme interne ou encore sur les comptages d'œufs de parasites excrétés par gramme de fèces dans le cas d'infestations contrôlées (Stoll, 1929). La résistance est un caractère héritable généralement transmissible aux descendants (Mandonnet *et al.*, 1996). La résilience quant à elle peut se définir comme la « capacité à maintenir sa production, ses paramètres physiologiques, voire même à survivre malgré la pression parasitaire » (Mahieu, 2014). Les mécanismes de tolérance peuvent être affectés par les paramètres environnementaux.

3. Invasions biologiques et pathogènes émergents

3.1. Définitions

Les coûts générés par les problématiques d'invasions biologiques et d'espèces invasives sont désormais au cœur des préoccupations politiques et médiatiques actuelles. Le coût des espèces invasives est estimé annuellement aux USA à 120 milliards de USD annuels (Pimentel *et al.*, 2005). La Figure 6 détaille les coûts directs et indirects générés par les espèces invasives. Pour autant, la définition d'une espèce envahissante est complexe. En effet, les invasions biologiques intéressent des

[20] La variabilité phénotypique est une variation intraspécifique omniprésente dans le monde du vivant. On distinguera la variation phénotypique environnementale (apparition de différents phénotypes dans une population qui ne sont pas le résultat de changements génétiques) de la variation cryptique (les organismes possèdent une variabilité génétique qui ne contribue pas à la variation phénotypique dans des conditions habituelles, mais disposent d'un potentiel leur permettant de modifier les phénotypes dans un contexte environnemental). MAYR, E. 1970. *Populations, species, and evolution: an abridgment of animal species and evolution*, Harvard University Press.

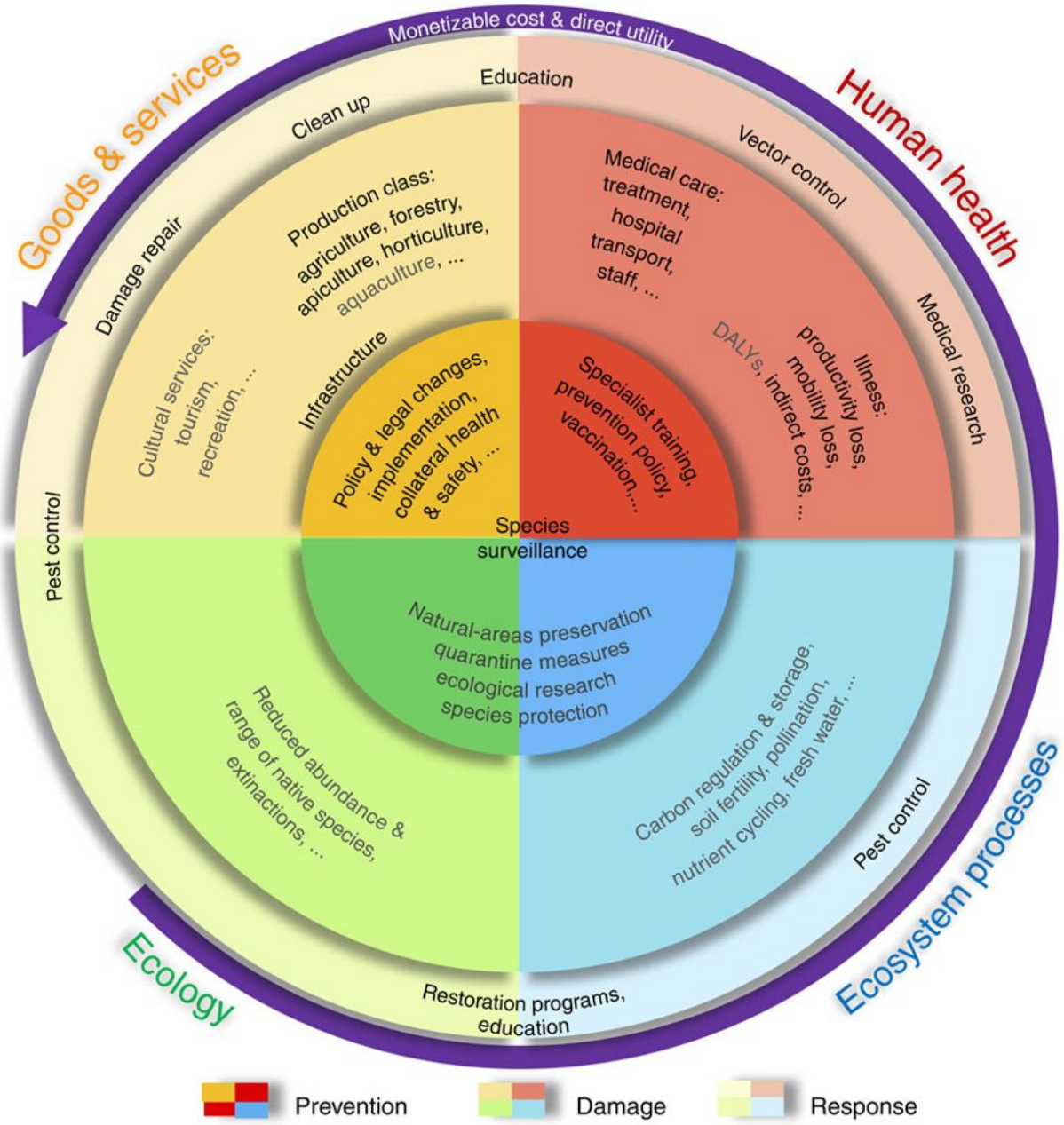


Figure 6 : Classification des impacts dus aux insectes envahissants et cause des coûts générés pour y faire face (coûts de prévention, de dommage ou de réparation, en lisant la figure de manière centrifuge (Bradshaw et al., 2016)

champs disciplinaires aussi divers que l'écologie, l'évolution, la génétique, la biogéographie, la biologie de conservation mais aussi la sociologie, l'éthique ou la politique (Figure 6).

Une espèce envahissante peut être définie comme étant une espèce introduite à partir d'une aire biogéographique distincte de celle étudiée et capable d'avoir une descendance fertile, de se multiplier et de s'étendre géographiquement dans sa nouvelle aire de distribution (Wilson *et al.*, 2009). Ces espèces se multiplient dans le milieu généralement grâce à la disparition de barrières de prolifération (Blackburn *et al.*, 2011). Cette disparition des barrières de prolifération peut permettre à certaines espèces natives de devenir envahissante à la faveur d'une modification du milieu (Nackley *et al.*, 2017).

Une espèce envahissante peut aussi être définie comme une espèce introduite qui connaît une explosion démographique et géographique entraînant des impacts d'ordre écologique, sanitaire et/ou économique (Blackburn *et al.*, 2014). L'impact est particulièrement complexe à définir dans la mesure où il mêle des approches scientifiques, sociologiques, des sensibilités et perceptions individuelles (Simberloff *et al.*, 2013, Tassin and Kull, 2015). L'abeille mellifère (*Apis mellifera*) a été introduite dans de nombreux territoires bien au-delà de son aire biogéographique naturelle. Son impact pollinisateur via les services écosystémiques ou la production apicole (miel entre autres) en font une espèce à très forte valeur économique et culturelle et par conséquent qui n'est pas perçue comme une espèce envahissante par les pays concernés par son introduction malgré des impacts négatifs sur les écosystèmes naturels (Vanbergen *et al.*, 2018). L'abeille (mais c'est aussi le cas avec des bourdons d'origine européenne) rentre en compétition avec les espèces pollinisatrices locales concernant les ressources nutritives mais également en transmettant un certain nombre d'agents pathogènes (Ings *et al.*, 2005, Genersch *et al.*, 2006b, Nagamitsu *et al.*, 2010, Geslin *et al.*, 2017).

Pour conclure, l'IUCN (Union Internationale pour la Conservation de la Nature) définit une espèce envahissante comme des « animaux, plantes ou autres organismes introduits par l'homme dans des milieux distincts et distants de leur distribution initiale, qui s'installent, se dispersent et ont un impact négatif sur l'écosystème et les espèces qui le composent ».

3.2. Les étapes d'une invasion biologique

Le succès d'une invasion biologique va passer par une succession de 3 phases : à la phase d'introduction succèdera la phase d'établissement puis la phase d'expansion à travers le passage de différentes barrières (Figure 7). En moyenne, sur 1000 espèces importées, 100 peuvent être considérées comme introduites, 10 s'installent et perdurent de façon pérenne et une seule sera au

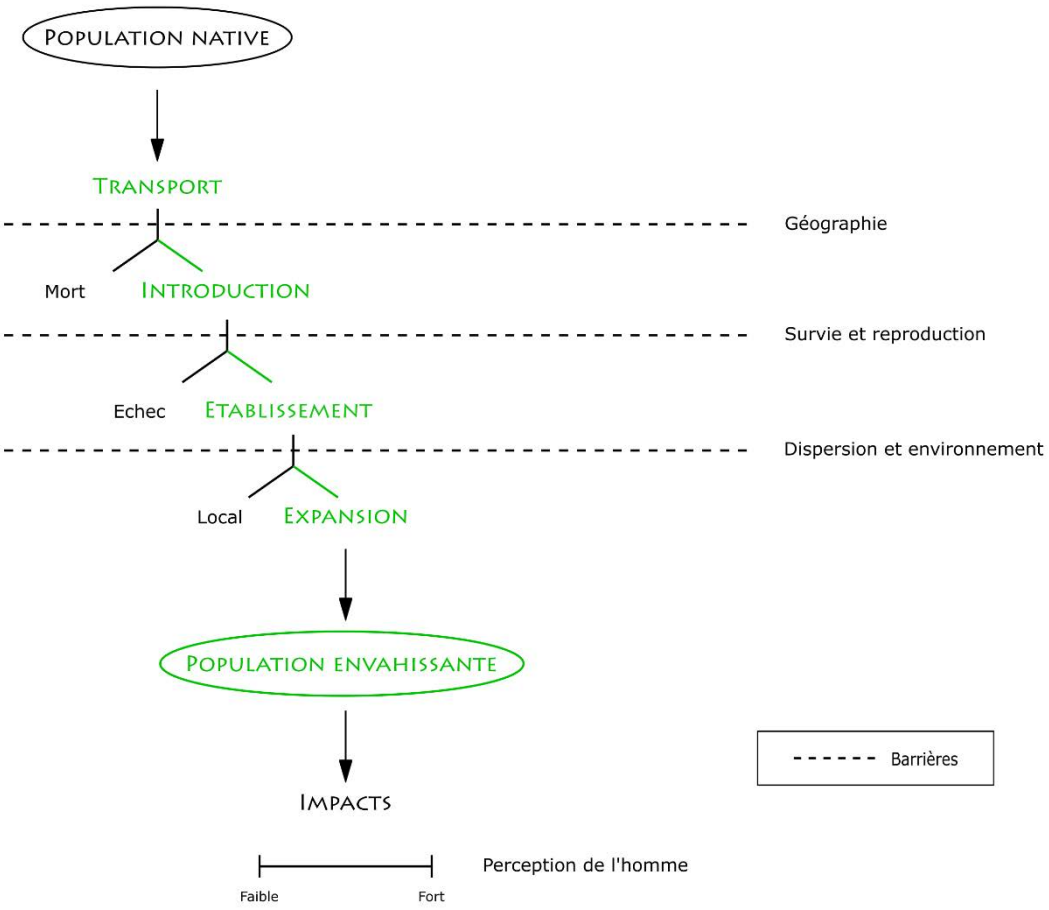


Figure 7 : Représentation du processus d'invasion biologique où les quatre étapes du processus d'invasion sont représentées en vert. Modifié d'après Jacquet, 2015

final envahissante et sera à même de perturber les écosystèmes concernés (Williamson and Fitter, 1996).

Si la dispersion des espèces peut se faire de manière naturelle en continu depuis la limite de leur aire de distribution (Wilson *et al.*, 2009), la dispersion en relation avec les activités humaines serait le principal vecteur d'introduction d'espèces non-natives dans de nouveaux milieux (Lockwood *et al.*, 2013). Ces dispersions à grande échelle peuvent être distinguées en introductions intentionnelles ou accidentelles.

La population nouvellement arrivée doit franchir un certain nombre de barrières écologiques et reproductives pour survivre et s'établir dans son nouvel environnement (Lockwood *et al.*, 2013). C'est la phase d'établissement. Un des éléments déterminant le succès de l'établissement de l'espèce introduite est la pression de propagule. Celle-ci peut être définie par la taille (nombre de propagules[21]) et la composition de l'échantillonnage des organismes introduits (Blackburn *et al.*, 2015). La probabilité d'établissement d'une espèce dans un nouveau milieu est plus importante si elle est fondée par un grand nombre d'individus et si ces individus sont relâchés à plusieurs endroits différents et à plusieurs reprises (Blackburn *et al.*, 2015). Ainsi ils peuvent contrer la dérive génétique[22] et l'effet Allee[23] (Lockwood *et al.*, 2005).

Pour s'établir, l'espèce doit parvenir à survivre aux conditions abiotiques et biotiques de son nouvel environnement. Des environnements éloignés géographiquement peuvent présenter des conditions environnementales similaires. C'est pourquoi certaines espèces peuvent être préadaptées à des milieux auxquels elles n'ont géographiquement pas accès (Facon *et al.*, 2006). Le succès de l'établissement peut aussi dépendre d'autres effets comme le relâchement de la pression de bioagresseurs permettant ainsi à l'espèce de transférer les ressources de défense au bénéfice de capacités compétitrices (Keane and Crawley, 2002). La plasticité phénotypique peut également aider à surmonter les nouvelles conditions environnementales (Knop and Reusser, 2012).

Une fois l'espèce établie avec succès dans un nouveau milieu, elle peut ensuite proliférer, se disperser géographiquement et établir à nouveau d'autres populations viables dans d'autres nouveaux milieux.

[21] La propagule est une structure de propagation et de reproduction. En fonction des domaines de la biologie elle ne prend pas les mêmes significations. En épidémiologie et en écologie il s'agira respectivement d'agents pathogènes ou d'espèces invasives.
[22] Variation aléatoire d'une génération à l'autre des fréquences alléliques dans une population.
[23] Diminution de la valeur sélective (définie ici comme le nombre moyen des descendants laissés à la génération suivante par un individu) d'un individu ou du taux de croissance d'une population suite à une réduction d'effectif ou de densité

Dans le cas d'un environnement très hétérogène, l'espèce doit s'adapter aux différents milieux rencontrés. Lors de l'étape de prolifération, les individus vont se multiplier et peuvent ensuite se disperser et constituer de nouvelles populations dans de nouveaux milieux.

3.3. Maladies et pathogènes émergents

Les maladies émergentes peuvent être définies comme des infections nouvellement apparues dans une population donnée ou déjà existantes mais dont l'incidence ou la répartition géographique a rapidement augmenté (Morse, 2001). Les agents étiologiques[24] de ces maladies émergentes peuvent être des agents infectieux inconnus mais aussi des agents infectieux connus dont les caractéristiques ont évolué (hôte cible, distribution géographique, virulence…).

Treize facteurs contribuent à l'émergence des maladies infectieuses (Morens *et al.*, 2008). Ils se répartissent en trois grandes catégories : celles liées à l'homme (trafic international de personnes ou de marchandises favorisant l'introduction d'agents infectieux, de réservoirs ou de vecteurs), à l'agent infectieux (antibiorésistance, évolution génétique des virus à ARN qui représentent 84.5% des virus émergents (Woolhouse *et al.*, 2012)) ou à l'environnement (réchauffement climatique, déforestation…). Dans ce contexte global d'invasions biologiques, un certain nombre de maladies émergentes liées à des agents infectieux émergents peuvent être abordées comme des espèces invasives.

Chez l'abeille mellifère, plusieurs agents pathogènes peuvent être considérés comme émergents. C'est le cas de l'ectoparasite *Varroa destructor* ou bien encore une microsporidie *N. ceranae*, qui tout comme le varroa, est d'origine asiatique. Ces parasites, initialement parasites de l'abeille asiatique *Apis cerana*, se sont adaptés à un nouvel hôte (*A. mellifera*) et se sont répandus au sein des populations d'abeilles mellifères. La biologie et l'impact sanitaire de ces agents pathogènes émergents seront détaillés aux chapitres 4.3.3 et 4.5.3

[24] L'étiologie est l'étude des causes et des facteurs des maladies. Un agent étiologique sera donc à la cause d'une maladie.

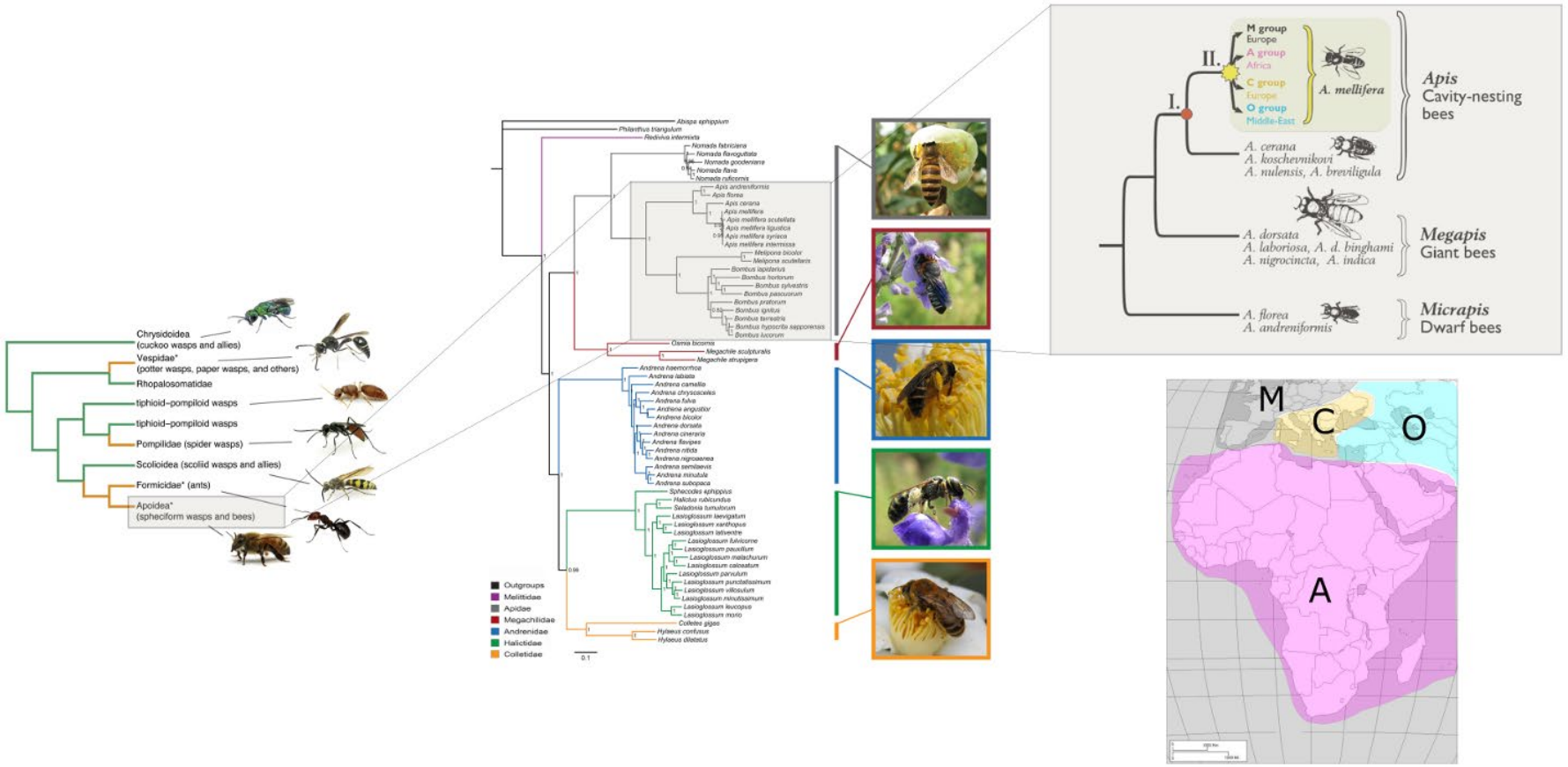


Figure 8 : Phylogénie d'*Apis mellifera* d'après Han et al., 2012 & Johnson et al., 2013

4. L'abeille et sa pathosphère

4.1.L'abeille mellifère

L'abeille mellifère *Apis mellifera* est une espèce pollinisatrice qui se retrouve sur tous les continents, à l'exception de l'Antarctique (Mortensen *et al.*, 2013). L'abeille mellifère a été domestiquée très tôt (ANNEXE 4), mais elle existe aussi à l'état sauvage où elle fait partie intégrante de ses écosystèmes d'origine (Afrique, Europe, partie occidentale de l'Asie) (Ruttner, 1988).

4.1.1. Classification

L'abeille mellifère appartient à l'ordre des Hyménoptères. Après l'ordre des coléoptères, c'est le second ordre le plus diversifié chez les insectes.

Les abeilles seraient apparues au crétacé entre -140 et -110 millions d'années et leur radiation coïnciderait avec la diversification des angiospermes (Danforth *et al.*, 2006, Danforth *et al.*, 2013). Ces deux groupes ont co-évolué où en échange de ressources alimentaires, l'abeille participe à la reproduction des angiospermes (Michener, 2000).

La super-famille des Apoidea à laquelle appartient *Apis mellifera* est proche du groupe des fourmis (Johnson *et al.*, 2013). La famille des Apidae contient plus de 5700 abeilles et le genre *Apis* se retrouve au sein de la tribu des Apini. Le genre *Apis* comporte 11 espèces et se subdivise en 3 sous-groupes :

- *Micrapis* (abeilles naines) : *Apis florea*, *A. adreniformis*
- *Megapis* (abeilles géantes) : *A. dorsata*, *A. laboriosa*, *A. nigrocincta* et *A. indica*
- *Apis* (abeilles nichant dans des cavités) : *A. mellifera*, *A. cerana*, *A. koschevnikovi*, *A. nulensis* et *A. breviligula*

Il existe 4 grandes lignées évolutives au sein de l'espèce *A. mellifera* (Ruttner, 1988, Garnery *et al.*, 1992). La lignée A comporte les abeilles mellifères africaines, la lignée O les abeilles orientales et les abeilles européennes sont regroupées au sein des lignées M et C. Il existerait un sous-groupe (Z) affilié à la lignée A (abeilles de la péninsule arabique et du Moyen-Orient) mais son existence est soumise à controverse (Alburaki *et al.*, 2011, Alburaki *et al.*, 2013) (Figure 8).

Tableau 1 : Liste des différentes sous-espèces d'*Apis mellifera* en fonction des zones géographiques d'après Techer, 2015

	Descripteur	Morphologie	ADNmt
Afrique tropicale			
A. m. andansonii	(Latreille, 1804)	A	A
A. m. capensis	(Eschscholtz, 1822)	A	A
A. m. jemenitica	(Ruttner, 1976)	A	A/Y/Z
A. m. lamarckii	(Cockerell, 1906)	A	Z
A. m. litorea	(Smith, 1961)	A	A
A. m. monticola	(Smith, 1961)	A	A
A. m. scutellata	(Lepeletier de Saint Fargeau, 1836)	A	A
A. m. unicolor	(Latreille, 1804)	A	A
Afrique du Nord-Est			
A. m. intermissa	(Maa, 1953)	M	A
A. m. saharensis	(Baldensperger, 1932)	M/A	A
A. m. sinensis	(Meixner *et al.*, 2011)	A	A/Y
Ouest de la Méditerranée			
A. m. iberiensis	(Skorikov, 1929 ; renommée par Engel 1999)	M	M/A
A. m. mellifera	(Linnaeus, 1758)	M	M
Méditerranée centrale – Europe du Sud-Ouest			
A. m. carnica	(Pollmann, 1879)	C	C
A. m. carpatica	(Foti *et al.*, 1965)	-	-
A. m. cecropia	(Kiesenwetter, 1860)	C	C
A. m. ligustica	(Spinola, 1806)	C	C/M
A. m. macedonica	(Ruttner, 1988)	C	C
A. m. ruttneri	(Sheppard *et al.*, 1997)	M/A	A
A. m. siciliana	Grassi, 1881)	C/A	A

4.1.2. Les différentes sous-espèces d'*Apis mellifera*

Dans sa zone d'origine, *Apis mellifera* a colonisé une très grande diversité de niches écologiques. *A. mellifera* se retrouve dans des écosystèmes aussi divers que la toundra (Toullec, 2008), les forêts tropicales africaines(Fletcher, 1978), les hauts sommets éthiopien (Meixner *et al.*, 2011), des îles océaniques tempérées (Rúa *et al.*, 2006, Carreck, 2008) ou tropicales (Franck *et al.*, 2001, Rasolofoarivao *et al.*, 2015a), etc.

Les alternances de glaciations et de périodes de réchauffement climatique ont isolé certaines populations. Sur la base de critères morphologiques, géographiques et comportementaux, ce sont 28 sous-espèces d'abeilles mellifères qui sont désormais connues (Ruttner, 1988, Engel, 1999, Sheppard and Meixner, 2003, Ilyasov *et al.*, 2011, Meixner *et al.*, 2011).

A. m. unicolor (Latreille, 1804) est indigène des îles du Sud-Ouest de l'Océan Indien (Techer *et al.*, 2017a) exception faite de Rodrigues où la sous-espèce présente est *A. m. ligustica*.

4.1.3. Biologie de l'abeille

L'abeille mellifère est un insecte eusocial qui vit en société de 20 000 à plus de 80 000 individus qui travaillent ensemble. La colonie est organisée autour d'un nid fonctionnel où la température est stable entre 32 et 36°C et qui est composé de milliers de cellules hexagonales.

Les insectes eusociaux présentent trois caractéristiques fondamentales (Michener, 1969) :

- Les individus de la même colonie coopèrent dans l'élevage des jeunes
- Il existe une division du travail au niveau de la reproduction, avec plus ou moins d'individus stériles travaillant au bénéfice d'individus reproducteurs
- Ces individus présentent un chevauchement d'au moins deux générations capables de contribuer au travail de la colonie

La biologie de l'abeille est particulièrement bien connue pour les sous-espèces européennes mais les traits de vie, même si ils devraient être similaires sont beaucoup moins étudiés chez les sous-espèces africaines.

(Tableau 1, suite)

Moyen-Orient			
A. m. adami	(Ruttner, 1975)	C/O	C
A. m. anatoliaca	(Maa, 1953)	O	C/Z
A. m. caucasia	(Pollmann, 1889)	O	C
A. m. cypria	(Pollmann, 1879)	C	C/Z
A. m. meda	(Skorikov, 1929)	O	Z
A. m. remipes	(Gerstäcker, 1862)	O	-
A. m. syriaca	(Skorikov, 1929)	A/O	Z
Asie centrale			
A. m. pomonella	(Sheppard et Meixner, 2003)	O	C/Z

Figure 9 : Illustrations des trois castes d'abeilles mellifères. La reine (à gauche) est reconnaissable à la longueur caractéristique de son abdomen ; le mâle ou faux-bourdon (au centre) est reconnaissable à la taille de ses yeux et à son aspect trapu ; l'ouvrière (à droite)

4.1.4. Les castes d'abeilles

Au sein de la colonie il existe trois castes d'abeilles : la reine, les faux-bourdons et les ouvrières (Jean-Prost and Le Conte, 2005).

- La reine :

La reine est accompagnée d'une cour d'ouvrières qui lui prodiguent les soins nécessaires. Elle assure la ponte des œufs et ainsi le renouvellement permanent des ouvrières. La reine peut pondre jusqu'à 2000 œufs par jour. Enfin, elle permet la cohésion de la colonie en régulant la physiologie et le comportement des ouvrières par le biais de différentes phéromones. La reine se distingue des autres abeilles de la colonie par une taille plus grande et un abdomen imposant (Figure 9).

- Les faux-bourdons :

Les faux-bourdons fécondent la reine. Incapables de se nourrir, ils rentrent dans n'importe quelle colonie. Ce sont d'excellents vecteurs d'agents pathogènes. On les reconnaît à leur taille imposante avec un thorax aux muscles alaires très développés et à leurs yeux énormes (Figure 9).

- Les ouvrières :

Les ouvrières effectuent toutes les tâches nécessaires au bon f onctionnement du nid allant de la synthèse de la cire pour bâtir les cellules, au gardiennage ou bien encore au butinage. Au fil de son développement, l'ouvrière se spécialise dans une tâche. En fonction des besoins (miellée par exemple), la population d'ouvrières s'adapte à ces nouvelles contraintes.

4.1.5. Cycle de vie

Les abeilles européennes présentent la particularité d'avoir un cycle qui se déroule de la fin de l'hiver à l'automne avec une période plus ou moins longue sans couvain. Sous les tropiques, il n'y a pas d'arrêt de ponte de la reine.

Le cycle de développement de la reine est de 16 jours pour les abeilles européennes, 24 jours pour les mâles et 21 jours chez les ouvrières. Chez *Apis mellifera capensis*, le cycle des ouvrières se déroule en 20 jours au lieu de 21 jours pour les sous-espèces européennes (Moritz and Hänel, 1984).

Lors de l'essaimage, la taille de la colonie augmente. Le couvain augmente fortement et ainsi le nombre d'ouvrières. Cette surpopulation entraîne une baisse de la diffusion des signaux chimiques et les ouvrières vont construire des cellules royales. Pendant la croissance de ces nouvelles reines, la reine va réduire la taille de son abdomen et diminuer sa ponte. Avant l'émergence des nouvelles reines, la

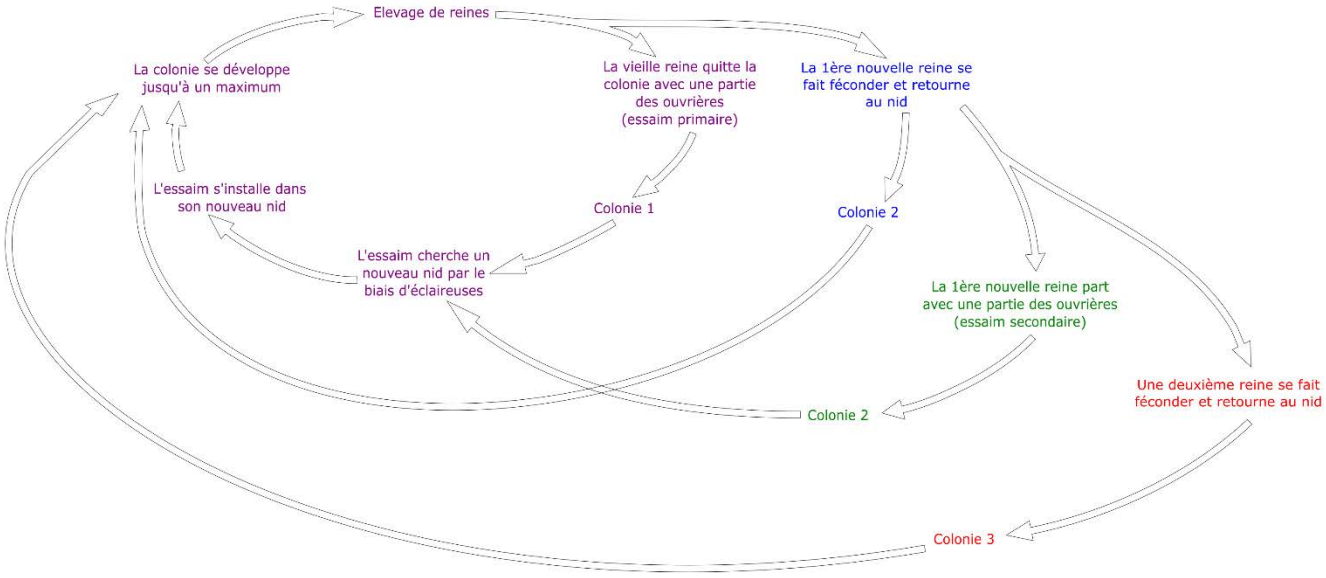


Figure 10 : Cycle de développement de la colonie d'*Apis mellifera*

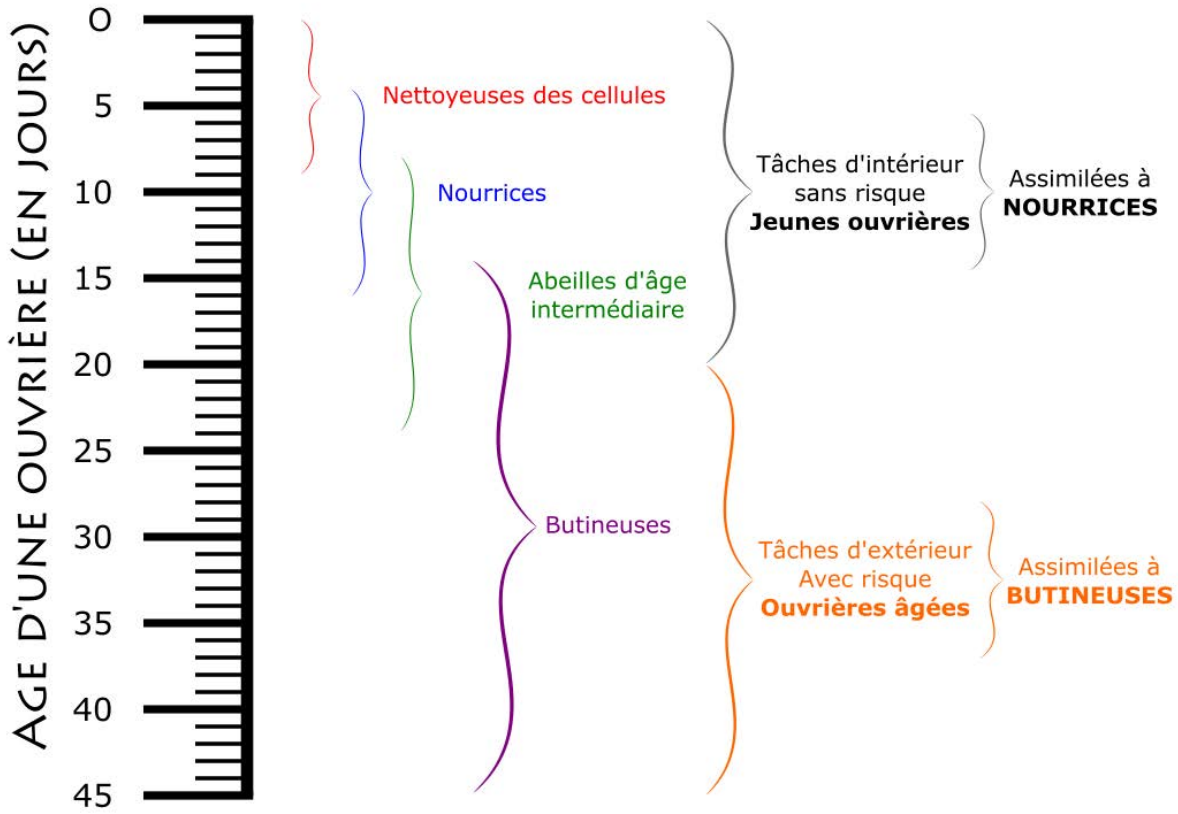


Figure 11 : Polyéthisme lié à l'âge chez l'abeille domestique. D'après Michener, 1974 (repris de A. Maisonasse , 2010)

- « vieille » reine va quitter la colonie avec une partie des abeilles. Elle essaime pour former une nouvelle colonie. En fonction de la force de la colonie, des essaims secondaires seront alors formés. Le cycle est résumé sur la Figure 10. La reine, lors du vol nuptial, se fait féconder par plusieurs mâles (polyandrie). Les congrégations de mâles peuvent alors transmettre un certain nombre d'agents pathogènes et notamment le parasite *V. destructor* (Mortensen *et al.*, 2018). A La Réunion, les reines locales se font féconder en moyenne par 19 mâles ± 4 individus avec un minimum observé de 11 mâles et un maximum de 25 (Techer and Sadeyen, 2011).

4.1.6. Le polyéthisme temporel ou lié à l'âge

Théoriquement, les ouvrières sont capables d'assurer toutes les tâches de la colonie. On distinguera quatre classes comportementales d'abeilles qui peuvent se chevaucher (Figure 11) :

- Les abeilles nettoyeuses de cellule :

Les jeunes abeilles immatures de moins de trois jours ne peuvent ni voler ni piquer. Elles vont terminer leur maturation et vont participer au nettoyage des cellules. Le reste du temps elles sont inactives ou se toilettent (Seeley, 1982).

- Les nourrices :

Le stade de nourrice dure de 4 à 12 jours (Seeley, 1982). Les nourrices vont s'occuper du couvain notamment en le nourrissant avec de la gelée royale ou nourricière. Elles nourrissent également les jeunes abeilles et s'occupent de la reine. Elles jouent donc un rôle essentiel dans la colonie. Ces gelées sont les produits de sécrétion des glandes mandibulaires et hypopharyngiennes.

- Les abeilles d'âge intermédiaire :

Les abeilles d'âge intermédiaire s'occupent de tâches à l'intérieur du nid entre 12 et 21 jours d'âge (Seeley, 1982). Bien qu'elles occupent le même espace physique que les nourrices, elles ne s'occupent plus du tout du couvain (Johnson, 2008) et effectuent jusqu'à une quinzaine de tâches dans le nid. Ces tâches sont extrêmement variées, allant de tâches de construction du nid (abeilles cirières), au traitement du nectar ou bien encore la défense du nid. Au fil du temps, ces abeilles effectuent des tâches les rapprochant de plus en plus de l'entrée du nid et deviendront alors des butineuses (Seeley, 2009).

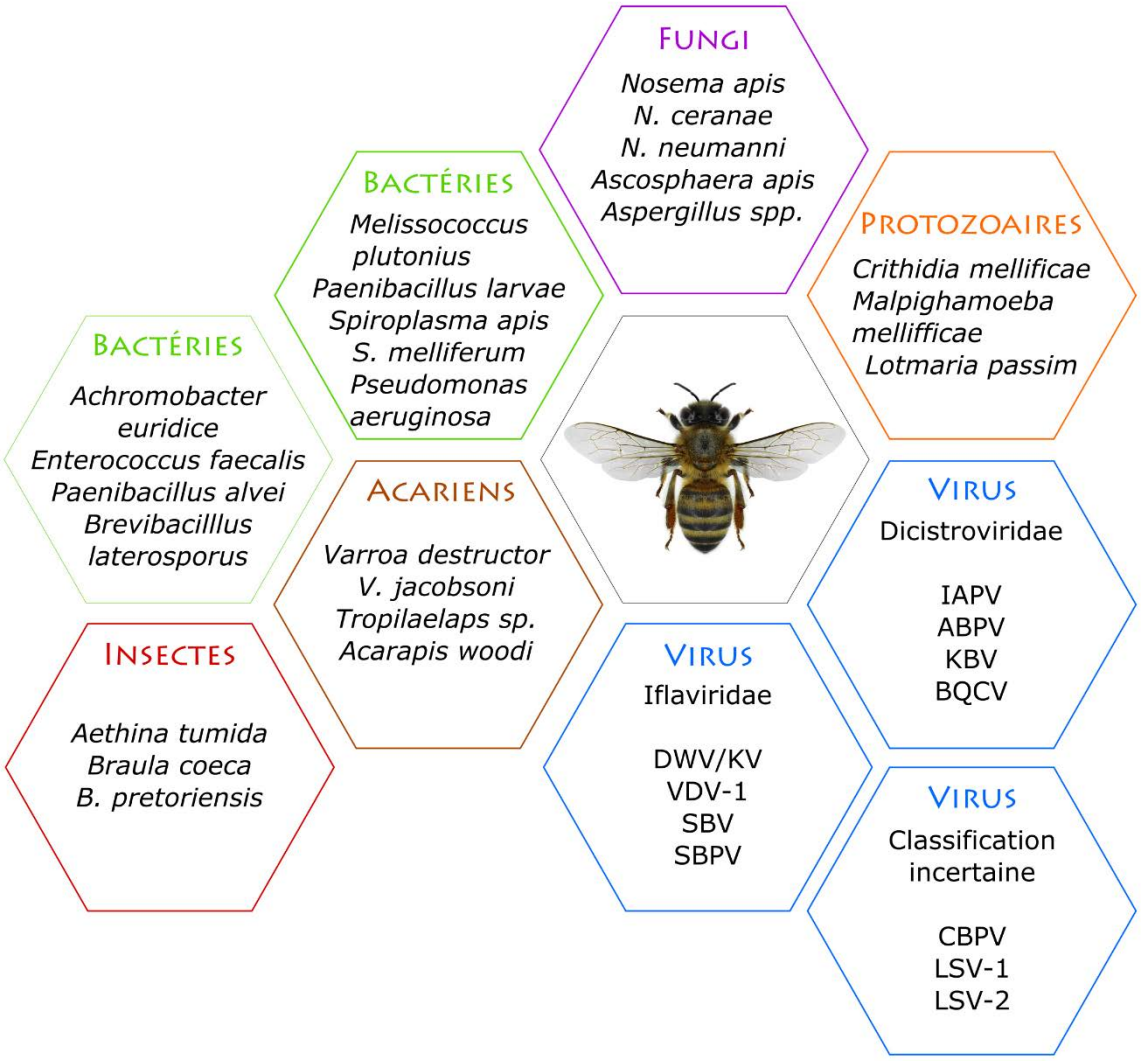


Figure 12 : Représentation de la pathosphère de l'abeille mellifère – inspiré de Evans and Schwarz, 2011

- Les butineuses :

Une fois cette transition passée, ces abeilles assureront la collecte des besoins vitaux pour la colonie en allant collecter du nectar, du pollen, de l'eau ou encore des gommes pour synthétiser la propolis. Certaines abeilles peuvent se spécialiser dans la collecte de pollen et de nectar (Ament *et al.*, 2010) mais en cas de stress thermique la collecte d'eau peut être intensive (Seeley, 2009).

Certains agents pathogènes peuvent dérégler ce polyéthisme temporel notamment en augmentant la mortalité des butineuses et ainsi accélérant le passage des jeunes abeilles des tâches intérieures vers les tâches extérieures. C'est le cas notamment pour *Nosema ceranae* (Bahreini and Currie, 2015), *Acarapis woodi* (Fernández, 1999) ou bien encore *Varroa destructor* (Rosenkranz *et al.*, 2010).

4.2. La pathosphère de l'abeille mellifère

La pathosphère de l'abeille mellifère peut être définie comme tous les dangers biologiques pouvant affecter la santé de l'abeille et des colonies. Ces dangers sont très variés et sont aussi bien des bactéries, des protozoaires, des champignons, des arthropodes ou bien encore des virus (Figure 12).

4.3. Varroa destructor

Varroa destructor (Anderson and Trueman, 2000) est un acarien ectoparasite des abeilles *Apis mellifera* et *A. cerana*. Au milieu du XXème siècle, *V. destructor* s'est adapté à *A. mellifera* non indigène du Sud-Est asiatique. Depuis, il ne cesse de conquérir de nouveaux territoires via le commerce d'abeilles. C'est le principal danger sanitaire des abeilles mellifères (Le Conte *et al.*, 2010, van der Zee *et al.*, 2015, Molineri *et al.*, 2018).

4.3.1. Systématique

Le genre *Varroa* appartient à la sous-famille des Varroinae, famille des Varroidae, super-famille des Dermanyssoidea, sous-cohorte des Dermanyssiae, cohorte des Gamasina, appartenant au sous-ordre des Dermanyssina, à l'ordre de Mesostigmata (ou Gamasida), au super-ordre des Parasitiformes (ou Anactinotrichida) à la sous-classe des Acari, classe Arachnida, appartenant au sous-embranchement des Chelicerata appartenant lui-même à l'embranchement des Arthropoda.

Au sein du genre *Varroa* quatre espèces sont clairement identifiées (Figure 13) :

- *V. underwoodi*, parasite d'*A. cerana* au Népal (Delfinado-Baker and Aggarwal, 1987)

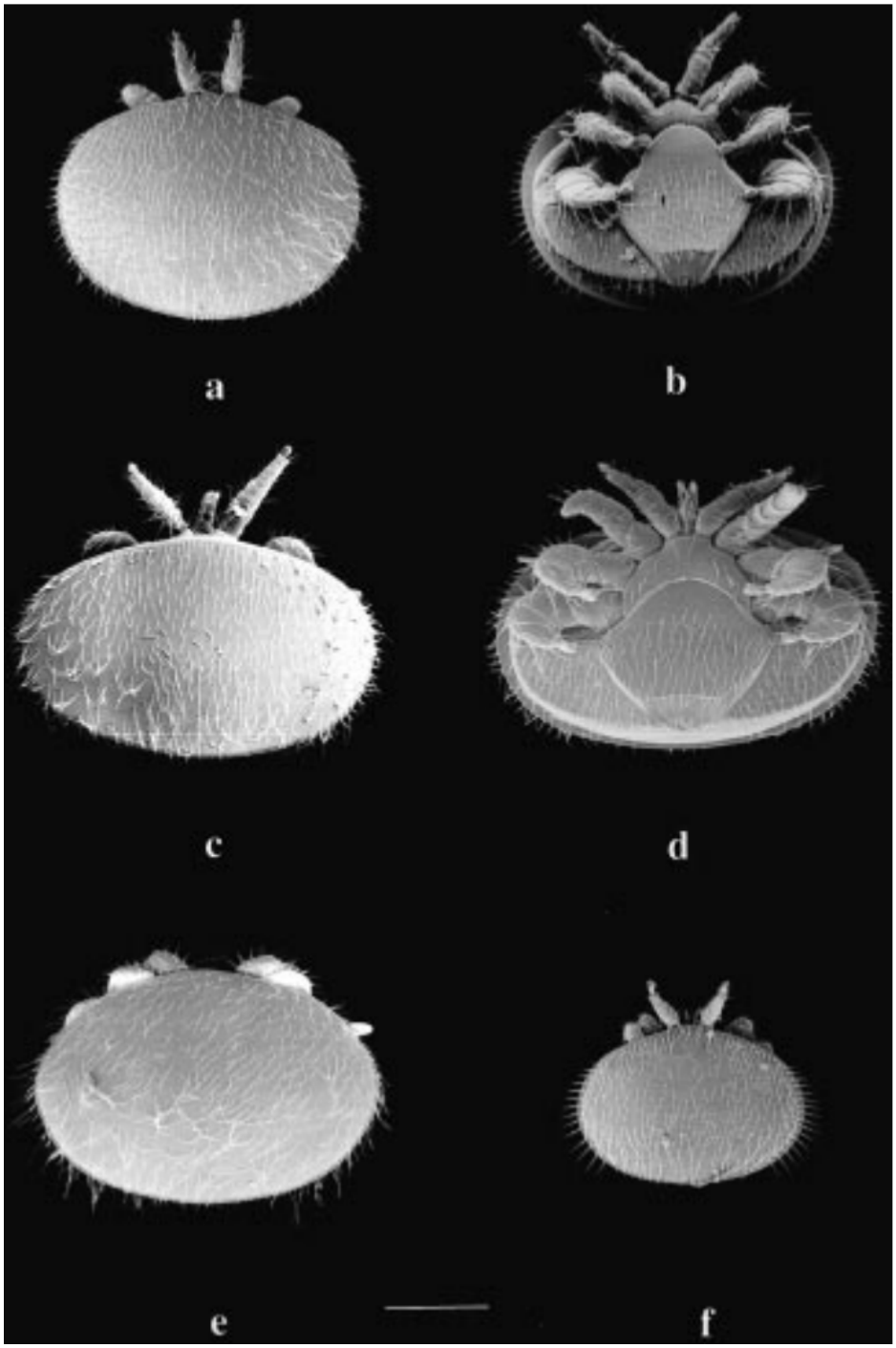


Figure 13 : Faces dorsale et ventrale de femelles adultes en microscopie électronique de (a) et (b) *V. jacobsoni* (haplotype de Java), (c) et (d) *V. destructor* (haplotype K), (e) *V. rindereri* et (f) *V. underwoodi* La taille de l'échelle est de 500 µm. Illustration tirée de Anderson and Trueman, 2000

- V. *rinderi*, parasite d'*A. koschevnikovi* à Bornéo (de Guzman and Delfinado-Baker, 1996)
- *V. jacobsoni*, parasite d'*A. cerana* et *A. mellifera* (Oudemans, 1904)
- *V. destructor*, parasite d'*A. cerana* et *A. mellifera* (Anderson and Trueman, 2000)

Pour autant, les séquençages d'ADN mitochondriaux réalisés par Anderson et Truman ont montré l'existence de plusieurs haplotypes basés sur des analyses du génome mitochondrial (15 218 pb) au sein du complexe *V. jacobsoni*/*V. destructor* dont certains n'ont pas pu être classés (Figure 14). Deux haplotypes majoritaires de *V. destructor* ont été identifés chez l'abeille mellifère : une souche J (haplotypes japonais/thaïlandais) et une souche K (coréenne) qui est la plus répandue à l'échelle mondiale et particulièrement en Europe (Anderson and Trueman, 2000). Depuis de nouvelles souches appartenant aux « groupes » J (J 1-5 et J 1-6) et K (K 1-2 et K 1-4) ont été identifiés chez *A. cerana* et seraient susceptibles de parasiter *A. mellifera* (Navajas *et al.*, 2010).

Les acariens du genre Varroa sont visibles à l'œil nu de forme semblable c'est-à-dire elliposïdale et déprimée dorso-ventralement (Figure 15). La largeur du corps de la femelle adulte de *V. destructor* mesure 1708.9 µm (± 41.2 µm) et la longueur de 1167.3 µm (± 26.8 µm).

4.3.2. Cycle de vie

Le cycle de vie de *V. destructor* se décompose en deux phases : une phase de dispersion et une phase de reproduction.

La phase de dispersion est appelée à tort phase phorétique[25] puisque les femelles varroa parasitent les abeilles adultes(Ramsey *et al.*, 2018). Pour autant le terme de « varroa phorétique » est utilisé de manière importante en apiculture ou médecine vétérinaire. Le taux de « varroas phorétiques » qui désigne le nombre de « varroas phorétiques » pour 100 abeilles devrait être renommé dans les années qui viennent.

La reproduction est de type haplo-diploïde et se déroule dans le couvain operculé (Figure 16). La femelle varroa entre dans la cellule de couvain 15h avant son operculation (soit environ 8 jours après la pose de l'œuf par la reine), sur la base de signaux olfactifs (Frey *et al.*, 2013). Varroa préfère les cellules de faux-bourdons pour se reproduire (Calderone and Kuenen, 2001, Calderone and Lin, 2001) . Un premier œuf haploïde (n=7) est pondu 60 à 70 heures après operculation de l'alvéole.

[25] La phorésie fait partie des grandes interactions entre organismes. Dans ce cas, l'hôte assure le transport seul (généralement temporaire) du phoronte. Les sources de nourriture des deux organismes sont généralement indépendantes. La phorésie exclut le parasitisme de fait, sinon le phoronte est considéré comme un ectoparasite.

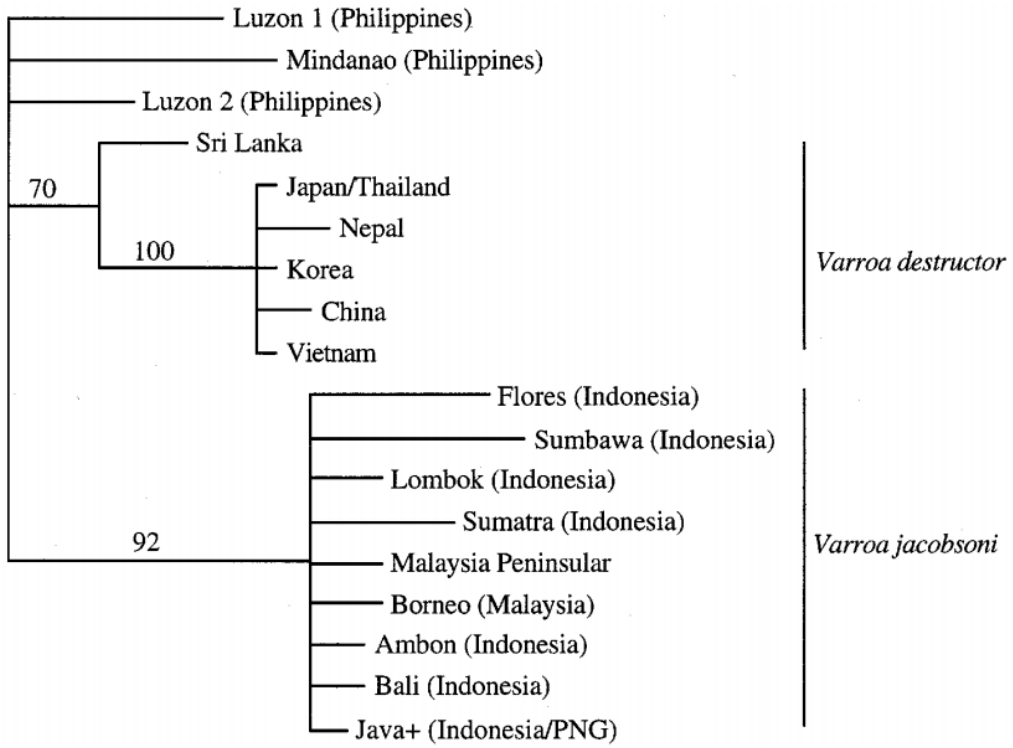


Figure 14 : Phylogénie de différentes espèces du genre *Varroa* en fonction des localités identifiées (Anderson and Trueman, 2000)

Figure 15 : Femelle *V. destructor* sur nymphe d'*A. mellifera unicolor*. L'appareil piqueur (gnathosome) est bien distinct. Photo Antoine Franck – CIRAD

L'œuf est blanc, ovoïde et de petite taille (230 µm × 300 µm). Ensuite la femelle varroa pondra des œufs environ toutes les 30 heures : entre 26 et 32h à une température de 34-35°C. La femelle varroa pond généralement 5 œufs, 6 rarement et 7 exceptionnellement et elle possède un potentiel de ponte de 18 à 30 œufs (Rosenkranz *et al.*, 2010).

Le temps de développement depuis l'œuf jusqu'à l'adulte en passant par les deux stades larvaires (proto puis deutonymphe) est compris entre 5.8 et 6.6 jours (Donzé and Guerin, 1994).

La femelle fondatrice varroa présente un comportement de soin parental en créant une zone de nourrissage (perforation du tégument) situé sur le cinquième segment de la nymphe d'abeille puisque ni les larves ni le mâle ne sont capables de percer la cuticule de la nymphe (Donzé and Guerin, 1994).

Les varroas adultes sont matures sexuellement aussitôt après leur dernière mue (Donzé *et al.*, 1996). La reproduction est initiée par les phéromones produites par la jeune femelle et il faudrait quatre accouplements complets pour le transfert du nombre de spermatozoïdes adéquats (Donzé *et al.*, 1996, Ziegelmann *et al.*, 2008). Quand la jeune abeille émerge de de sa cellule de couvain, les femelles adultes, immatures et le mâle adulte quitte l'alvéole. Seules les femelles matures survivront.

Différents modèles de dynamique des populations ont été proposés et quand le couvain est présent de manière permanente comme c'est le cas avec *Apis mellifera unicolor* la population est multipliée par 800 annuellement (Martin, 1998).

4.3.3. Origine et dispersion

V. destructor était à l'origine le parasite de l'abeille asiatique *A. cerana* à qui il ne causait pas de problèmes sanitaires particuliers, se multipliant quasi uniquement dans le couvain de mâles.

V. destructor a changé d'hôtes en passant d'*A. cerana* à *A. mellifera* au milieu des années 1950 (Akratanakul and Burgett, 1975). Depuis lors, il se répand partout sur la planète (Figure 17) et désormais, très peu de territoires sont indemnes du parasite (Wilfert *et al.*, 2016).

4.3.4. Varroose et impact sanitaire de *V. destructor*

La varroose est la maladie induite par la présence de *V. destructor* dans la colonie. Le couvain et les abeilles adultes sont affectés. L'étiologie de la maladie est complexe mais peut être abordée de manière distincte : l'impact direct de varroa sur l'abeille et le cortège d'agents pathogènes associés transmis par le parasite :

→ Action spoliatrice

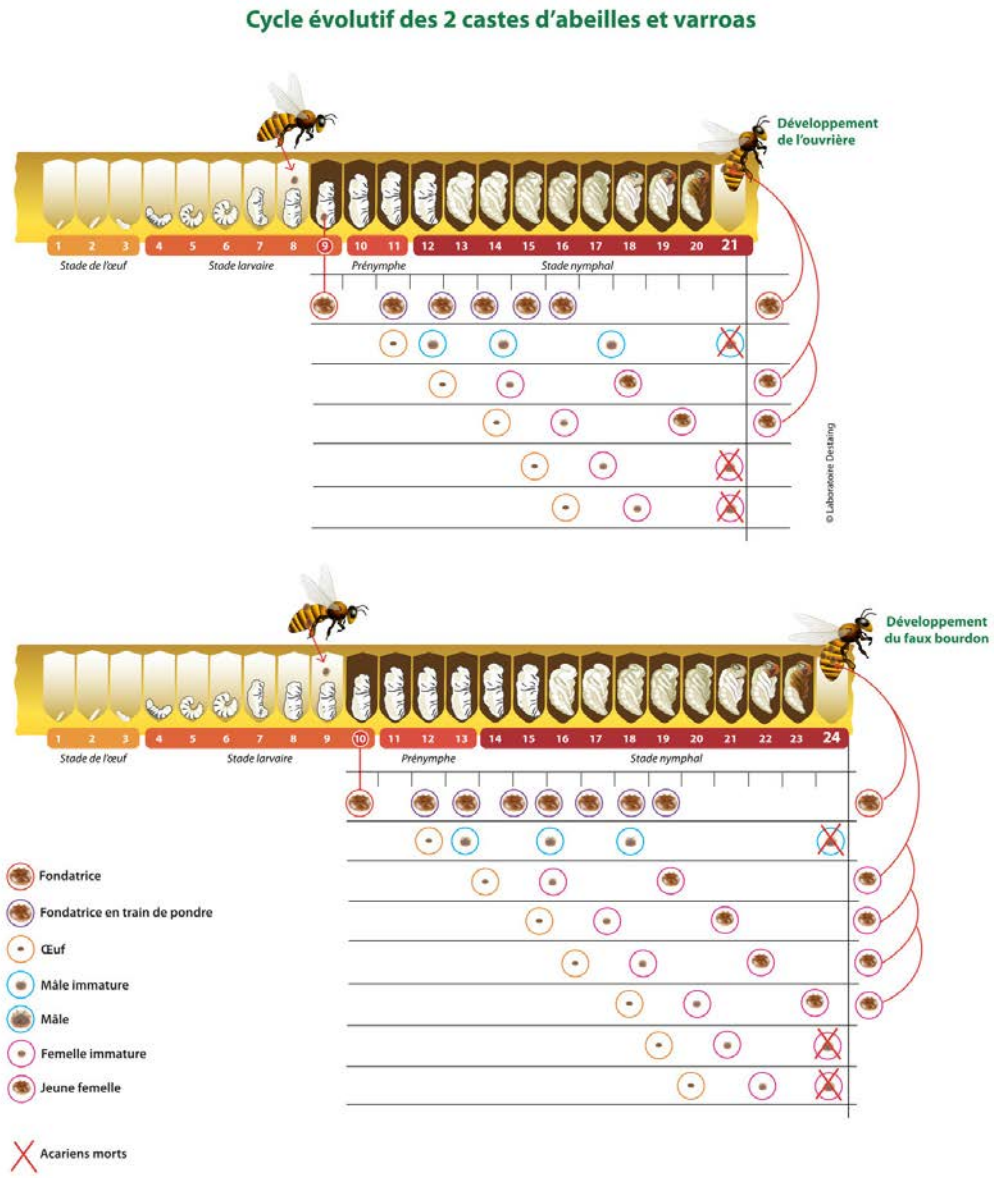


Figure 16 : Cycle de développement de *Varroa destructor* dans le couvain d'ouvrière et de faux-bourdon (source : http://varroa.fr/)

Des travaux récents ont montré que *V. destructor* se nourrissait des corps gras de l'abeille adulte et des larves au lieu de l'hémolymphe (Ramsey *et al.*, 2018) comme c'était auparavant communément admis (Rosenkranz *et al.*, 2010). Pour autant, l'action spoliatrice au niveau de l'hémolymphe prélevée par le parasite est estimée entre 0.25 à 0.67 µl. De plus, la richesse en protéines est fortement diminuée de 27 à 50% (Rosenkranz *et al.*, 2010, Vidal-Naquet, 2015).

→ Effets sur le poids de l'abeille

Les abeilles émergentes parasitées seront plus légères (de 7 à 18%) que des abeilles non parasitées. La perte de poids dépend du nombre de femelles fondatrices présentes dans la cellule de couvain.

→ Réduction de la durée de vie et de certaines capacités organiques des abeilles

Plus le taux d'infestation augmente, plus la durée de vie des abeilles parasitées diminue et peut atteindre plus de 50% (Ritter, 1981). Les glandes hypopharyngiennes (qui servent en autres à la synthèse de la gelée nourricière pour le couvain) sont réduites de 14.6% en cas d'infestation nymphale ou chez l'abeille adulte (Schneider and Drescher, 1987). La qualité des spermatozoïdes produits par les faux-bourdons est grandement affectée, même si l'hypothèse la plus probable réside dans le fait que ça soit lié à la perte de poids pendant le parasitisme dans le couvain. Enfin des troubles nerveux liés à une altération des fonctions cérébrales de l'abeille peuvent également être associés. Le comportement de butinage est modifié et les ouvrières disséminent alors le parasite (Kralj and Fuchs, 2006, Kralj *et al.*, 2007).

→ Immunosuppression

L'importance des peptides antimicrobiens et des enzymes de l'immunité est affectée par la baisse globale de la richesse en protéine de l'hémolymphe. De la même manière, les abeilles parasitées présentent des concentrations d'hémocytes plus faibles que celles non parasitées générant alors une plus grande sensibilité aux agents pathogènes (Amdam *et al.*, 2004, Belaid and Doumandji, 2010).

→ Agents pathogènes associés

Varroa est capable de transmettre un certain nombre de champignons dont certains sont pathogènes pour l'abeille : *Aspergillus flavus* et *Ascosphaera apis* (Benoit *et al.*, 2004). Le parasite, vivant dans le couvain serait également capable de transmettre *Paenibacillus larvae*, agent causal de la loque américaine (De Rycke *et al.*, 2002). Enfin, le parasite est capable de transmettre un certain nombre de virus : le virus de la paralysie aiguë (Acute Bee Paralysis Virus – ABPV), le virus de la cellule de reine noire (Black Queen Cell Virus – BQCV), le virus des ailes déformées (Deformed Wings Virus – DWV), le

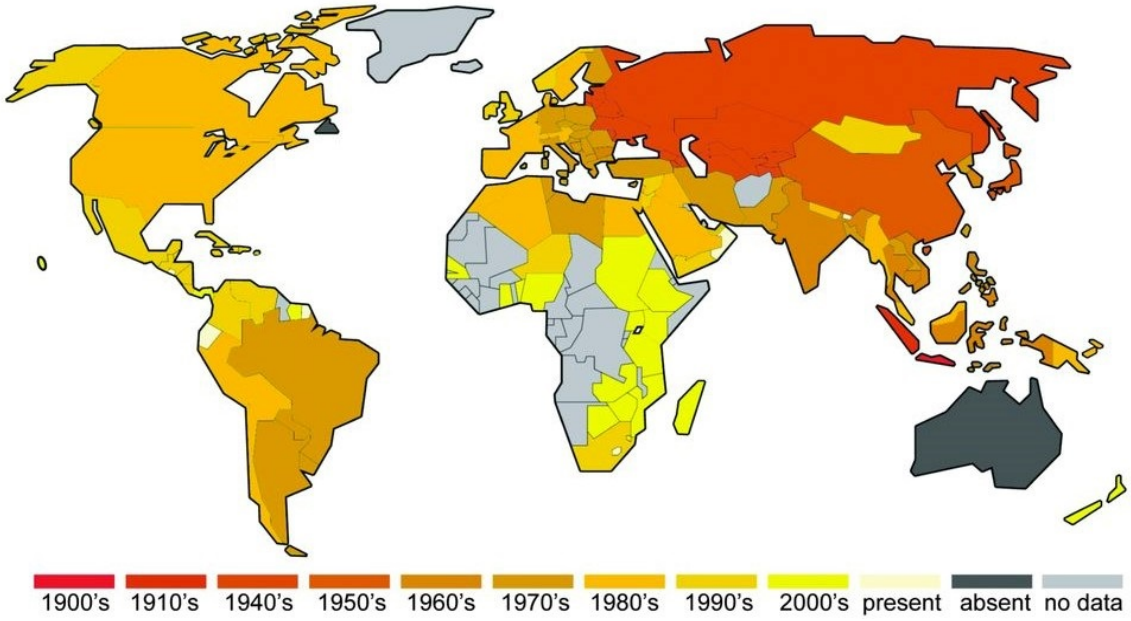


Figure 17 : Dispersion de *V. destructor* à l'échelle mondiale (Wilfert et al., 2016)

virus de la paralysie aiguë israélienne (Israel Acute Paralysis Virus – IAPV) ou encore le virus du Cachemire (Kashmeer Bee Virus – KBV) (Rosenkranz *et al.*, 2010, De Miranda *et al.*, 2012).

L'impact de varroa sur la diversité virale a été étudiée à Hawaii et en Nouvelle-Zélande et a montré un bouleversement des prévalences virales mais également de la diversité des souches de virus notamment du DWV particulièrement (Martin *et al.*, 2012, Mondet *et al.*, 2014, Wilfert *et al.*, 2016).

La conjonction de tout ou partie de ces effets sur les abeilles à l'échelle individuelle finit par avoir un effet délétère sur la colonie et, sans contrôle de la population de parasite (par l'apiculteur), la colonie finit par mourir.

Dans la zone d'étude du Sud-Ouest de l'Océan Indien, *V. destructor* a été détecté en 2010 à Madagascar avec un effet catastrophique sur les colonies. Les taux de mortalités mesurés ont été compris entre 48 et 100% dans les ruchers malgaches un an après la détection (Rasolofoarivao *et al.*, 2013). A Maurice, le parasite a été mis en évidence en 2014. Son invasion sera décrite dans le chapitre 4 de même que l'invasion à La Réunion en 2017 (Chapitre 3).

4.4. Les bactéries

Les loques (loque américaine et européenne) sont des maladies du couvain causées par deux espèces de bactéries respectivement *Paenibacillus larvae* et *Melissococcus plutonius*. La gravité des deux loques n'est pas la même.

Les loques sont connues depuis des temps presqu'immémoriaux puisque des symptômes faisant penser à une loque était déjà décrits par Aristote (384-322 avant J.C.) dans *Historia animalium* (livre IX, 40) : « Une autre maladie produit une espèce d'inertie des abeilles et donne une mauvais odeur aux ruches » cité dans (Genersch, 2008). Au XVIIIème siècle, Schirach, naturaliste saxon décrivait une maladie « Faulbrut » traduite à l'époque en français par « faux-couvain » : « le faux Couvain est tout autrement dangéreux. C'est une maladie des plus funestes aux Abeilles, une vraie peste, quand le mal est parvenu jusqu'à un certain degré » (Schirach, 1769). Les mots anglo-saxons (anglais et allemands) désignant les loques (« foulbrood » et « Faulbrut » respectivement) sont des mots composés constitués des termes « couvain » (brood, Brut) et nauséabond (foul et faul) en référence aux symptômes clairement identifiables par l'apiculteur ou le vétérinaire. En français ancien, l'étymologie est similaire puisque de « fausses denrées » désignaient des denrées qui n'étaient « ni bonnes ni marchandes » (de Sainte-Palaye, 1880).

C'est au XIXème siècle qu'une dichotomie sera réalisée entre une loque modérée et soignable (vraisemblablement la loque européenne) et une grave et incurable (vraisemblablement la loque américaine) (Dzierzon, 1882).

4.4.1. *Paenibacillus larvae*

Paenibacillus larvae est l'agent causal de la loque américaine, maladie grave du couvain operculé d'*A. mellifera*. C'est une des maladies les plus importantes en apiculture.

La loque américaine est une maladie appartenant à la Liste de l'OIE (http://www.oie.int/fr/sante-animale-dans-le-monde/maladies-de-la-liste-de-loie-2018/). Elle est réglementée au niveau européen (Directive 92/65/CEE, Règlement UE n°206/2010). En France c'est un danger sanitaire de première catégorie (Arrêté du 29 juillet 2013 relatif à la définition des dangers sanitaires de première et deuxième catégorie pour les espèces animales) soumis à un certain nombre de mesures de police sanitaire, comme la destruction par le feu des colonies et ruches présentes au sein d'un rucher infecté.

P. larvae est un bacille en forme de bâtonnet de type Gram +. Sa taille est variable et il mesure entre 2.5 et 5 µm dans son axe le plus long et 0.5 à 0.8 µm de largeur (Genersch *et al.*, 2006a). Ce bacille a la capacité de sporuler et de résister extrêmement longtemps dans le milieu extérieur.

Seules les spores sont capables d'induire la maladie et les jeunes larves (entre 12 et 36 heures) sont beaucoup plus sensibles à l'infection que les abeilles adultes (Wilson, 1971). La contamination se fait *per os*. Les spores se retrouvent dans tous les produits de la ruche (pollen, cire, miel) mais aussi sur les abeilles et dans le matériel apicole (cadres, corps, lève-cadre, etc.) (Vidal-Naquet, 2015). Les spores de *P. larvae* peuvent résister 8 heures à 100°C de chaleur sèche, 30 minutes dans une solution de formol à 20%, dans les solvants (type benzène) ou bien encore aux rayonnements ultra-violets. Malgré tout, les spores sont détruites par de l'eau de javel à 1.5%, une solution aqueuse bouillante de soude caustique à 1.5%, 30 minutes à 130°C de chaleur sèche, les rayons gammas et le passage à la flamme (Vidal-Naquet, 2015). Le bacille est sensible aux tétracyclines mais leur usage est responsable de la contamination du miel dans le rucher et à proximité (Martel *et al.*, 2006). L'usage des antibiotiques est désormais interdit en France (règlements UE 470/ 2009 et 37/2010, note de service DGAl DGAL/SDSPA/2015-1072).

L'histoire de la taxonomie de *P. larvae* est pleine de rebondissements. En 1885, *Bacillus alvei* fut identifié à partir de larves mortes séchées dans les alvéoles du couvain (écailles loqueuses) comme étant l'agent causal de la loque (Cheshire and Cheyne, 1885). En 1906, White ne remet pas *B. alvei* en évidence à partir d'écailles loqueuses mais une nouvelle bactérie qu'il dénommera *Bacillus larvae*

Tableau 2 : Synthèse des caractéristiques des différents génotypes de *P. larvae* d'après Genersch, 2010 et Vidal-Naquet, 2015. LT_{100} représente la période de temps au bout de laquelle 100% des individus infectés sont morts.

Espèce (Genersch *et al.*, 2006a)	*Paenibacillus larvae*			
Sous-espèce (Heyndrickx *et al.*, 1996)	*P. larvae larvae*		*P. larvae pulvifaciens*	
ERIC génotypes	ERIC I	ERIC II	ERIC III	ERIC IV
Symptômes LA	Oui	Oui	Oui	Oui
LT_{100}	≈ 12 jours	≈ 7 jours	≈ 7 jours	≈ 7 jours
Contagiosité	élevée	élevée	non observée	non observée
Répartition géographique	Europe Amérique Afrique	Amérique	Collection	Collection

(White, 1906) montrant ainsi l'existence de deux loques (européenne et américaine). Une nouvelle bactérie fut identifiée dans les années 50 sur des écailles poudreuses : *B. pulvifaciens* (Katznelson, 1950). Des analyses génétiques basées sur les analyses des ARN ribosomiaux (16S rRNA) ont reclassifié les bactéries en *Paenibacillus larvae* et *P. pulvifaciens* (Ash *et al.*, 1991, Ash *et al.*, 1993). Quelques années après les deux espèces furent fusionnées dans la même et séparées en deux sous-espèces distinctes : *P. larvae* subsp. *larvae* et *P. larvae* subsp. *pulvifaciens* (Heyndrickx *et al.*, 1996). En 2006, d'autres analyses génétiques réalisées sur la base du consensus intergénérique répétitif entérobactérien (ERIC) ont défini 4 types (de I à IV) de *P. larvae* (Genersch *et al.*, 2006a) (Tableau 2).

Comme de nombreuses maladies des abeilles, la loque américaine est une maladie dite « à seuil », c'est-à-dire qu'en deçà d'une certaine dose infectante de spores, les symptômes ne sont pas déclenchés. La dose infectante moyenne (DI_{50}) concernant les larves est de 8 à 9 spores pour 24 à 48 heures, mais cette DI_{50} dépend à la fois des caractéristiques de l'abeille et de la virulence des souches de *P. larvae* (Genersch *et al.*, 2005).

Les colonies affectées par la loque américaine présentent un affaiblissement et sans la mise en place de mesures correctives de la part de l'apiculteur, l'issue est fatale pour la colonie. Au niveau du couvain, on peut observer un couvain en mosaïque présentant des opercules affaissés ou percés. Les larves mortes (écailles loqueuses) sont adhérentes à la paroi de la cellule et présentent une forme caractéristique (Figure 18). Une odeur caractéristique est également décelable à proximité des ruches dont les colonies sont affectées.

Pour les apiculteurs, les méthodes de gestion de la maladie les plus efficaces sont le simple ou double transvasement. L'essaimage réduit drastiquement la charge bactérienne : 13 mois après l'essaimage d'abeilles asymptomatiques mais porteuses de 20 UFC, les bactéries étaient devenues quasiment indétectables (Fries *et al.*, 2006).

4.4.2. *Melissococcus plutonius*

La loque européenne est une maladie infectieuse et contagieuse d'importance variable du couvain ouvert de l'abeille mellifère. Plusieurs espèces d'abeilles y sont sensibles : *A. mellifera*, *A. cerana* (Bailey, 1974) et *A. laboriosa* (Allen *et al.*, 1990). Cette maladie appartient à la Liste de l'OIE mais n'est pas réglementée en France.

En 1885, l'agent causal identifié a été *Bacillus alvei* (Cheshire and Cheyne, 1885). En 1912, les travaux réalisés aux USA concernant les deux loques voient l'agent étiologique remis en cause. Il sera alors nommé *Bacillus pluton* (White, 1912). En 1957, la bactérie est cultivée et décrite selon de nouveaux

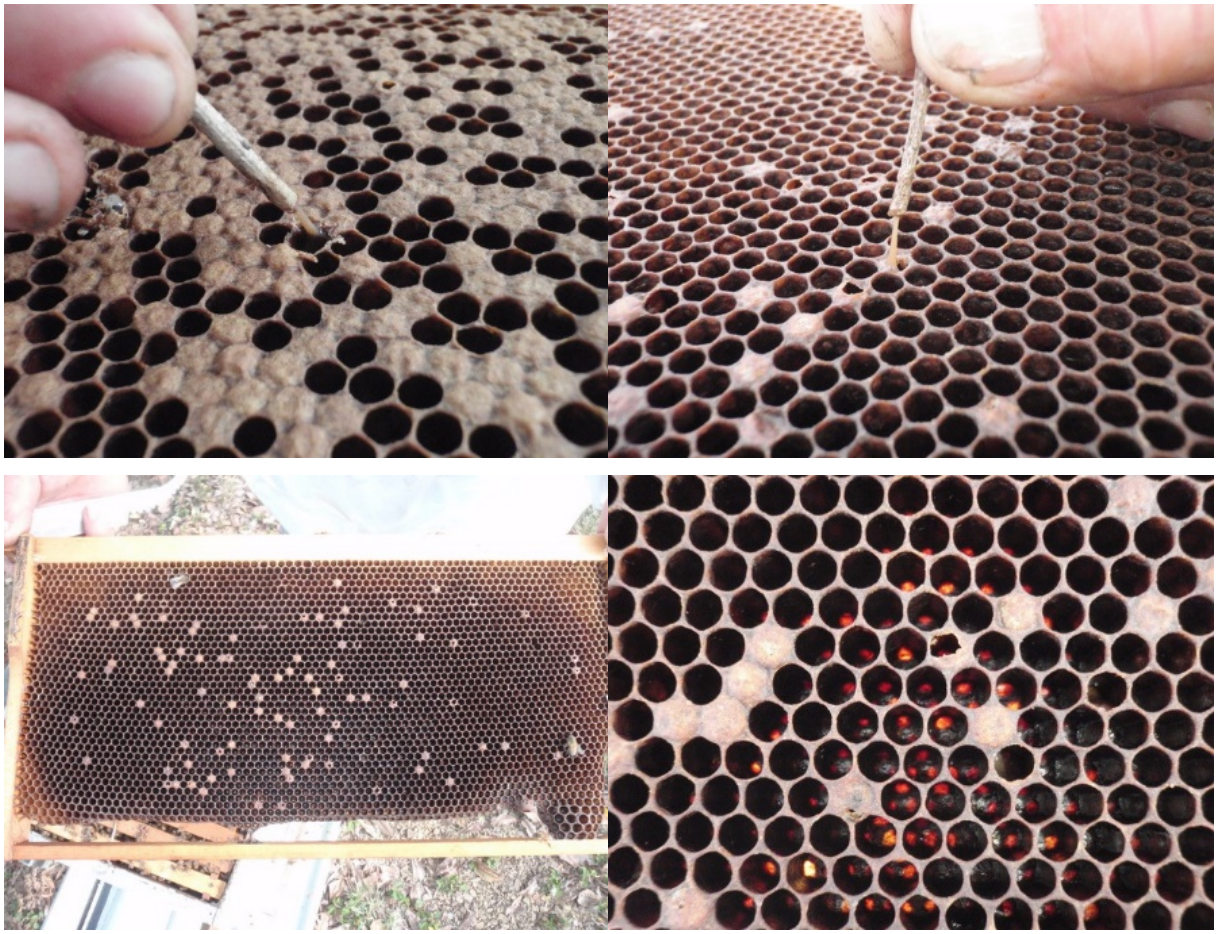


Figure 18 : Signes cliniques de loque américaine (couvain en mosaïque, opercules percés) avec l'aspect filant du contenu de la cellule infectée (signe de l'allumette) (© Margot Camoin)

critères. Elle est alors nommée *Streptococcus pluton* (Bailey, 1957). Des analyses biochimiques ont montré que les acides nucléiques de la bactérie possèdent des taux bas de guanine et cytosine. Dès lors, l'espèce ne pouvait plus être rattachée au genre *Streptococcus* et un nouveau genre fut alors créé : *Melissococcus* (Bailey and Collins, 1982). C'est en 1998 que le bacille acquit le nom qui est encore utilisé à l'heure actuelle : *M. plutonius* (Trüper and de'Clari, 1998).

M. plutonius est une bactérie Gram +, de forme variable (coques lancéolés ou en bâtonnets) non sporulante et microaérophile voire anaérobique (Forsgren, 2010). La bactérie peut se retrouver seule, en paire ou en chaînette de longueur variable.

De nombreux agents secondaires à l'infection par *M. plutonius* ont été mis en en évidence sur des larves malades. Il s'agit de *Achromobacter euridice* (Bailey, 1957), *Enterococcus faecalis* (Bailey, 1963), *Brevibacillus laterosporus* (Bailey and Ball, 1991) et *Paenibacillus alvei* (Bailey, 1963). Néanmoins, leur rôle dans la pathogénie de la loque européenne est très mal connu (Budge *et al.*, 2010).

Cette maladie semble être présente sur tous les continents, à l'exception de la Nouvelle-Zélande (Forsgren and Fries, 2013). La maladie est généralement endémique et les occurrences de cas sont occasionnelles et souvent saisonnières (Forsgren *et al.*, 2013).

Dans les colonies atteintes de loque européenne, les larves meurent à l'âge de 4-5 jours, soient 1 à 2 jours avant l'operculation. La couleur des larves affectées va aller du blanc perle au brun en passant par le jaune. A la différence de la loque américaine, les écailles loqueuses ne sont pas adhérentes à la cellule. Dans les cas les plus sévères, les larves peuvent alors mourir dans le couvain operculé. Les symptômes sont alors très proches de ceux de la loque américaine.

Les symptômes le plus fréquemment observés sont un couvain en mosaïque très souvent associés avec une odeur aigre caractéristique. Dans la plupart des cas les symptômes disparaissent d'eux-mêmes mais quelques mortalités de colonies peuvent être enregistrées (Vidal-Naquet, 2015).

Les facteurs favorisant l'apparition de la maladie sont une carence en protéines (carence en pollen, défaut de butinage à cause d'évènements climatiques…), un déséquilibre du polyéthisme avec un défaut de nourrice à un moment où le couvain est abondant (essaimage artificiel, intoxications au champ de butineuses…). Le virus du couvain sacciforme (Sac Brood Virus – SBV) et *V. destructor* constituent autant de facteurs aggravants puisqu'ils occasionnent une atrophie des glandes hypopharyngiennes des ouvrières (Vidal-Naquet, 2015).

4.5. Les microsporidies

4.5.1. Biologie

Les microsporidies sont des champignons unicellulaires qui ont la capacité de sporuler. Les Nosematidae comportent 8 genres dont le genre *Nosema*. Au sein de ce genre, il y a au moins 81 espèces connues (Kirk *et al.*, 2008). La plupart parasitent des arthropodes mais certaines sont hyperparasites, c'est-à-dire qu'elles parasitent des parasites. C'est le cas de *N. podocotyloidis* qui parasite un vers trématode (du genre Digenea) qui lui-même parasite des poissons (Toguebaye *et al.*, 2014). Seules trois espèces affectent les abeilles *A. mellifera* : *N. apis*, *N. ceranae* et *N. neumanni* (Chemurot *et al.*, 2017).

Les spores des deux espèces sont similaires en taille et en apparence (Figure 19). Les spores de *N. apis* mesurent entre 5 et 7 µm de longueur pour 3 à 4 µm alors que les spores de *N. ceranae* mesurent quant à eux 4-4.8 µm de longueur pour 2.1-2.9 µm de largeur (Fries, 1993). Ces spores sont extrêmement résistantes à la chaleur et à la dessiccation (Fenoy *et al.*, 2009).

La structure interne des spores est similaire chez les deux espèces (Figure 19 et Figure 20) :

- une enveloppe robuste composée d'une endo et d'une exospore (CW)
- un sporoplasme contenant :
  - un noyau diplocaryotique (N)
  - un filament polaire enroulé en spirale autour du noyau (TU)
  - des polaroplastes lamellaires (PP)
  - une vacuole postérieure

Après ingestion par l'abeille, les spores vont germer dans le ventricule de l'intestin moyen. Le filament polaire se dévagine, pénètre dans la cellule épithéliale du tube digestif en traversant la membrane cellulaire. Le sporoplasme est transféré dans la cellule parasitée commençant ainsi sa multiplication. Les spores sont produites après les deux phases de mérogonie et de sporogonie. La durée du cycle est de 4 jours pour *N. apis* et de 3 jours pour *N. ceranae* (Forsgren and Fries, 2010).

En se libérant, les spores font exploser la cellule épithéliale et s'accumulent dans la lumière du ventricule. Ils peuvent réinfester d'autres cellules ou suivre le tractus digestif et ainsi s'accumuler dans les fèces d'abeilles, participant ainsi à leur dispersion (Figure 20).

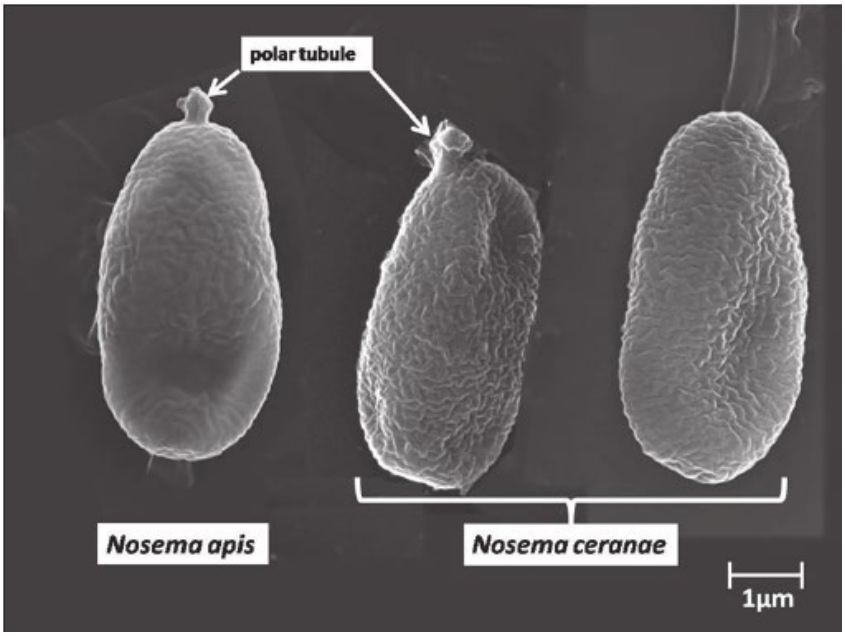


Figure 19 : Spores de *Nosema sp.* en microscopie électronique (Ptaszynska et al., 2012)

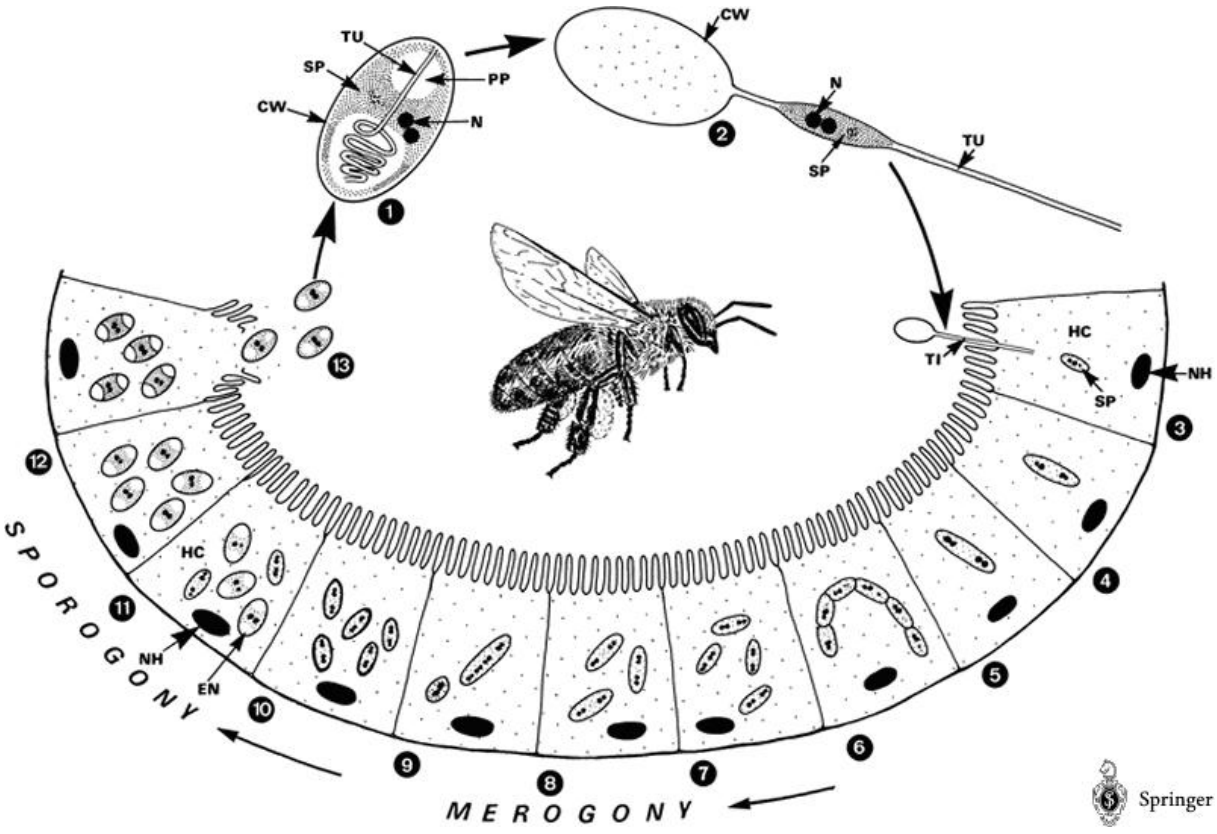


Figure 20 : Représentation du cycle parasitaire des *Nosema sp.* parasitant le tube digestif de l'abeille © Springer Life Scientific

4.5.2. *Nosema apis*

Même si *N. apis* est retrouvée en Afrique, particulièrement en Afrique australe et orientale (Kenya, Tanzanie, Zimbabwe et Afrique du Sud) (Mumoki *et al.*, 2014), *N. apis* est plutôt une problématique de pays tempéré et froid (Fries, 1993). L'expression clinique de la nosémose de type A est particulièrement importante au sortir de l'hiver, dans les pays tempérés (Higes *et al.*, 2013b), puisque les microsporidies se sont multipliées dans le tube digestif des abeilles d'hiver. La Nosémose de type A peut conduire à l'affaiblissement de la colonie voire à son effondrement (Fries, 2014).

La multiplication des spores dans le tube digestif de l'abeille génère une inflammation du tractus digestif, un dérèglement des fonctions digestives ralentissant ainsi le métabolisme global de l'abeille. Le transit digestif est affecté par la grande quantité de spores ayant envahi la lumière du tube digestif (30 à 50 millions de spores), générant ainsi soit de la diarrhée soit de la constipation (OIE, 2013).

N. apis sera également responsable de l'altération des glandes hypopharyngiennes affectant ainsi le couvain, aboutissant à un affaiblissement de la colonie (Fries, 2010a). Les capacités reproductives de la reine sont fortement affectées, pouvant aboutir à de la stérilité empêchant ainsi les remérages par supersédure. L'espérance de vie des abeilles parasitées est réduite. Au niveau de la colonie, *N. apis* accélère le polyéthisme temporel et contribue à la désorganisation de la colonie (Somerville and Hornitzky, 2007).

4.5.3. *Nosema ceranae*

N. ceranae fut décrite en 1996 (Fries *et al.*, 1996a) chez des abeilles asiatiques. Dix ans plus tard le parasite fut mis en évidence en Europe (Higes *et al.*, 2006). La nosémose de type C peut donc être considérée comme une maladie émergente des abeilles mellifères. Elle pourrait jouer un rôle majeur dans les mortalités aiguës de colonies, notamment en Espagne (Higes *et al.*, 2009, Higes *et al.*, 2010a, Meana *et al.*, 2017). Malgré tout, son importance est controversée (Higes *et al.*, 2013b).

Si la nosémose de type C peut être considérée comme une maladie émergente, le parasite peut quant à lui être considéré comme une espèce invasive. A l'instar de *V. destructor*, *N. ceranae* est d'origine asiatique et infeste plusieurs espèces du genre Apis en Asie : A*. koschevnikovi*, *A. florea*, *A. cerana* et *A. dorsata* (Chaimanee *et al.*, 2010, Chaimanee *et al.*, 2011, Botias *et al.*, 2012b). C'est désormais un des parasite que l'on retrouve le plus à l'échelle mondiale (Yang *et al.*, 2013) dans les populations d'*A. mellifera*. Si pour certains auteurs le changement d'hôte et la dispersion s'est réalisé il y a une vingtaine d'années (Gomez-Moracho *et al.*, 2015), le parasite a été mis en évidence sur des prélèvements de

faux bourdons africanisés au Brésil datant de 1979 (Teixeira *et al.*, 2013). Par ailleurs, il y a une compétition entre les deux espèces et *N. ceranae* prendrait le pas sur *N. apis* la rendant de plus en plus rare et la confinant dans les zones froides et tempérées (Chen *et al.*, 2009). *N. ceranae* affecte la physiologie de l'abeille de plusieurs façons. Les abeilles parasitées présentent un taux d'éthyl oléate supérieur à des abeilles non parasitées. Cette hormone se retrouve généralement chez les butineuses et retarde ainsi le passage au stade butineuse des abeilles d'intérieur (Dussaubat *et al.*, 2010, Dussaubat *et al.*, 2013). Les analyses des transcriptomes de la vitellogénine et de l'hormone juvénile montrent, sur des abeilles nourrices infestées artificiellement en cage, des taux de transcriptome de vitellogénine bas et des taux élevés pour les transcriptomes de l'hormone juvénile (Goblirsch *et al.*, 2013). Normalement des abeilles du même âge présentent des taux inverses. La durée de vie est également impactée avec un raccourcissement de la longévité de 9 jours chez des abeilles artificiellement infestées (Goblirsch *et al.*, 2013). Trois à six jours après inoculation, *N. ceranae* inhibe chez l'abeille mellifère l'expression des gènes d'immunité codant pour les protéines suivantes : défensine, abécine, apidecine et hymenoptecine (Chaimanee *et al.*, 2012).

Les symptômes de la nosémose de type C sont absolument non-spécifiques (Higes *et al.*, 2010b, Botias *et al.*, 2013) :

- au niveau individuel :
  - mort des butineuses par perte du homing
  - diminution de la population de nourrices
  - accélération du polyéthisme temporel
  - réduction de la durée de vie des abeilles
  - remérages induits
- à l'échelle de la colonie :
  - diminution de la taille du couvain
  - diminution de la population d'abeilles dans la ruche
  - diminution des capacités de stockage du miel et du pollen

4.6. Virus

Au moins 23 espèces de virus affectent l'abeille mellifère (McMenamin and Genersch, 2015a) et sont présentées dans le *Tableau 3*.

Tableau 3: Présentation des virus connus affectant *A. mellifera*, les vecteurs ainsi que le mode de transmission sont détaillés, les symptômes quand ils sont disponibles ainsi que leur répartition géographique.

Famille	Genre	Virus	Acide nucléique	Vecteur / Mode de transmission	Synergie	Symptômes	Répartition	Références
Dicistroviridae	*Aparavirus*	**ABPV**	+ssRNA	*Varroa destructor* vertical		Nerveux (plus précoces que CBPV)	Europe Amérique Asie	(Bailey *et al.*, 1963, Bailey *et al.*, 1976, Bailey and Woods, 1977, de Miranda *et al.*, 2004, Tentcheva *et al.*, 2004, Yue *et al.*, 2006, Runckel *et al.*, 2011, Yang *et al.*, 2013, Yanez *et al.*, 2014)
Dicistroviridae	*Cripavirus*	**BQCV**	+ssRNA	vertical horizontal indirect	*Nosema apis(+)* *Nosema ceranae (-)*	Mortalités cellules royales	Europe Amérique du Nord Asie Afrique	(Bailey *et al.*, 1983, Tentcheva *et al.*, 2004, Chen *et al.*, 2006a, Kajobe *et al.*, 2010, Singh *et al.*, 2010, Runckel *et al.*, 2011, Strauss *et al.*, 2013, Yang *et al.*, 2013, Muli *et al.*, 2014, Retschnig *et al.*, 2014b, Yanez *et al.*, 2014)
Dicistroviridae	*Aparavirus*	**KBV**	+ssRNA	*Varroa destructor* vertical		Nerveux	Europe Amérique du Nord Asie	(Bailey *et al.*, 1976, Bailey and Woods, 1977, Chen *et al.*, 2004a, de Miranda *et al.*, 2004, Tentcheva *et al.*, 2004, Chen *et*

								al., 2006a, Runckel *et al.*, 2011, Yang *et al.*, 2013)
Non classé	*Chroparavirus*	**CBPV**		vertical		Nerveux	Europe Amérique du Nord Asie	(Bailey, 1967, Tentcheva *et al.*, 2004, Chen *et al.*, 2006a, Ribiere *et al.*, 2007, Ribiere *et al.*, 2010, Runckel *et al.*, 2011, Yang *et al.*, 2013)
Iflaviridae	*Iflavirus*	**DWV**	+ssRNA	*Varroa destructor* sexuel vertical trophallaxie horizontal indirect		Déformation des ailes	Europe Amérique Asie Afrique	(Tentcheva *et al.*, 2004, Yue and Genersch, 2005, Berenyi *et al.*, 2006, Chen *et al.*, 2006a, Berenyi *et al.*, 2007, Singh *et al.*, 2010, Runckel *et al.*, 2011, Yang *et al.*, 2013, Muli *et al.*, 2014, Yanez *et al.*, 2014)
Iflaviridae	*Iflavirus*	**SBV**	+ssRNA	vertical horizontal indirect		Mortalités couvain	Europe Amérique du Nord Asie	(Bailey *et al.*, 1964, Bailey, 1975, Singh *et al.*, 1982, Anderson and Gibbs, 1989, Anderson and Giacon, 1992, Tentcheva *et al.*, 2004, Chen *et al.*, 2006b, Singh *et al.*, 2010, Runckel *et al.*, 2011, Yang *et al.*, 2013)
Dicistroviridae	*Aparavirus*	**IAPV**	+ssRNA	*Varroa destructor*		Mortalités	Europe Amérique Asie Afrique	(Tentcheva *et al.*, 2004, Chen and Evans, 2007, Cox-Foster *et al.*, 2007b, Maori *et al.*, 2007, Di Prisco *et al.*, 2011, Runckel *et al.*, 2011, Strauss *et al.*, 2013,

								Yang *et al.*, 2013, Yanez *et al.*, 2014)
Iflaviridae	*Iflavirus*	**CSBV**	+ssRNA			Mortalités couvain	Asie	(Mingxiao *et al.*, 2011)
Iflaviridae	*Iflavirus*	**KV**	+ssRNA	*Varroa destructor* ?		Nerveux	Asie	(Fujiyuki *et al.*, 2004, Fujiyuki *et al.*, 2006, Terio *et al.*, 2008, Fujiyuki *et al.*, 2009)
Iflaviridae	*Iflavirus*	**S(B)PV**	+ssRNA	*Varroa destructor*		Mortalités		(Bailey and Woods, 1974, Carreck *et al.*, 2010b, de Miranda *et al.*, 2010b)
Iflaviridae	*Iflavirus*	**VDV-1**	+ssRNA	*Varroa destructor*			Afrique	(Moore *et al.*, 2011a, Strauss *et al.*, 2013)
Miscellanous virus		**BVX**	MD		*Malpighamoeba mellificae*		Europe	(Bailey *et al.*, 1983)
Miscellanous virus		**BVY**	MD		*Nosema apis*		Europe	(Bailey *et al.*, 1980, Bailey *et al.*, 1983)
Miscellanous virus		**CWV**	MD		*Varroa destructor ?*	Ailes opaques, mortalités	Europe	(Carreck *et al.*, 2010a)
Baculo and asco-like virus		**FV**	MD		*Nosema apis*	Aucun	Europe	(Bailey *et al.*, 1983)
MD	MD	**IIV-6**	MD			associé au CCD	Amérique du Nord	(Devauchelle *et al.*, 1985, Bromenshenk *et al.*, 2010)

Miscellanous virus	*Sinaivirus*	**LSV**	+ssRNA			Rôle pathogène incertain	Europe	(Belak *et al.*, 2013, Granberg *et al.*, 2013, Bigot *et al.*, 2017)
Tymoviridae	*Maculavirus*	**BeeMLV**	+ssRNA	*Varroa destructor* ?	*Varroa destructor* ?	associé au CCD		(de Miranda *et al.*, 2015)

Signification des abréviations : BVX (Bee Virus X), BVY (Bee Virus Y), CSBV (Chinese Sac Brood Virus), CWV (Cloudy Wing Virus), FV (Filamentous DNA Virus), IIV-6 (Invertebrate Irdidescent Virus 6), KV (Kakugo Virus), LSV (Lake Sinai Virus), S(B)PV (Slow (Bee) Paralysis Virus) et VDV-1 (Varroa Destructor Virus 1). « +ssRNA » désigne un ARN génomique positif à simple brin, « MD » désigne des informations manquantes. La partie en rose saumon du tableau représente les virus étudiés dans le cadre de cette thèse.

4.6.1. Virus de la famille des Dicistroviridae

4.6.1.1. Taxonomie

La famille des Dicistroviridae comprend deux genres : *Aparavirus* et *Cripavirus* (Figure 21). Les particules virales mesurent environ 30 nm et ne possèdent pas d'enveloppe. La taille du génome viral est comprise entre 8500 et 10000 nucléotides (*Tableau 3*).

Tous les virus de cette famille infectent les invertébrés.

L'ARN génomique du virus présente deux cadres de lecture (ORF1 et ORF2) qui ne superposent pas. Le premier cadre de lecture code pour des protéines non structurantes (ARN Hélicase, cystéine protéase et ARN polymérase ARN dépendante). Les protéines de capside sont codées par le second cadre de lecture (Figure 22).

Au sein du genre *Aparavirus*, trois virus sont d'intérêts majeurs en apiculture : ABPV,KBVet IAPV (Chen *et al.*, 2012a).

Chez les *Cripavirus*, un seul virus affecte l'abeille mellifère : le BQCV (Chen *et al.*, 2012a).

4.6.1.2. Genre *Aparavirus* : le complexe AKI

Le complexe AKI est constitué d'ABPV, KBV et IAPV. Ces trois virus sont très proches et constituent un complexe de virus (de Miranda *et al.*, 2010a).

4.6.1.2.1. ABPV

Le virus de la paralysie aiguë est répandu sur tous les continents (Bailey *et al.*, 1963, de Miranda *et al.*, 2004, Tentcheva *et al.*, 2004, Yue *et al.*, 2006, Pirk *et al.*, 2016).

Les symptômes sont les suivants (Békési *et al.*, 1999) :

- Abeilles marchant au sol devant la ruche, incapables de voler et finissant par mourir,
- Position anormale des ailes
- Couvain présentant des cellules aux opercules percés (mort de la larve ou de la nymphe)
- Dans les formes les plus sévères, affaiblissement puis mort de la colonie

Une infection à l'ABPV conjuguée à une infestation de varroa conduit à une synergie pouvant aboutir à la mort de la colonie (De Miranda *et al.*, 2012).

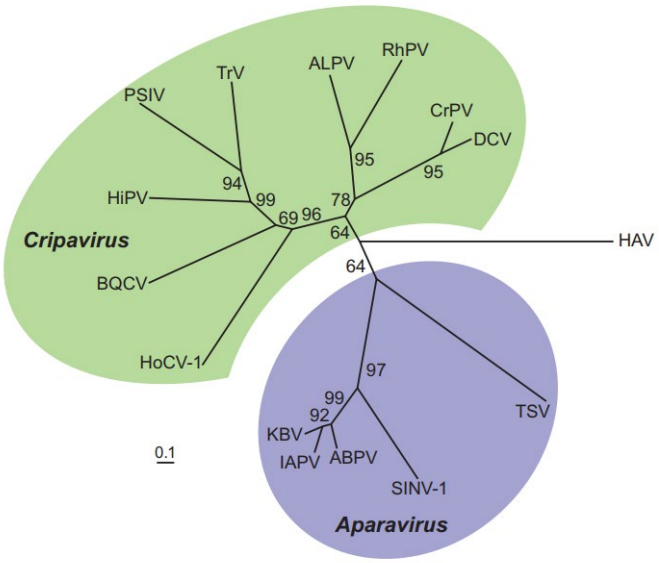


Figure 21 : Arbre phylogénétique basé sur les séquences d'acides aminés des protéines structurales des Dicistroviridae. L'outgroup est constitué par le virus de l'hépatite A.

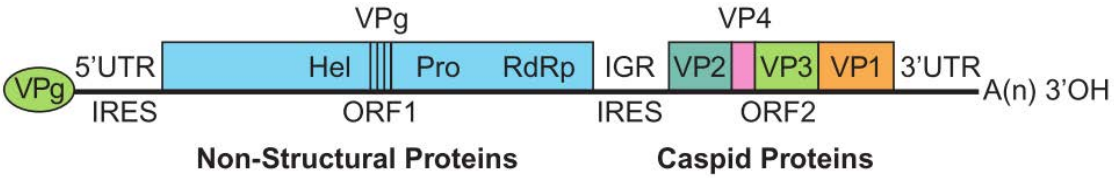


Figure 22 : Structure du génome du virus de la paralysie du criquet (CrPV) – espèce type

4.6.1.2.2. IAPV

L'IAPV a été mis en évidence en 2004 en Israël (Maori *et al.*, 2007), d'où il tire son nom. Dès 2007 il est mis en évidence aux USA (Chen and Evans, 2007) et en 2008 en France (Blanchard *et al.*, 2008). Depuis il a été mis en évidence sur le continent africain (Strauss *et al.*, 2013) et en Asie (Yang *et al.*, 2013).

Toutes les castes et classes d'âge sont sensibles au virus (Chen *et al.*, 2014). Lors d'une infection à IAPV, on peut observer des ailes tremblantes et une paralysie progressive aboutissant à la mort. Parallèlement l'abdomen devient noir et se dépile (Maori *et al.*, 2007). Ce virus a été longtemps suspecté comme facteur étiologique lors des premières mortalités massives de colonies aux USA au début des années 2000 (Cox-Foster *et al.*, 2007a). *V. destructor* serait vecteur biologique de ce virus (Di Prisco *et al.*, 2011).

4.6.1.2.3. KBV

Comme l'ABPV et l'IAPV, le virus du Cachemire est mondialement répandu (Ellis and Munn, 2005).

En conditions expérimentales, après inoculation dans l'hémolymphe de l'abeille, il se multiplie très rapidement et conduit à la mort de l'individu infecté en moins de trois jours (De Miranda *et al.*, 2012). Cependant, le virus peut être retrouvé de manière asymptomatique dans des colonies saines (Blanchard *et al.*, 2014a).

Les abeilles infectées par le KBV n'expriment pas de symptômes spécifiques. Le virus peut générer des mortalités à tous les stades de développement de l'abeille (De Miranda *et al.*, 2012). Au niveau de la colonie, le virus peut être responsable de mortalités brutales même si le niveau d'infestation de varroa sont faibles (De Miranda *et al.*, 2012) . Ce virus est transmis par *V. destructor* (Chen *et al.*, 2006b).

4.6.1.2.4. Genre *Cripavirus* : BQCV

Le virus de la cellule de reine noire est connu depuis la fin des années 70 (Bailey and Woods, 1977). Ce virus a une répartition mondiale (Tentcheva *et al.*, 2004, Yang *et al.*, 2013, Muli *et al.*, 2014, Pirk *et al.*, 2016, Tsevegmid *et al.*, 2016) et c'est un des virus les plus mis en évidence lors des enquêtes de recherche multipathogènes.

Les cellules de reines infectées brunissent, voire deviennent noire. A l'intérieur de la cellule, la larve ou la pupe est morte. Le cadavre de la larve est de couleur jaune pâle. La larve se liquéfie et prend la forme d'un « sac rempli de liquide ». Ces symptômes ressemblent énormément à ceux causés par le

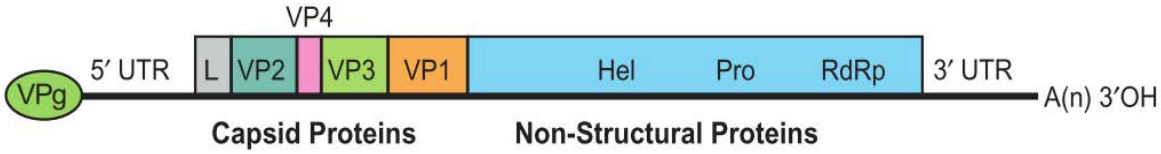


Figure 23 : Structure du génome du virus infectieux de flacherie (IFV) – espèce type

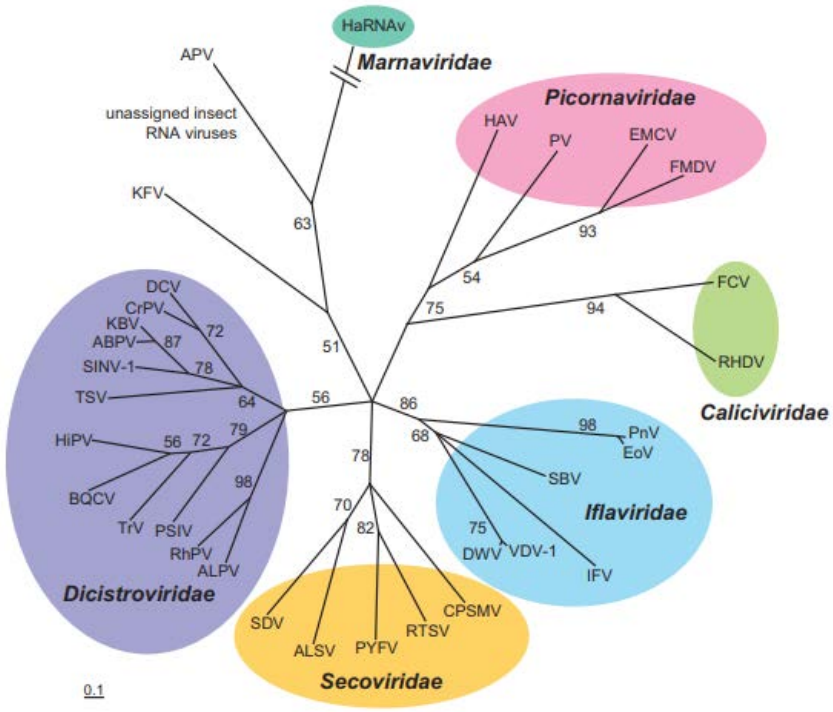


Figure 24 : Phénogramme des différentes familles de virus basé sur le domaine RdRp des protéines non-structurales de l'ordre des Picornavirales (Picornaviridae, Dicistroviridae, Marnaviridae et Secoviridae)

virus du couvain sacciforme (SBV). A noter que les cellules de couvain de mâles ainsi que certaines cellules du couvain d'ouvrière peuvent également développer des symptômes de ce type.

La principale voie de transmission est horizontale notamment via le nourrissement opéré par les nourrices, mais le BQCV se transmet également de manière verticale (Chen *et al.*, 2006a).

4.6.2. Virus de la famille des Iflaviridae

La famille des Iflaviridae ne comporte qu'un seul genre, le genre *Iflavirus*.

Les particules virales sont relativement sphériques avec une symétrie icosahédrale et mesurent entre 26 et 30 nm. Elles ne possèdent pas d'enveloppe. La taille des génomes est comprise entre 8800 et 10100 nucléotides (*Tableau 3*).

Il n'y a qu'un seul cadre de lecture codant pour une polyprotéine qui par clivage protéolytique donnera toutes les molécules virales et notamment les trois protéines structurales (VP1, VP2 et VP3) voire une quatrième (VP4) chez quelques espèces (Figure 23).

Au sein du genre *Iflavirus*, 4 virus affectent l'abeille mellifère mais seulement deux sont d'intérêts majeurs, le DWV et le SBV. Les deux autres virus existants (VdV-1 et SCBV) sont respectivement très proches de DWV et SBV (Figure 24).

4.6.2.1. DWV et les virus proches

Le virus des ailes déformé a été isolé pour la première fois en 1977 en Egypte en tant que Virus d'Egypte des Abeilles (EBV) (Bailey *et al.*, 1979). Quelques années plus tard, en 1982, un virus similaire est mis en évidence au Japon sur des abeilles aux ailes déformées. Ce n'est qu'au début des années 90 qu'il prendra son nom définitif de DWV à cause des symptômes cliniques qu'il cause (Bailey and Ball, 1991). La dispersion mondiale de *V. destructor* et les mortalités massives d'abeilles relanceront les travaux sur les virus affectant la santé de l'abeille et particulièrement le DWV (Ribière *et al.*, 2008).

A l'échelle individuelle de l'abeille, les symptômes causés par le DWV sont les suivants :

- Abdomen déformé et décoloré (Figure 25)
- Ailes déformées (Figure 25)
- Paralysie (Chen *et al.*, 2006b)

Les abeilles infectées sont incapables de voler et voient leur espérance de vie réduite de manière significative. Dans certains cas, l'infection au DWV peut causer la mort de la nymphe. Les abeilles

Figure 25 : Ouvrière présentant les symptômes du DWV (©Olivier Esnault)

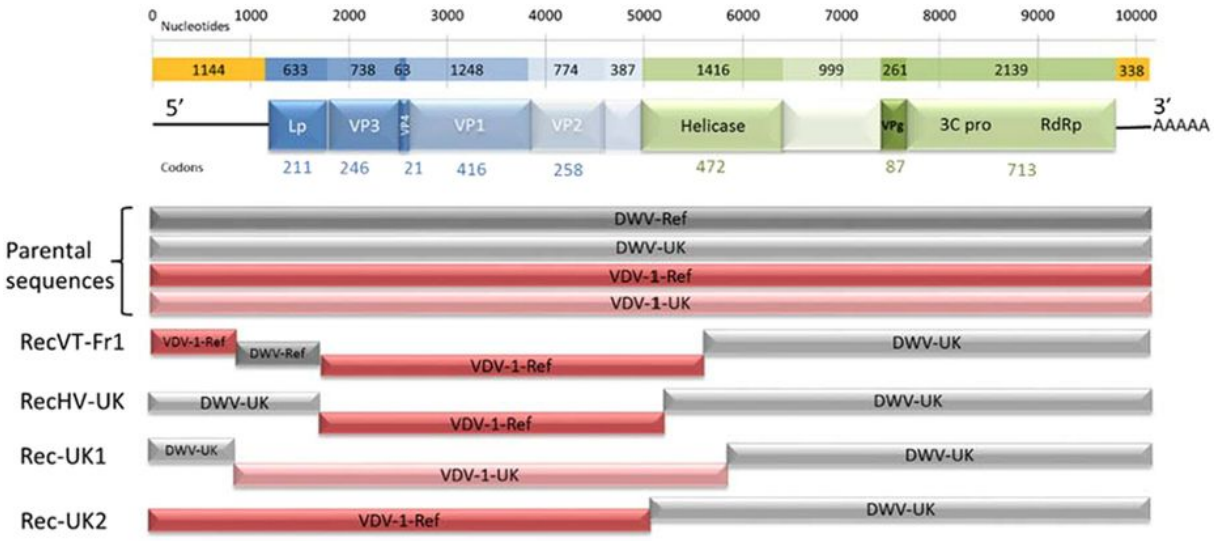


Figure 26 : Schémas des recombinaisons détectées entre des virus DWV et VdV-1 chez 4 souches recombinantes (Dalmon et al., 2017)

adultes infectées par le DWV mais sans signes cliniques peuvent présenter des troubles de l'apprentissage notamment lors du butinage (Iqbal and Mueller, 2007).

A l'échelle de la colonie, des symptômes comme du couvain irrégulier, des mortalités des nymphes et du cannibalisme peuvent être observés.

Bien que le DWV se transmette de manière horizontale (voie fécale et orale) et verticale (Chen *et al.*, 2006a), le virus est disséminé par *V. destructor* (Yue and Genersch, 2005) de colonies en colonies. Dès lors, avec la dispersion panzootique de varroa on le retrouve sur tous les continents.

En l'absence de varroa, le virus peut malgré tout circuler à bas bruit dans les colonies de manière asymptomatique (Yue and Genersch, 2005, de Miranda and Fries, 2008, Martin *et al.*, 2012, Mondet *et al.*, 2014). L'association du virus avec la présence du varroa est responsable de la varroose et augmente la mortalité des abeilles.

Deux virus sont proches de DWV : le virus de Kakugo (Fujiyuki *et al.*, 2004, Fujiyuki *et al.*, 2006) et le virus de *Varroa destructor* (VdV-1) (Ryabov *et al.*, 2017) qui vont constituer un complexe d'espèces proches. Le virus de Kakugo (Japon) fut isolé à partir du cerveau d'abeilles agressives qui s'attaquaient au frelon *Vespa mandarinia japonica*. Ce virus a 95% d'homologie avec le VdV-1 et 98% avec le DWV (Ongus *et al.*, 2004). Dans la colonie on ne retrouve ce virus que dans les abeilles qui attaquent et pas dans les autres castes (Fujiyuki *et al.*, 2006). Les virus DWV et VdV-1 peuvent recombiner grâce à des points de recombinaison dans la région 5' non codante (5'-UTR) et dans la portion codant pour l'hélicase (Dalmon *et al.*, 2017) (Figure 26).

D'un point de vue lexical, le VdV-1 peut également être nommé DWV Type A et le DWV « sensu stricto » DWV Type B (Mordecai *et al.*, 2016).

4.6.2.2. SBV

Le virus du couvain sacciforme affecte le couvain operculé mais aussi les abeilles adultes.

La maladie fut décrite pour la première fois en 1917 mais le virus fut isolé quelques décennies plus tard (Bailey *et al.*, 1964). L'infection peut être latente dans les colonies mais elle est généralement moins importante chez *A. mellifera* que chez *A. cerana* qui est très sensible (De Miranda *et al.*, 2012). Ce virus fait partie des virus les plus répandus sur la planète (Blanchard *et al.*, 2014b).

Les symptômes du couvain les plus fréquemment observés sont les suivants :

- Couvain irrégulier et en mosaïque
- Opercules percés

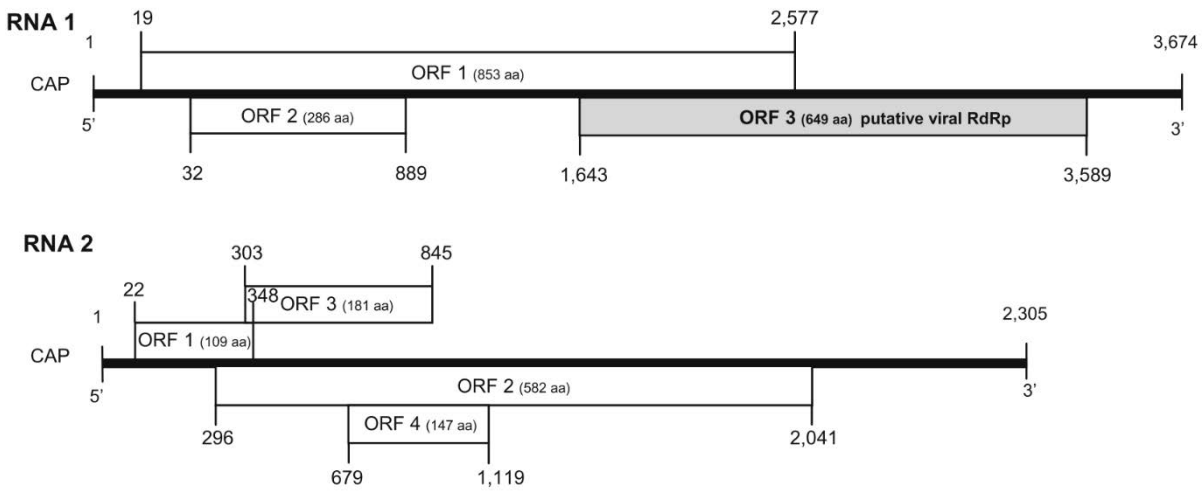


Figure 27 : Organisation du génome du CBPV (Ribiere et al., 2010)

- Les larves infectées (mortes) présentent un aspect caractéristique en forme de sac rempli d'un exsudat jaunâtre rempli de particules virales
- Les larves mortes peuvent dessécher et peuvent être confondues avec des écailles loqueuses

Chez les abeilles adultes les signes cliniques suivants sont souvent non spécifiques et peuvent être observés :

- Diminution de l'espérance de vie et changement de comportement
- Accélération du polyéthisme temporel (Bailey and Ball, 1991)

Le virus est disséminé dans la colonie par les adultes et particulièrement par la gelée nourricière synthétisée par les glandes hypopharyngienne (Ribière *et al.*, 2008). Le virus peut être retrouvé dans le miel et dans le pain d'abeilles. *V. destructor* pourrait être vecteur de ce virus (Gauthier *et al.*, 2007).

4.6.3. Cas particulier du CBPV

Les particules virales du virus de la paralysie chronique sont de taille hétérogène et présentent une forme inhabituelle anisométrique. Les virions mesurent généralement 60 nm de longueur pour 20 à 30 nm de diamètre. Les particules virales ne contiendraient qu'une seule protéine de structure de 23.5 kDa. La classification de ce virus n'est toujours pas établie (King *et al.*, 2011).

Le génome du CBPV est constitué de deux brins d'ARN (Figure 27) : ARN-1 constitué de 3674 paires de bases et 2305 pour le second brin ARN-2 (Ribiere *et al.*, 2010).

Le CBPV serait fréquemment associé à un virus satellite (CBPSV – Chronic Bee Paralysis Satellite Virus) dont les particules virales mesurent 17 nm de diamètre et qui aurait une protéine de capside de 15 kDa. Ce serait le seul membre de son sous-groupe taxonomique (King *et al.*, 2011).

Ce virus a une répartition mondiale et est retrouvé sur tous les continents (Tentcheva *et al.*, 2004, Antunez *et al.*, 2006, Chen *et al.*, 2011, Li *et al.*, 2016, Pirk *et al.*, 2016). Le virus peut aussi être retrouvé chez d'autres hôtes comme les fourmis ou bien encore varroa (Celle *et al.*, 2008).

L'impact sanitaire du CBPV est variable et peut être asymptomatique. Il existe deux formes de maladie générées par le CBPV : le syndrome de type 1 et le syndrome de type 2. Les deux syndromes peuvent être concomitants (De Miranda *et al.*, 2012). La symptomatologie est fonction de la charge virale. En effet, dans les colonies asymptomatiques, la charge virale est relativement faible et uniforme dans les différentes castes d'abeilles ($\leq 10^4$ copies de CBPV) alors que dans les colonies symptomatiques, les

Tableau 4 : Critères de diagnose des différentes espèces d'*Acarapis* d'après Delfinado-Baker and Baker, 1982

Critères	*A. dorsalis*	*A. externus*	*A. woodi*
Sillon ventral coxal	Profond	Court	Plat
Espace entre les stigmates	16.7 µm	16.8 µm	13.9 µm
Longueur du tarse (4ème paire de pattes)	7.6 µm	11.4 µm	7.5 µm

vieilles abeilles ont une charge virale importante (10^{13} copies) et supérieure à celle mesurée dans les abeilles d'intérieur (10^{6} copies) (Ribiere *et al.*, 2010).

Dans le cas de la paralysie chronique de type 1 (De Miranda *et al.*, 2012), autrement appelé « mal des forêts » les abeilles présentent les symptômes suivants : tremblements anormaux de l'abdomen et des ailes, ataxie, incapacité à décoller, abeilles rampantes, abdomen distendus. Dans les cas les plus sévères on peut retrouver des tapis d'abeilles devant les ruches voire même constater la mort de la colonie (Ribiere *et al.*, 2010). L'évolution peut être très rapide avec la mort de la colonie en une semaine (Vidal-Naquet, 2015).

Dans le cas du syndrome de type 2, les abeilles semblent être de taille plus petite avec un abdomen légèrement raccourci. Ces abeilles perdent leur poil, semblent glabres, sombres et brillantes. Au fur et à mesure du développement de l'infection les abeilles perdent leur capacité de vol.

Si ce virus peut être considéré comme étant d'importance majeure dans les écosystèmes tempérés (Ribiere *et al.*, 2010) en Afrique le virus ne semble pas être une préoccupation majeure (Pirk *et al.*, 2016).

4.7. Les arthropodes impactant la santé de la colonie (hors varroa)

4.7.1. Les acariens du genre *Acarapis*

Les acariens du genre *Acarapis* appartiennent à la famille des Tarsonemidae et l'ordre des Trombidiformes.

Trois espèces du genre *Acarapis* parasitent les abeilles (*A. dorsalis*, *A. externus* et *A. woodi*) en se nourrissant de leur hémolymphe (Delfinado-Baker and Baker, 1982) mais la biologie d'*A. dorsalis* et *A. externus* a été très peu étudiée de même que leur rôle pathogène et leur impact sur la santé de l'abeille mellifère (Ibay, 1989). Les espèces sont morphologiquement proches mais diffèrent selon quelques critères fiables comme le sillon ventral coxal, l'espace entre les stigmates et la longueur du tarse de la quatrième paire de pattes (Tableau 4). Leur répartition est mondiale (Delfinado-Baker and Baker, 1982).

Seul *A. woodi* est connu pour jouer un rôle pathogène majeur. Il est responsable de l'acariose des trachées. Il parasite *A. mellifera* et *A. cerana* (Sakamoto *et al.*, 2017). *A. woodi* vit dans les trachées respiratoires des trois castes d'abeilles avec une préférence pour les trachées de faux-bourdons (Villa and Danka, 2005). Les acariens vivent, se reproduisent et se

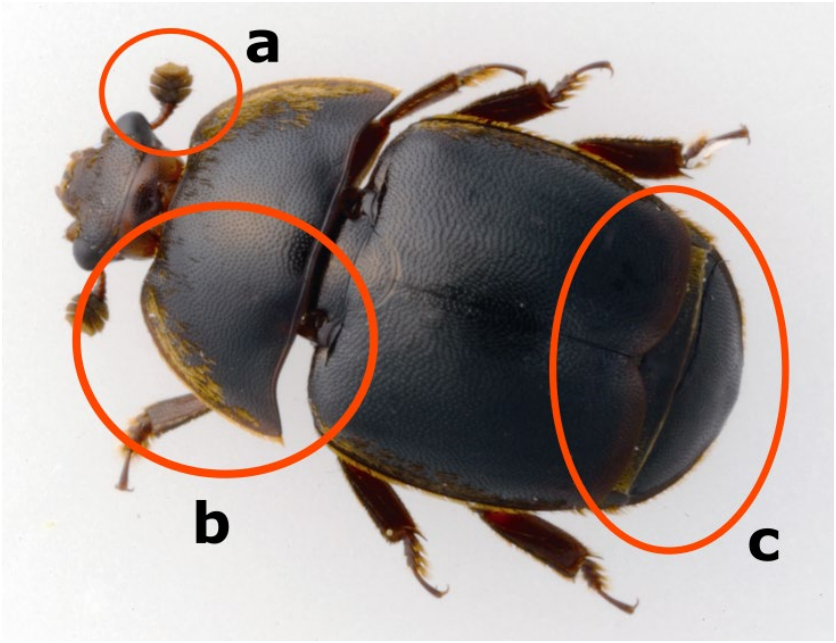


Figure 28 : Photographie d'individu adulte *Aethina tumida* présentant ses signes caractéristiques : (a) antennes en massue, (b) pronotum bien séparé de la tête et de l'abdomen, (c) élytres ne recouvrant pas complètement l'abdomen (UK Crown Copyright ©)

nourrissent dans la large trachée prothoracique même si on peut également les retrouver dans les sacs aériens (Sammataro *et al.*, 2000).

Cet acarien de forme ovoïde et de petite taille n'est pas détectable à l'œil nu. La femelle mesure environ 140-175 µm × 75-84 µm. Le mâle est quant à lui légèrement plus petit : 125-136 µm × 60-77 µm (Delfinado-Baker and Baker, 1982).

Le cycle de reproduction se déroule dans les trachées. La femelle va déposer entre 5 et 20 œufs. Les œufs mâles éclosent plus rapidement que les œufs femelles (11-12 jours contre 14-15 jours). Le cycle complet se réalise en 21 jours (Fernández, 1999). Après leur accouplement, les jeunes *Acarapis* vont migrer sur le thorax de l'abeille et vont ainsi pouvoir infester d'autres abeilles. Ils ont une préférence pour les jeunes abeilles (Fernández, 1999).

L'infestation par *A. woodi* peut être unilatérale ou bilatérale. La population d'acariens présente dans les trachées peut conduire à une obstruction de celle-ci notamment par l'accumulation de débris, déchets et de cadavres d'acariens. Les muscles alaires ainsi que le cerveau se retrouvent alors en situation d'hypoxie. La spoliation d'hémolymphe liée au régime alimentaire du parasite peut en conjonction avec les autres facteurs aboutir à la mort de l'abeille (Vidal-Naquet, 2015).

Bien qu'une infestation asymptomatique soit possible, les principaux symptômes vont être des abeilles traînantes pouvant présenter des ailes disloquées (K-wings) et parfois des signes digestifs comme de la diarrhée peuvent être associés. Dans les cas les plus graves, on peut constater la mort de la colonie.

A. woodi serait potentiellement vecteur de APV, CBPB et KBV (Scott-Dupree *et al.*, 1995).

4.7.2. *Aethina tumida*

Aethina tumida encore appelé « petit coléoptère des ruches » (PCR) est un coléoptère appartenant à la famille des Nitidulinae comprenant plus de 2500 espèces décrites.

Le petit coléoptère des ruches est, comme son nom vernaculaire l'indique, de petite taille : il mesure environ 5,7 mm de longueur pour 3,2 mm de largeur (Ellis Jr, 2002). *A. tumida* est de couleur brun à noire avec une tête, un pronotum et un abdomen parfaitement séparés. Ses antennes en massue ont une forme caractéristique. Les élytres ne recouvrent pas complètement l'abdomen, laissant son extrémité visible (Figure 28).

Ces deux dernières caractéristiques morphologiques (forme typique des antennes et élytres ne recouvrant pas l'abdomen) sont des signes caractéristiques de l'espèce.

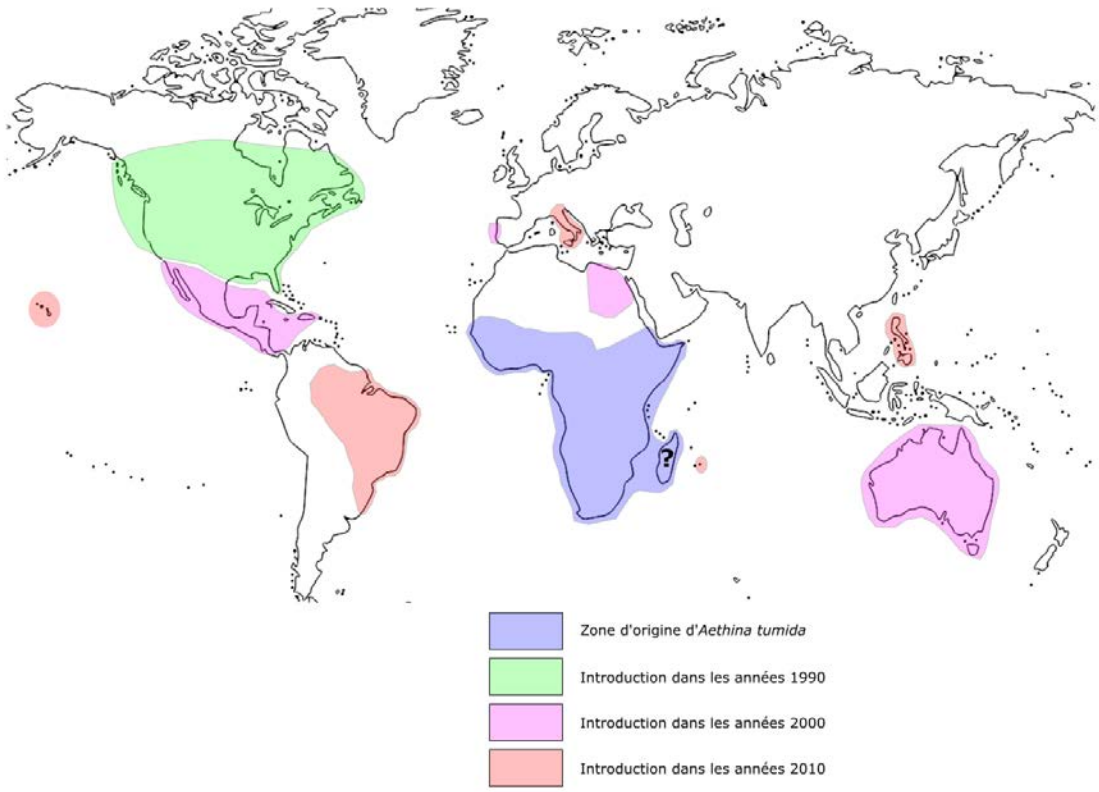


Figure 29 : Carte de répartition mondiale d'*Aethina tumida* et les périodes d'invasion hors de sa zone d'endémie (Afrique subsaharienne)

L'adulte a une durée de vie qui est comprise entre 1 et 12 mois (jusqu'à 16 mois en conditions expérimentales (Somerville, 2003)). Les œufs éclosent entre 24h et 3 jours. Si l'humidité est inférieure à 34% les œufs n'éclosent pas. Les larves se nourrissent pendant 3 à 10 jours et ensuite déambulent dans la ruche ou le nid et peuvent s'agglutiner dans un coin généralement pendant une vingtaine de jours maximum avant de quitter le nid pour aller s'empuper dans le sol à proximité. Les larves peuvent survivre 61 jours sans nourriture (Meikle *et al.*, 2012). Enfin la durée de pupaison est comprise entre 13 et 25 jours. Malgré sa petite taille, l'adulte est capable de voler pour se disperser à des distances supérieures à 10 km.

Le PCR est originaire d'Afrique subsaharienne. Il est présent à Madagascar où il pourrait être indigène (Rasolofoarivao *et al.*, 2013). Si une infestation de colonie d'abeilles d'origine africaine ou africanisées par le PCR n'a pas de conséquence sanitaire grave, les abeilles européennes sont quant à elles beaucoup plus sensibles. Une colonie d'abeilles européennes forte peut être décimée en deux semaines suite à l'infestation (Neumann and Carreck, 2010). En revanche, selon leurs zones d'origine elles ne résistent pas de la même façon. Aux USA, les taux de mortalité observés sont supérieurs chez les colonies d'origine italienne que chez celles d'origine russe (De Guzman, 2006, de Guzman *et al.*, 2008a).

Le rôle pathogène du PCR est donc discuté (Neumann *et al.*, 2016). Pour certains auteurs il est considéré comme un parasite grave des colonies puisqu'il est capable de générer des mortalités importantes et pour d'autres, basé sur les expériences africaines, c'est un parasite sans rôle pathogène majeur et qui peut être rapproché des détritivores ou équarrisseurs (*scavengers*) intervenant dans la colonie comme les teignes (*Galleria mellonella* et *Achroea grisella*).

Depuis sa première détection en dehors de sa zone d'endémie en 1996 aux USA (Hood, 1999) et son expansion mondiale, le PCR est considéré comme une espèce exotique envahissante. Il est désormais en pleine expansion et est installé sur tous les continents (Amérique, Europe, Asie et Australie) (Figure 29). En France c'est un danger sanitaire de première catégorie et au niveau international c'est une maladie notifiable à l'OIE.

Au-delà de son extension en dehors de sa zone géographique, le PCR a élargi son spectre d'hôtes en parasitant *Apis cerana* ainsi que d'autres espèces d'abeilles de la zone indonésienne (Neumann *et al.*, 2016) et *Apis florea* lors de son introduction accidentelle en Ethiopie (Bezabih *et al.*, 2014).

Depuis son installation en Italie, la surveillance du PCR est devenue un enjeu majeur en Europe. Un test de biologie moléculaire a récemment été développé (Silacci *et al.*, 2018).

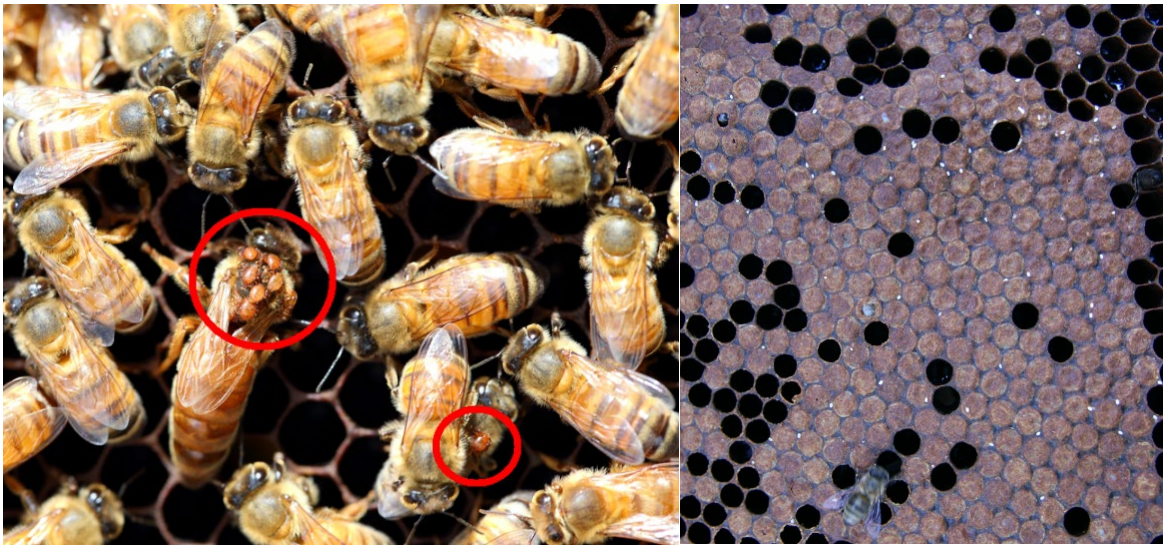


Figure 30 : *Braula pretoriensis* adultes sur le thorax d'une reine (*A. mellifera ligustica* à Rodrigues) ; ponte de *B. pretoriensis* sur colonie infestée par *V. destructor* (Maurice) (©Olivier Esnault)

4.7.3. *Braula pretoriensis*

Les insectes du genre *Braula* sont des diptères aptères appartenant à la famille des *Braulidae* et communément appelés « poux de l'abeille ». Les *Braula* sont des insectes de petite taille (entre 1 et 2 mm de longueur) qui se positionnent sur la tête et le thorax des abeilles avec une préférence marquée pour la reine (Vidal-Naquet, 2015) (Figure 30).

Dans la famille des *Braulidae*, deux genres affectent les abeilles du genre *Apis* : *Braula* et *Megabraula*. Il existe cinq espèces de *Braula* : *B. coeca*, *B. kohli*, *B. orientalis*, *B. pretoriensis* et *B. schmitzii*. *B. pretoriensis* est très proche de *B. coeca* et il a été décrit avec des spécimens originaires de République Sud-Africaine, Tanzanie et de l'ancien Congo (Örösi-Pál, 1938). Dans la zone Océan Indien on ne le retrouve que sur les îles Maurice et Rodrigues.

L'espèce de *Braula* la plus connue est *B. coeca* qui se retrouve sur tous les continents mais principalement en Europe, dont la France métropolitaine (île d'Ouessant particulièrement). Leur rôle pathogène est discuté.

Le cycle de *B. pretoriensis* n'est pas connu à proprement parler à la différence de celui de *B. coeca*. La femelle *B. coeca* va déposer ses œufs un peu partout dans la ruche. Ceux-ci sont ovales et de couleur nacrée. Les œufs éclosent entre 2 et 7,4 jours (Dobson, 1999) et la larve qui ressemble à un asticot se développera entre 7 et 11 jours sous les opercules où elle construit des tunnels donnant ainsi un aspect craquelé (Somerville, 2007b). Il semblerait que les larves se nourrissent de miel et de pollen (Ellis and Nalen, 2013).

L'adulte est un kleptoparasite qui va « parasiter » la trophallaxie entre abeilles (Grimaldi and Underwood, 1986). Il est capable d'induire la régurgitation des abeilles en leur caressant le labium jusqu'à ce qu'elles sortent leur langue déclenchant alors la trophallaxie (Somerville, 2007b). Le taux de parasitisme dans les colonies varie de 16 à 24% (Zaitoun and Al-Ghzawi, 2008).

B. coeca ne semble pas générer d'impact sanitaire grave ni transmettre d'autres agents pathogènes (virus, bactéries, etc.). Dans les cas les plus graves, il peut gêner la ponte de la reine (Hamida, 1999). Enfin, le parasite a développé un mimétisme d'odeur qui le rend quasiment indétectable par les gardiennes (Martin and Bayfield, 2014).*B. coeca* se répand par la dérive des abeilles ou le pillage.

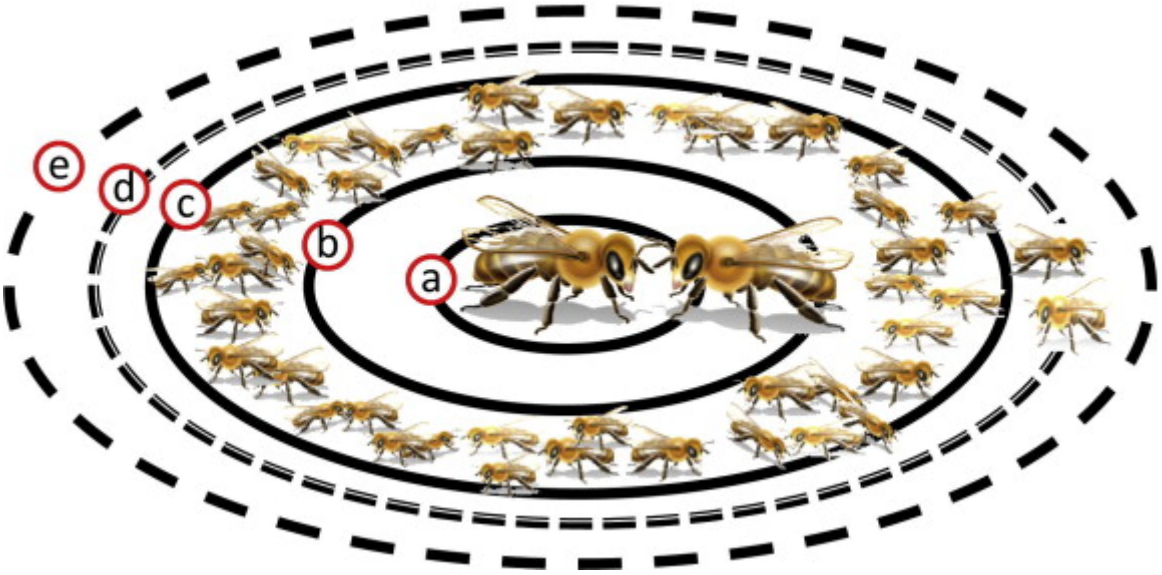


Figure 31 : Présentation des différents niveaux de défense chez l'abeille mellifère : (a) défenses individuelles (b) défense deux à deux : cas du grooming, (c) polyéthisme temporel premettant la différenciation des tâches, (d) limitation de l'entrée d'agents pathogènes et (e) utilisation de résines ou d'autres éléments présents dans l'environnement permettant la protection de la colonie (Evans and Spivak, 2010)

5. Les mécanismes de défense de l'abeille mellifère contre les agents pathogènes

L'abeille a su développer de nombreux mécanismes de défense contre les différents agents pathogènes pouvant affecter sa santé. L'abeille mellifère étant un insecte eusocial au comportement complexe, les différents mécanismes s'appréhendent à la fois à l'échelle individuelle mais aussi sociale et comportementale (Figure 31).

5.1.A l'échelle individuelle

Les premiers niveaux de défense chez l'abeille sont sa cuticule et les différentes barrières épithéliales, couches cellulaires qui sont à l'interface entre le milieu extérieur et le milieu intérieur. L'intégrité physique de ces barrières va limiter l'entrée ou l'adhérence d'agents pathogènes (Evans and Spivak, 2010).

5.1.1. La réponse immunitaire

Les hémocytes présents dans l'hémolymphe jouent un rôle majeur dans la gestion des infections bactériennes et fongiques (Glinski and Buczek, 2003).

Des mécanismes simples comme l'encapsulation, la mélanisation ou la phagocytose constituent une réponse immunitaire non spécifique.

Trois classes d'hémocytes sont impliqués dans la réponse immunitaire : les plasmocytes, les cellules cristallines et les lamellocytes (Evans and Spivak, 2010). Enfin il existe aussi circulant dans l'hémolymphe des peptides antibactériens (apidecines, abecines), des enzymes comme le lysozyme ou bien des kinases et des polypeptides comme les hymenoptecines qui jouent un rôle majeur dans le contrôle des infections bactériennes (Casteels *et al.*, 1993).

5.1.2. La réponse protéique

Il existe quatre types de réponses protéiques quand l'abeille mellifère est exposée à des agents pathogènes : Toll, Imd, Jak/STAT et Jnk (Figure 32). Ces mécanismes de défense contre les agents pathogènes et particulièrement contre les virus ont été étudiés chez la drosophile *Drosophila melanogaster* (Theopold and Dushay, 2007). Pour autant les mécanismes moléculaires impliqués dans ces réponses protéiques, quoique similaires, présentent quelques particularités propres aux abeilles et bourdons (McMenamin *et al.*, 2018).

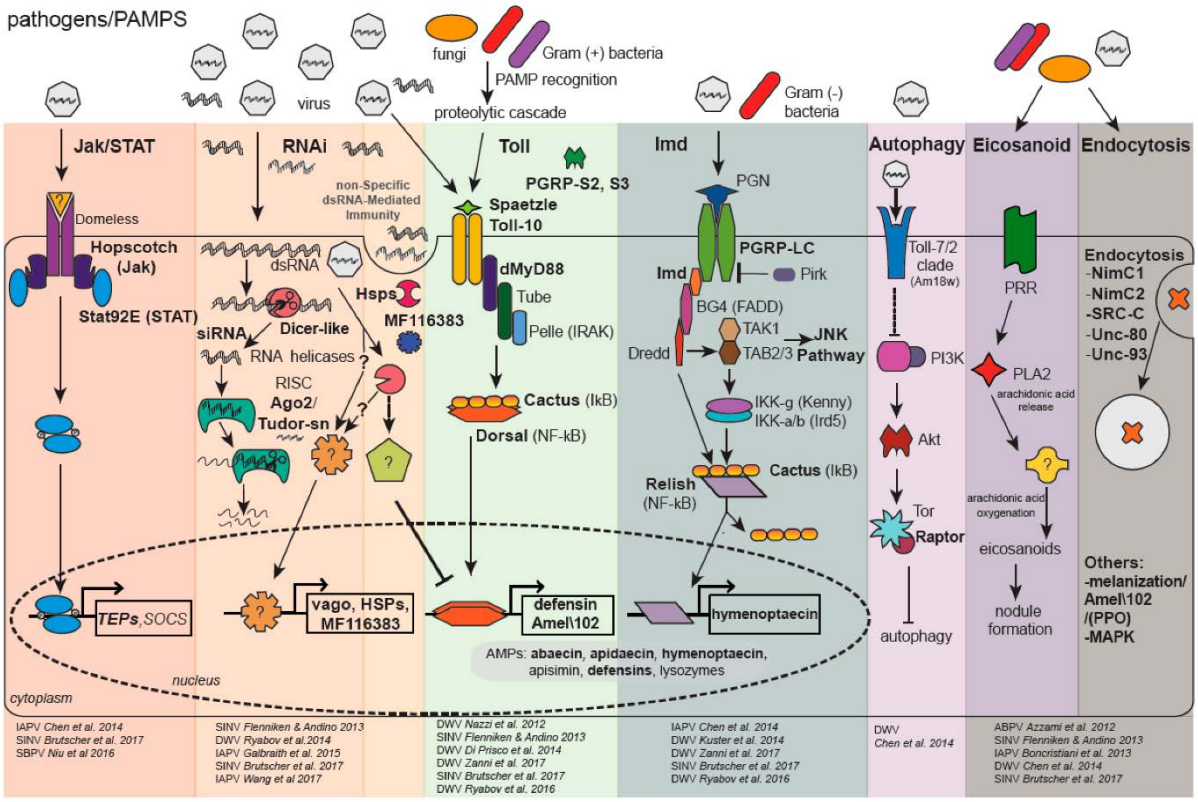


Figure 32 : L'immunité antivirale chez *Apis mellifera* (Brutscher et al., 2015)

Légende : Jak/STAT = Janus kinase/transducteurs de signaux et activateurs de transcription ;TEPS= protéines contenant des thioester ; SOCS = suppresseurs du signal des cytokines ;RNAi = ARN interférence ; dsRNA = ARN double brin ; siRNA = petits ARN interférents ;Ago2 = protéine Argonaute ; RISC = complexes ribo-protéiques (Agaisse et al., 2004) ;PAMPs = motifs moléculaires associés aux pathogènes ; PGN = protéines reconnaissant lepeptidoglycane ; PGRP-LC = protéines reconnaissant le peptidoglycane LC ; JNK = c-Jun Nterminales ;Kinases ; PPO = Pro-phenoloxydase ; MAPK = protéines kinases activées par lamitose ; NF-κB = facteur nucléaire κB

Dans le cadre de la voie Jak/STAT, la reconnaissance d'un agent pathogène ou d'un virus particulièrement par un récepteur génèrera des réactions en cascade impliquant entre autres la synthèse de corps gras en cas de blessure septique mais aussi la prolifération des hémocytes et leur différenciation (Agaisse and Perrimon, 2004, McMenamin *et al.*, 2018).

5.1.3. Le microbiote

Huit espèces de bactéries sont majoritaires dans la composition du microbiote de l'abeille : *Lactobacillus* spp. Firm-c4, *Lactobacillus* spp. Firm-5 (phylum Firmicutes), *Bifidobacterium* spp. (phylum Actinobacteria), *Snodgrassella alvi*, *Gilliamella apicola*, *Frischella perrara*, *Bartonella apis*, and Alpha 2.1 (phylum Proteobacteria) (Kwong and Moran, 2016).

Les abeilles naissantes n'ont quasiment pas de bactéries dans leur tractus digestif. La communauté bactérienne du microbiote se constituera dans les premiers jours de la vie de l'ouvrière via les interactions sociales avec les autres ouvrières plus âgées. La trophallaxie joue un rôle essentiel dans l'ensemencement en bactéries Gram-négatif (*S. alvi*, *G. apicola*, *F. perrara*) alors que les bactéries Gram-positif sont plutôt acquises avec le couvain, le miel ou encore le pain d'abeilles (Powell *et al.*, 2014).

Quand le microbiote est altéré, le métabolisme des abeilles affectées est réduit entraînant un ralentissement de la prise de poids (Zheng *et al.*, 2017). Ces abeilles sont également plus sensibles aux différents agents pathogènes, notamment *Crithidia bombi* (Koch *et al.*, 2012) entraînant des mortalités individuelles mais aussi une diminution de la survie des colonies en cas d'exposition aux antibiotiques (Raymann *et al.*, 2017).

5.2. Les interactions sociales et mécanismes de défenses comportementaux

Les défenses individuelles sont fortement renforcées quand elles sont associées par des interactions comportementales coordonnées. La défense collective de la colonie peut être qualifiée d'immunité sociale (Cremer *et al.*, 2007).

5.2.1. Les comportements d'épouillage

Il existe deux types d'épouillage : l'auto-épouillage et l'allo-épouillage. L'auto-épouillage est réalisé par une abeille seule. Ce toilettage lui permet de pouvoir se débarrasser des débris ou des grains de pollen

qui se retrouvent à la surface de son corps. C'est aussi un excellent moyen pour l'abeille mellifère de gérer les infestations à *Acarapis woodi* (Danka and Villa, 1998). L'allo-épouillage est généré dans la colonie par une danse spécifique (Milum, 1947). Les abeilles adultes s'épouillent mutuellement et se débarrassent des différents débris qui peuvent se retrouver dans les poils du corps. *Apis cerana* présente des comportements d'allo-grooming particulièrement marqués qui lui permettent de gérer la présence de l'acarien ectoparasite varroa (Fries *et al.*, 1996b). Certaines sous-espèces d'abeilles mellifères, particulièrement des sous-espèces africaines (*A. mellifera scuttelata* particulièrement), ont développé des comportements similaires pour gérer les populations d'acariens (Nazzi and Le Conte, 2016, Nganso *et al.*, 2017). Toutefois, toutes les populations d'abeilles mellifères résistantes au varroa n'ont pas un comportement d'épouillage marqué (Kruitwagen *et al.*, 2017).

5.2.2. La nécrophorie

Quand les abeilles meurent dans la ruche, les cadavres sont éliminés à l'extérieur par les ouvrières (Visscher, 1980) limitant ainsi la présence d'agents pathogènes dans le nid. La nécrophorie est un comportement qui est particulièrement répandu chez les fourmis (Howard and Tschinkel, 1976).

5.2.3. La régulation de la température

La colonie peut être considérée comme étant homéotherme avec une température du couvain comprise entre 32 et 34°C. Lors d'infestation de colonies par *Ascosphaera apis*, une mycose du couvain, les ouvrières augmentent la température du couvain avant que les ouvrières ne commencent à éliminer les larves mourantes, suggérant ainsi une détection précoce (pré-symptomatiques) de l'infection par le champignon (Starks *et al.*, 2000).

En cas d'agression par des frelons prédateurs d'abeilles (*Vespa simillima xanthoptera* Cameron), les abeilles mellifères peuvent former une boule autour de l'agresseur en le maintenant au centre de celle-ci. La température au cœur de la boule monte à 44°C alors que dans le même temps, la température mesurée dans le thorax du frelon est de 45.8°C conduisant à la mort de ce denier. La séquence de gestion de la température se fait en trois phase : augmentation de la température rapide, maintien de la température (phase de plateau) et enfin un retour à la normale très rapide (Hosono *et al.*, 2017).

5.2.4. Le comportement hygiénique

Le comportement hygiénique peut être défini comme la capacité collective par les abeilles de détecter dans le couvain operculé les larves ou les nymphes parasitées, malades ou mortes. Ce comportement

présente un intérêt majeur pour la lutte contre les principales maladies du couvain comme la loque américaine ou le couvain plâtré (Spivak and Gilliam, 1998).

5.2.5. Le comportement VSH (varroa sensitive hygiene)

Le VSH est un comportement développé par certaines populations d'abeilles tolérantes à varroa (Locke, 2016). Il assez proche du comportement hygiénique. Varroa se multipliant dans le couvain operculé, les abeilles désoperculent la cellule de couvain operculée et vont éliminer la larve ou la nymphe parasitée contribuant ainsi à diminuer la population de varroa dans la colonie (Harbo and Harris, 2009, Harris *et al.*, 2010, Harris *et al.*, 2012). Le comportement VSH peut être négativement impacté par la présence de DWV. Autrement dit, en présence de DWV, le couvain infesté a plus de risque d'échapper à la détection que sans (Mondet *et al.*, 2016).

Associés à un comportement d'épouillage performant, ces deux facteurs permettent de réduire le succès reproductif de varroa et ainsi expliquer l'existence de colonies survivantes à varroa.

5.2.6. Le comportement SMR (Suppression Mite Reproduction)

Certaines populations d'abeilles mellifères, en désoperculant le couvain operculé arrivent à limiter les capacités reproductives de varroa (Locke, 2016). Les mécanismes permettant le contrôle de la reproduction ne sont pas clairement connus ni précisément identifiés.

Différentes populations d'abeilles ont été décrites comme étant « survivantes » à varroa de par le monde (Locke, 2016). Pour autant, les facteurs de résistance à *V. destructor* ne sont pas clairement définis. Dans les populations d'*A. mellifera scutellata*, les seuls comportements VSH et d'épouillage ne suffisent pas à expliquer les faibles taux de varroa retrouvés dans les colonies (Nganso *et al.*, 2018). Des abeilles originaires d'Afrique du Sud et du Kenya présentent des taux de varroas très bas et limitent le comportement de reproduction de l'acarien (Strauss *et al.*, 2015a, Nganso *et al.*, 2018). D'autres populations d'abeilles ont montré ces traits de caractères, comme des populations d'abeilles africanisées au Brésil (Calderon *et al.*, 2012), une population d'*A. mellifera ligustica* sur l'île de Fernando de Noronha au large du Brésil (Brettell and Martin, 2017), des abeilles à Avignon et dans le Gotland en Suède (Locke and Fries, 2011, Locke *et al.*, 2012), les populations russes d'abeilles aux USA (de Guzman *et al.*, 2008b) et également en Norvège (Oddie *et al.*, 2017).

5.3. La propolis

Quand les colonies d'abeilles ne sont pas domestiquées elles vivent généralement dans une cavité dans des rochers ou dans des arbres creux. Les abeilles éliminent les petits éléments présents dans la cavité et tapissent l'intérieur avec de la propolis rendant ainsi le nid imperméable à l'eau, à l'air et à la lumière (Seeley and Morse, 1976). La propolis de par ses propriétés antibiotiques et antifongiques ralentit le pourrissement du bois. Les abeilles sont capables de momifier dans de la propolis les intrus qui peuvent rentrer dans le nid ou dans la ruche comme des souris, mulots ou bien encore dans les îles tropicales le sphinx tête de mort *Acherontia atropos* qui se nourrit de miel (Visscher, 1980). L'abeille du Cap, *A. mellifera capensis* encapsule le petit coléoptère des ruches dans des loges de propolis (Neumann *et al.*, 2001).

5.4. Les stratégies de gestion d'*A. tumida* par la colonie

Dans sa zone d'endémie, *A tumida* ne semble pas provoquer de dégâts sur les colonies d'abeilles (Neumann *et al.*, 2016) puisque les abeilles ont développé un certain nombres de comportements et de mécanismes de défense capables de réguler l'infestation de la colonie par le PCR :

- attaque par les ouvrières des adultes et des larves par morsure ou piqûre à l'entrée de la ruche (<1% d'efficacité sur les adultes (Neumann *et al.*, 2015))
- gardiennage en réduisant l'entrée du nid ou de la ruche limitant l'entrée des PCR
- parcage par les abeilles en maintenant les PCR adultes dans les coins de la ruche
- encapsulation des PCR dans la propolis
- surveillance active des rayons par les nourrices puisque très peu de PCR sont observés quand la densité d'abeilles est très élevée
- prédation des œufs du PCR par les ouvrières
- désertion en cas de trop forte infestation (Villa, 2004)

6. La santé de l'abeille et les facteurs de risque de mortalités

6.1. Définitions de la santé

La santé est un concept complexe qui peut répondre à plusieurs définitions. Parmi toutes les définitions existantes, l'Organisation Mondiale de la Santé propose une définition dans les principes de la constitution (http://www.who.int/about/mission/fr/) qui serait applicable aux animaux :

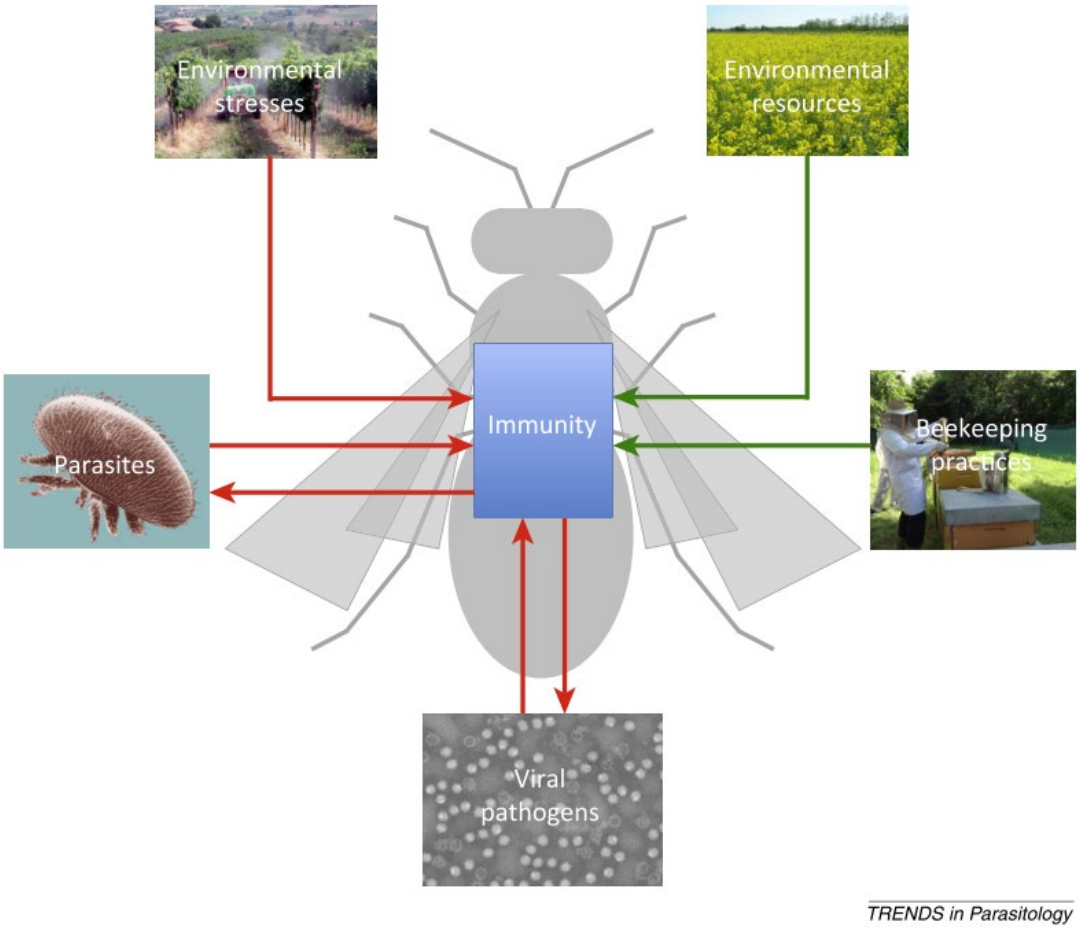


Figure 33 : Représentations des interactions multiples jouant sur la santé de l'abeille. D'après Nazzi and Pennacchio, 2014

« La santé est un état de complet bien-être physique, mental et social et ne consiste pas seulement en une absence de maladie ou d'infirmité ». Le concept de bien-être animal viendra englober cette notion de santé animale. La commission européenne propose les cinq degrés de liberté (freedom) du bien-être animal[26] mais qui sont particulièrement malcommodes à traduire en français :

① Absence de faim et de soif (*freedom from hunger and thirst*)

② Absence d'inconfort (*freedom from discomfort*)

③ Absence de douleur, blessure et maladie (*freedom from pain, injury and disease*)

④ Liberté de pouvoir exprimer un comportement normal (*freedom to express normal behaviour*)

⑤ Absence de peur et de souffrance (*freedom from fear and distress*)

Si les agents pathogènes peuvent facilement influencer cette règle des cinq degrés de libertés, d'autres facteurs les impactent également.

6.2. Les facteurs influençant la santé de l'abeille

Différents agents stresseurs ont un impact sur la santé de l'abeille. Ils peuvent agir seuls ou en synergie. Parmi les principaux, il faut retenir les agents pathogènes qui ont été précédemment listés mais aussi les pesticides, la disponibilité en ressources florales ainsi que l'apiculteur à travers ses pratiques (Figure 33).

6.2.1. Les pesticides

Toutes les différentes classes de pesticides ont un impact sur la santé de l'abeille. Le microbiote de l'abeille mellifère adulte peut se retrouver impacté par le glyphosate (Motta *et al.*, 2018) risquant de la fragiliser vis-à-vis d'agents pathogènes opportunistes. Des résultats similaires sont mis en évidence sur la flore digestive de la larve (Dai *et al.*, 2018). Par ailleurs, des abeilles exposées à des doses auxquelles elles pourraient être exposées au champ montrent des troubles de l'apprentissage et de l'appétit (Herbert *et al.*, 2014). Le paraquat affecte également la taille des oenocytes (cellules des corps

[26] https://ec.europa.eu/food/animals/welfare_en

gras) de la larve même à des concentrations très faibles (Cousin *et al.*, 2013). Cet herbicide est d'ailleurs banni de l'Union Européenne depuis 2007.

Des colonies exposées à des fongicides voient la présence des champignons et levures d'intérêt qui font fermenter le pollen diminuer drastiquement, empêchant ainsi la constitution d'un pain d'abeilles de qualité (Yoder *et al.*, 2013). Les fongicides altèrent de manière générale le métabolisme de l'abeille gênant la production d'ATP au niveau des muscles thoraciques (Mao *et al.*, 2017). Ils sont globalement toxiques pour le couvain en gênant voire bloquant son cycle de développement (Mussen *et al.*, 2004). De la même façon, des colonies de bourdons (*Bombus impatiens*) exposées au chlorothalonil ont montré une moindre productivité (récolte de nectar et pollen) mais aussi une production amoindrie d'ouvrières et une taille des reines réduites (Bernauer *et al.*, 2015).

Les insecticides sont évidemment nocifs pour les abeilles. La deltaméthrine est particulièrement toxique (Chaskopoulou *et al.*, 2014, Thany *et al.*, 2015, Aljedani and Almehmadi, 2016, Pokhrel *et al.*, 2018). Il en va de même pour les organophosporés (Zhu *et al.*, 2014, Chaimanee *et al.*, 2016) et les néonicotinoides (Blacquière *et al.*, 2012, Cutler *et al.*, 2014, Tan *et al.*, 2014, Dively *et al.*, 2015, Zhang and Nieh, 2015, Brandt *et al.*, 2016, Chaimanee *et al.*, 2016). Non seulement toxiques à l'échelle individuelle, les pesticides se potentialisent et créent des cocktails extrêmement nocifs pour les abeilles (Pilling and Jepson, 1993, Zhu *et al.*, 2014). Des colonies exposées conjointement à de la deltaméthrine et à deux fongicides (prochloraz et difénaconazole) étaient incapables de réguler leur température et tombaient en hypothermie (Vandame and Belzunces, 1998).

Enfin, le réchauffement climatique en cours permet à de nombreux ravageurs des cultures d'augmenter leur aire de répartition vers le Nord, particulièrement en Europe (Deutsch *et al.*, 2018). Les itinéraires agricoles n'étant pas adaptés à ces nouvelles menaces, ces nouvelles populations de ravageurs risquent d'être contrôlées par un arsenal chimique impactant alors la santé de l'abeille.

6.2.2. Les synergies pesticides agents pathogènes

Les interactions *Nosema ceranae* avec les néonicotinoides sont parmi les interactions « agent pathogène – pesticides » les plus étudiées in vitro. L'effet potentialisateur des deux associés est très important concernant la mortalité des abeilles individuelles exposées à de très faibles doses de néonicotinoïdes (Alaux *et al.*, 2010, Vidau *et al.*, 2011, Aufauvre *et al.*, 2012, Pettis *et al.*, 2013, Aufauvre *et al.*, 2014, Retschnig *et al.*, 2014a).

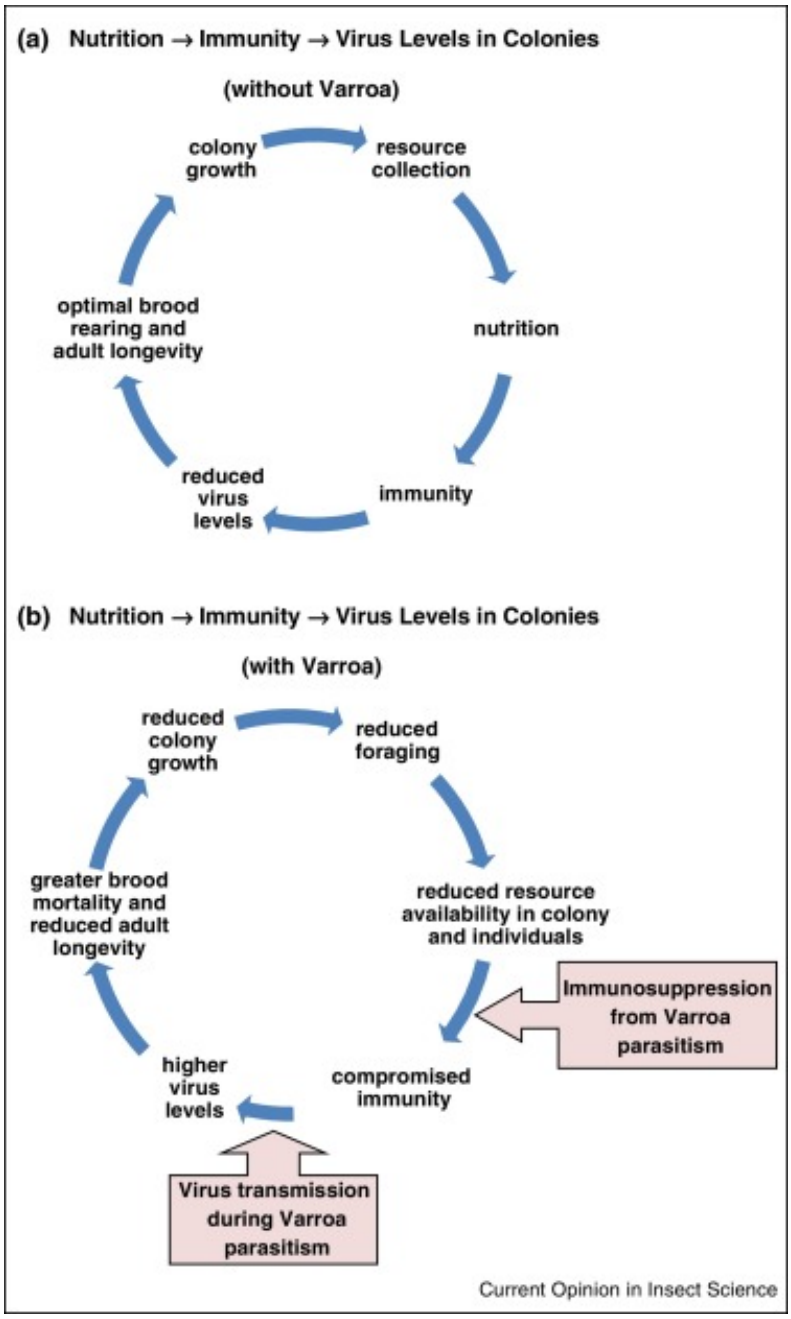


Figure 34 : Relations entre nutrition, immunité et quantités de virus (liés à varroa) influençant la santé de l'abeille (DeGrandi-Hoffman and Chen, 2015)

D’autres interactions entre pesticides et agents pathogènes ont été mises en évidence, comme :

- Varroa/néonicotinoïdes (Gregorc *et al.*, 2012, Abbo *et al.*, 2017)
- *N. ceranae*/herbicides (Abou-Shaara, 2018)
- Virus/fongicides (Degrandi-Hoffman *et al.*, 2015)

6.2.3. Les synergies pathogènes-pathogènes

La varroose est une maladie particulièrement complexe qui illustre bien les synergies entre différents agents pathogènes. La varroose n’est pas simplement due à la seule présence de varroa dans la colonie. Le cortège de virus transmis par le parasite, et particulièrement le rôle crucial du DWV, jouent un rôle majeur dans la pathogénie de la maladie et dans la gravité de son expression clinique (Figure 34) (Roberts *et al.*, 2017). Pourtant, même dans des colonies fortement infestées par varroa les abeilles n’expriment pas systématiquement les symptômes d’ailes déformées. Varroa affaiblit l’immunité individuelle de l’abeille (Shen *et al.*, 2005, Yang and Cox-Foster, 2005) et la fragilise sachant que l’expression clinique des ailes déformées est liée à la charge virale en DWV (de Miranda and Genersch, 2010). Varroa ne transmet pas seulement le DWV. Il transmet également les virus du complexe AKI qui peuvent jouer un rôle majeur dans la gravité de la maladie (Shen *et al.*, 2005).

D’autres synergies peuvent exister comme par exemple entre *N. ceranae* et CBPV (Toplak *et al.*, 2013).

6.2.4. La réduction de la biodiversité

La réduction de la biodiversité a pour conséquence une diminution de la diversité de ressources nutritionnelles qui s’offrent aux abeilles mellifères. Une nutrition adaptée permet le maintien de colonies en bonne santé (Figure 35). En effet les besoins de la colonie sont extrêmement nombreux et variés. La source principale de sucres pour les colonies est le nectar que les abeilles transformeront en miel dès leur retour à la ruche (Nicolson and Human, 2008). Le nectar est asséché jusqu’à un niveau d’humidité compris entre 16 et 20% et grâce au travail de différentes enzymes, le miel sera constitué majoritairement de fructose et de glucose et d’autres trisaccharides (Doner, 1977).

Les larves nécessitent un riche apport protéique au niveau de leur ration alimentaire. Les trois premiers jours de leur vie, les larves sont nourries à la gelée royale qui contient 18% de sucres puis à la gelée nourricière qui est beaucoup plus riche en sucres à hauteur de 45% (Brodschneider and Crailsheim, 2010).

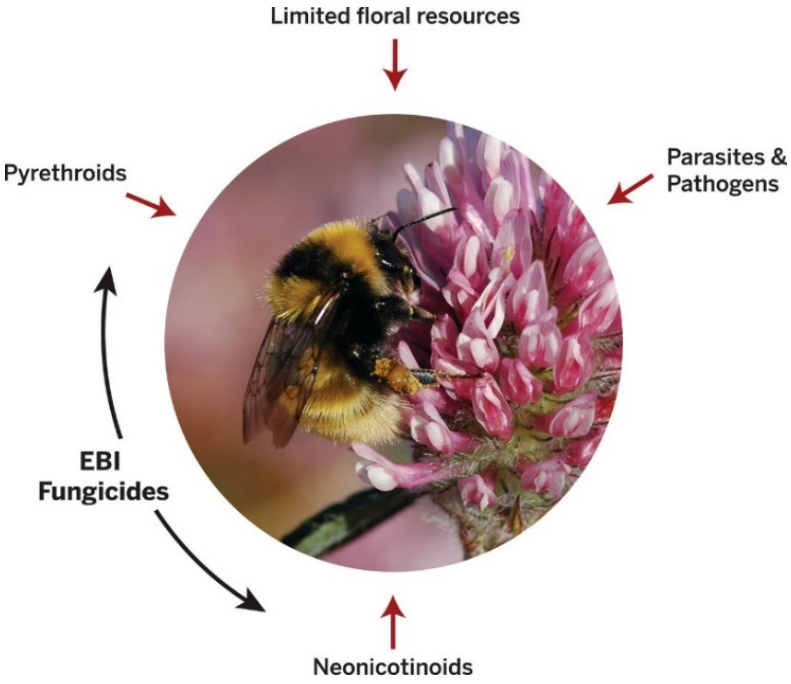


Figure 35 : Synthèse des stresseurs des abeilles sauvages et domestiques qui met l'accent sur des interactions pesticides/ressources florales et parasites/pathogènes (Goulson et al., 2015)

Le pollen est la principale source de protéines pour la colonie et en Europe la colonie peut récolter entre 10 et 26 kg de pollen par an (Crailsheim *et al.*, 1992). Le pollen sera stocké et fermenté (on parle de pain d'abeilles) ce qui lui donne une composition beaucoup plus riche en protéines que le simplepollen frais récolté (Cremonz *et al.*, 1998, Pernal and Currie, 2000). Outre la richesse alimentaire spécifique des pollens, plus la diversité et la disponibilité alimentaire est grande, plus les apports nutritifs sont importants. Ainsi, l'espérance de vie d'abeilles nourries avec différents pollens sera plus longue que pour celles nourries à des pollens monofloraux. De la même façon, la physiologie des ouvrières ainsi que leur résistance à *N. ceranae* sera augmentée avec des pollens polyfloraux (Di Pasquale *et al.*, 2013).

Une colonie carencée en protéines sera sujette au développement de la loque européenne (Forsgren, 2010). Le développement des abeilles sera aussi altéré (Jay, 1964) et un comportement de cannibalisme envers les jeunes larves peut apparaître (Schmickl and Crailsheim, 2001, Schmickl and Crailsheim, 2002). Enfin, une colonie sans provision meurt de faim (vanEngelsdorp and Meixner, 2010).

Dans les écosystèmes agricoles, la disponibilité des ressources florales est limitée et irrégulière fragilisant ainsi la santé de l'abeille (Di Pasquale *et al.*, 2016).

Pour conclure la santé de l'abeille dépend de nombreux facteurs. La complexité des interactions des facteurs de risque de mortalités peut être résumée dans les Figure 34 et Figure 35.

6.2.5. Le rôle de l'apiculteur dans le maintien de ses colonies en bonne santé dans un contexte apicole mondialisé

L'apiculteur en tant qu'éleveur a à assurer la bonne conduite de ses colonies en respectant les cinq degrés de libertés du bien-être animal. Concernant la disponibilité en ressources il doit s'assurer que les abeilles aient suffisamment de ressources et d'eau à proximité (Brodschneider and Crailsheim, 2010). En cas d'absence de réserves dans la colonie l'apiculteur doit nourrir ses colonies afin de surmonter cette période de disette.

La gestion sanitaire des colonies en appliquant des traitements contre le varroa ou en appliquant des mesures zootechniques comme le transvasement dans le cadre de la gestion de la loque américaine font partie intégrante des missions de l'apiculteur et du vétérinaire (Vidal-Naquet, 2015).

La gestion sanitaire de ruchers dans un contexte apicole mondial envahi par varroa est problématique (Nazzi and Pennacchio, 2014). Les apiculteurs ont souvent expérimenté des techniques de lutte alternatives autres que celles préconisées par des vétérinaires et ont fini par générer des résistances

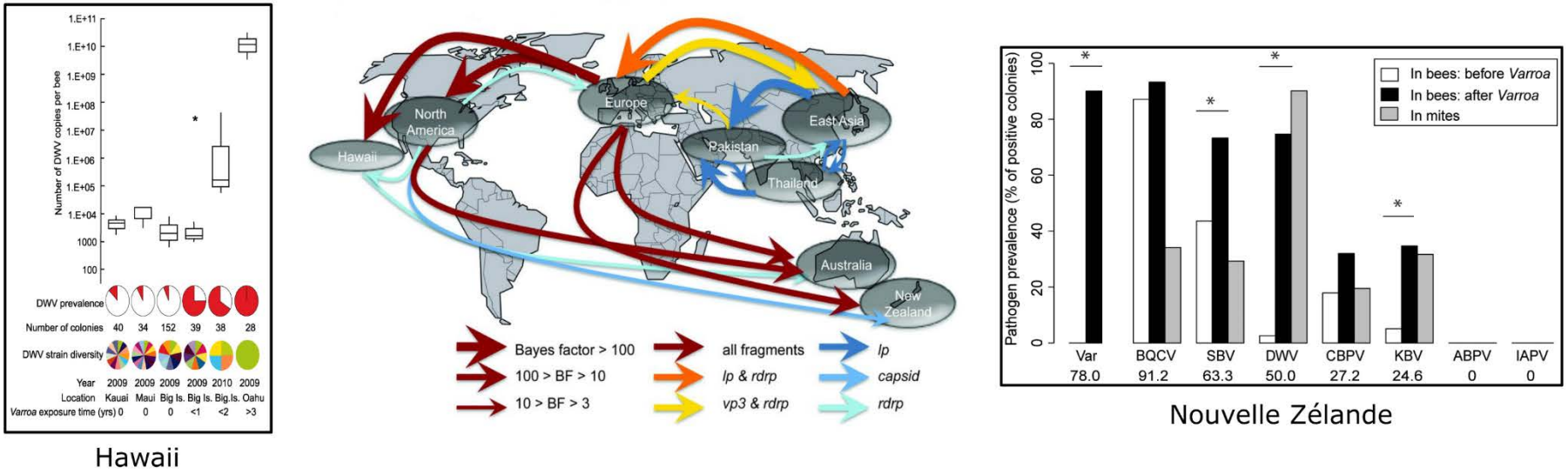


Figure 36 : Relations phylogénétiques des différentes souches de DWV à l'échelle mondiale en relation avec la pandémie mondiale de varroa (Wilfert et al., 2016) avec deux focus particuliers sur la diversité des souches de DWV à Hawaii (à gauche) suite à l'introduction de *V. destructor* (Martin et al., 2012) et en Nouvelle-Zélande sur le front de colonisation du varroa (Mondet et al., 2014)

aux acaricides chez varroa (Martin, 2004, Rodríguez-Dehaibes *et al.*, 2005). Les niveaux de compétences en apiculture jouent également un grand rôle et une étude récente a montré qu'enEurope plus les apiculteurs sont compétents, moins les taux de mortalité sont importants dans leurs ruchers (Jacques *et al.*, 2017).

De tout temps les apiculteurs ont déplacé des colonies d'abeilles à l'échelle mondiale. Ce fut le cas pendant la colonisation du continent Nord-Américain par les Européens où des ruches en paille peuplées ont traversé l'Océan Atlantique en 1621 (Crane, 2013). Au Brésil, des abeilles originaires d'Afrique du Sud (*A. mellifera scutelata*) ont été importées dans les années 1950 et ensuite métissées avec des abeilles européennes (*A. m. ligustica* et *A. m. carnica*) (Winston, 1992). Au même moment l'ectoparasite *Varroa destructor* s'adaptait à *A. mellifera* dans sa zone d'endémie et commençait sa conquête du monde (Figure 17) (Solignac *et al.*, 2005, Rosenkranz *et al.*, 2010, Wilfert *et al.*, 2016). Le rôle de l'Homme et par conséquent de l'apiculteur en tant que principal disséminateur de maladies apiaires est établi depuis de nombreuses années (Figure 36) (Mutinelli, 2002, Mutinelli, 2011, Neumann *et al.*, 2016, Owen, 2017).

7. Le déclin des abeilles

7.1. Historique

Les populations d'abeilles ont toujours eu à faire face à des mortalités. Au 18ème siècle déjà des mortalités parfois importantes de colonies étaient rapportées en Europe occidentale (Schirach, 1769). A la fin du 19ème siècle, aux USA les abeilles « s'évaporaient » et les apiculteurs subissaient des mortalités importantes (Aikin, 1897). Ces mortalités étaient malgré tout ponctuelles et exceptionnelles. La situation sanitaire des abeilles mellifères a commencé à se détériorer de manière importante à la fin des années 1990 avec de nombreuses mortalités de colonies constatées en Europe du Nord (Neumann and Carreck, 2010, Dainat *et al.*, 2012a), en Amérique du Nord (Vanengelsdorp *et al.*, 2009a, Steinhauer *et al.*, 2014, Lee *et al.*, 2015) puis dans l'Europe méditerranéenne (Higes *et al.*, 2009, Higes *et al.*, 2010a).

7.2. Le syndrome d'effondrement des colonies (SED)

Le SED est la traduction française du « Colony Collapse Disorder » (CCD) qui fut décrit en 2009 à la suite de deux années où les mortalités de colonies ont été particulièrement importantes aux USA (Vanengelsdorp *et al.*, 2009a). Le CCD tel que décrit en 2009 montrait sur les mortalités hivernales des

Figure 37 : Point chaud de diversité malgache avec la représentation des îles du Sud-ouest de l'Océan Indien étudiées (© IUCN)

pertes rapides d'ouvrières. Les tentatives de description des cas se sont heurtées à une non-spécificité des symptômes observés. Les facteurs putatifs étaient alors pathogéno-centrés sur une synergie varroa et virus présents dans les colonies (vanEngelsdorp *et al.*, 2009b, Williams *et al.*, 2010). Pendant l'hiver 2008/2009 ce sont 230 000 colonies estimées qui sont mortes (Williams *et al.*, 2010). Dans le même temps, les mortalités annuelles estimées en Afrique du Sud étaient de 29,6% en 2009/2010 et de 46,2% en 2010/2011 (Pirk *et al.*, 2014). Des investigations réalisées en Suisse concernant le CCD étaient similaires en termes de coinfections virales. *N. ceranae* était également retrouvée dans chaque cas (Dainat *et al.*, 2012b) et est aussi suspectée de participer à l'effondrement des colonies (Higes *et al.*, 2009).

7.3. Les mortalités aiguës

Au cours de ces années, plusieurs agents pathogènes furent mis en cause en tant que facteurs explicatifs de ces mortalités importantes. Ce fut le cas de *N. ceranae* en Espagne (Higes *et al.*, 2006, Higes *et al.*, 2007, Higes *et al.*, 2009, Garcia-Palencia *et al.*, 2010, Higes *et al.*, 2013a) et chaque nouveau parasite ou agent pathogène identifié devenait une cause possible des mortalités massives de colonies, comme la mouche parasite *Apocephalus borealis*. Cette mouche parasite initiale de bourdons d'Amérique du Nord a été retrouvée parasitant des abeilles mellifères dans des colonies aux USA (Core *et al.*, 2012). Force est de constater que cette « potentielle menace sanitaire pour les abeilles pouvant contribuer au CCD » n'a depuis plus jamais fait parler d'elle par la suite.

Différentes enquêtes épidémiologiques ont été mises en place en Europe focalisées sur les mortalités de l'année (hivernales et estivales) et ont mis en évidence un ensemble de facteurs de risque tels que les agents pathogènes, la non gestion de varroa et des effets synergiques des pesticides (De Graaf *et al.*, 2016, Dennis and Kemp, 2016, Tsvetkov *et al.*, 2017).

7.4. L'abeille mellifère, espèce phare de la disparition des butineurs

L'abeille mellifère est ce qu'on appelle en biologie de la conservation une espèce phare ou une espèce porte-drapeau (Ducarme *et al.*, 2013). Une espèce phare est utilisée dans le cadre de la biologie de la conservation. Le concept d'espèce phare consiste à mettre en valeur une espèce particulière afin de faire augmenter le soutien offert à la conservation de la biodiversité dans un contexte particulier. Cette stratégie de conservation est efficace pour amasser des fonds, mais la valeur et l'efficacité scientifique sont très contestées puisqu'elles se ne se concentrent que sur une seule espèce. L'abeille mellifère bénéficie d'une très bonne image de marque au sein du grand public (Sumner *et al.*, 2018).

Figure 38 : Ruchers de Madagascar : en haut à gauche : ruche tronc ; en haut à droite : caisse en bois servant de ruche : au milieu à gauche : ruche artisanale en cœur de village ; au milieu à droite : rucher traditionnel avec des ruches de différentes tailles ; en bas à gauche : ruches de type Langstroth financées dans le cadre d'un projet de développement ; en bas à droite : caisse placée en hauteur dans des eucalyptus (>10m) pour piéger des essaims (© Olivier Esnault)

Les différents agents stresseurs auxquels sont soumis les abeilles (les pesticides et particulièrement les insecticides) sont les mêmes pour les autres pollinisateurs sauvages dont les populations s'effondrent à l'échelle mondiale (Ghazoul, 2005, Thomann *et al.*, 2013, Vieira *et al.*, 2013, Lever *et al.*, 2014, Ghazoul, 2015, Rhodes, 2018).

8. Le Sud-Ouest de l'Océan Indien (SOOI)

8.1. Le hotspot de biodiversité malgache

Les îles du Sud-ouest de l'Océan Indien appartiennent au point chaud (hotspot) de biodiversité malgache (Figure 37) (Mittermeier *et al.*, 2011). Ces zones géographiques sont caractérisées par des taux d'endémisme extrêmement élevés et sont menacées notamment par la destruction de leurs habitats. Ce point chaud fait partie des 35 points chauds de biodiversité identifiés sur la planète.

Madagascar et les archipels périphériques concentrent une faune et une flore exceptionnelle. On retrouve 13 000 espèces de plantes (dont 11 600 endémiques), 313 espèces d'oiseaux (183 endémiques), 381 espèces de reptiles (367 endémiques), 164 espèces de poissons d'eau douce (dont 97 endémiques), 249 espèces d'amphibiens endémiques et 192 mammifères endémiques (Mittermeier *et al.*, 2011). Si la plupart des espèces sont d'origine malgache, elles ont aussi une origine asiatique (Warren *et al.*, 2010).

Pourtant la biodiversité exceptionnelle de ce point chaud est extrêmement menacée suite à la colonisation de ces territoires par l'Homme à cause de la destruction des habitats ou de l'introduction d'EEE[27] comme les rats ou les chats (Zavaleta *et al.*, 2001, Magnanou, 2005) La liste des espèces éteintes dont faisaient partie certaines espèces emblématiques comme le dodo mauricien *Raphus cucullatus* (Cheke, 2015) est malheureusement très importante.

8.2. Les différentes îles de l'Océan Indien

8.2.1. Madagascar, une île continentale à forte tradition apicole

Madagascar est une île continentale de 587 040 km² qui était rattaché au super continent Gondwana il y a plus de 160 millions d'années (Coffin and Rabinowitz, 1987). Madagascar se serait ensuite séparée de l'Afrique il y a 130 millions d'années au sein d'un ensemble « Madagascar – Seychelles – Inde »

[27] Espèce Exotique Envahissante

Figure 39 : Ruchers des Seychelles : en haut à gauche : ruches à barrettes traditionnelles ; en haut à droite : barrettes faites par l'apiculteur et sur laquelle les abeilles construisent les rayons ; en bas à gauche : ruches modernes de type Dadant 10 cadres ; en bas à droite : ruche à barrettes d'un format différent de celles en haut (© Olivier Esnault)

(Coffin and Rabinowitz, 1987) qui se serait lui-même scindé en deux groupes il y a 88 millions d'années : un groupe « Madagascar » et un groupe « Seychelles- Inde » (Coffin and Rabinowitz, 1987). L'île aurait été colonisée par l'homme entre -1 500 et -2 000 ans avant notre ère (Burney *et al.*, 2004). L'apiculture y revêt une grande importance puisque c'est assurément un des grands pays apicoles du SOOI. D'après un recensement national datant de 1988, 5 839 apiculteurs étaient affiliés à 132 groupements. On retrouvait alors 14 455 ruches réparties en 12 741 ruches traditionnelles et 1 741 ruches à cadres. Le miel est largement utilisé dans les ménages malgaches ainsi qu'en cosmétique, en confiserie et pâtisserie. En 1929, la production de miel s'élevait à 38 000 tonnes dont 25 000 ont été exportées.

L'apiculture malgache est relativement rudimentaire avec l'utilisation de ruches troncs, de récipients ou de caisses servant d'abri aux colonies. L'apiculture moderne serait pratiquée par 3% des apiculteurs, utilisant des modèles de ruches de type Dadant ou Langstroth (Figure 38). L'apicueillette est pratiquée de manière traditionnelle à Madagascar et particulièrement renseignée sur la côte Est (Crane, 2013).

En 2004, le cheptel apiaire malgache était déclaré indemne de maladies graves CITE 2004. En 2010, *V. destructor* fut mis en évidence sur des mortalités aiguës générant des mortalités très importantes (Rasolofoarivao *et al.*, 2013).

8.2.2. Les Seychelles, un archipel continental à la tradition apicole modérée.

L'archipel des Seychelles est constitué d'îles continentales qui se sont détachées du continent africain et d'îles coralliennes. Les trois principales îles des Seychelles (Praslin, Mahé et La Digue) sont granitiques. L'apiculture seychelloise est peu professionnalisée avec quelques ruchers modernes et une grande majorité de ruches traditionnelles (Figure 39). Très peu de données sont disponibles. En 1766, une expédition française a déclaré avoir observé des abeilles mais pas de ruches. Des abeilles noires européennes (vraisemblablement *A. m. mellifera*) auraient été importées de Maurice (Crane, 2013).

Toutefois une étude sur différents produits de la ruche a montré la présence de certains pesticides à l'état de traces (<15 ppb). Six insecticides et 3 fongicides ont été mis en évidence dans le miel, 8 insecticides dans la cire et 4 insecticides ont été retrouvés dans le pollen (Muli *et al.*, 2018).

8.2.3. Les Mascareignes, un archipel de point chaud volcanique à l'anthropisation récente et de forte tradition apicole

Les îles des Mascareignes (La Réunion, Maurice et Rodrigues) sont des îles volcaniques issues d'un volcanisme de point chaud. L'île de La Réunion est celle où la biodiversité est la mieux préservée avec

Figure 40 : Ruchers à La Réunion : en haut à gauche : rucher avec des ruches connectées de type langstroth ; en haut à droite : rucher à barrettes traditionnel dans le cirque de Mafate ; en bas à gauche : rayon construit sur barrette ; en bas à droite : rucher de ruches bourbon (© Olivier Esnault)

25% des habitats originels encore intègres, notamment grâce à son relief particulièrement abrupt (Strasberg *et al.*, 2005). Les îles des Mascareignes ont été découvertes par des navigateurs arabes au XIVème siècle et par les portugais au XVIème siècle. Les premières colonisations pérennes ont eu lieu en 1639 à Maurice par des néerlandais, les français se sont installés en 1660 à La Réunion, à Rodrigues en 1735 et aux Seychelles en 1770.

8.2.3.1. La Réunion

La Réunion a un âge estimé à environ 2,0 ± 0,05 millions d'années (McDougall, 1971, Montaggioni, 1976, Hume, 2005). L'île est située à environ 850 km de la côte Est malgache et a une superficie de 2512 km². C'est un département français d'outre-mer. L'île est caractérisée par un relief particulier avec des cirques, pitons et remparts. Le piton des neiges est le point culminant régional avec une altitude de 3 069 m. En 2013, l'île comptait 274 apiculteurs déclarés[28].

Il y a 2 miellées principales à La Réunion : la miellée de baies roses *Schinus terebenthifolius* en mars-avril et la miellée de letchis *Litchi sinensis* en août-septembre. La population d'apiculteurs est répartie en 3 groupes : les professionnels vivant exclusivement de l'apiculture et détenant plus de 60 ruches, les semi-professionnels vivant pour partie du revenu généré par l'apiculture et les apiculteurs de loisir détenant moins de 60 colonies. Malgré tout, les apiculteurs n'arrivent pas à couvrir les besoins du marché local et en 2013 248 tonnes de miel ont été importées[29].

Le niveau technique des apiculteurs est le reflet de leurs statuts. Les apiculteurs professionnels ont une plus grande maîtrise apicole que les semi-professionnels. Le niveau technique des apiculteurs de loisir ou leurs connaissances apicoles sont moins élevés (Aymé, 2014, Esnault *et al.*, 2014). Les facteurs discriminants entre les populations concernaient des indicateurs techniques comme l'élevage de reine, la pratique de la transhumance, la sélection des souches ou encore la maîtrise du nourrissement. Les pratiques apicoles sont diverses à La Réunion avec des ruches à barrettes traditionnelles qui sont encore répandues dans le cirque de Mafate. Partout ailleurs dans l'île les ruches majoritairement utilisées sont la ruche « bourbon » (une ruche typique) et la ruche Langstroth (Figure 40). Un article décrivant la typologie de la population d'apiculteurs à La Réunion et paru dans la « santé de l'abeille » est disponible en ANNEXE 5.

L'état de santé des abeilles réunionnaises était très bon avec l'hypothèse d'une absence de *V. destructor*, d'*A tumida* et de *P. larvae* (Allier *et al.*, 2010). Pourtant, des abeilles européennes ont été

[28] GDS Réunion service apiculture
[29] Chiffres douanes, Ministère de l'Economie et des Finances

Figure 41 : Ruchers à Maurice : en haut à gauche : essaim maintenu dans un pneu et recouvert d'un morceau de tôle ondulée ; en haut à droite : ruche de type langstroth 12 cadres isolée ; en bas : ruches de type langstroth 12 cadres posées sur le toit d'une habitation (© Olivier Esnault)

importées sur l'île jusqu'en 1982 (Aymé, 2014).

Concernant la présence de polluants dans l'environnement réunionnais, des analyses de métaux et de molécules organiques avaient été réalisées sur deux sites : une zone urbaine et une zone naturelle. Si aucun pesticide n'avait été mis en évidence sur les abeilles des deux sites, à certaines périodes de l'année on retrouvait plus de métaux (Na, Cr, NI et V) dans le site urbain. De la même façon, les marqueurs de stress oxydatif étaient plus marqués sur le site urbain (Badiou-Beneteau *et al.*, 2013). Cependant, quatre ans plus tard, une étude mondiale réalisée sur les résidus de néonicotinoïdes dans les miels apporte un autre éclairage sur la situation vis-à-vis des pesticides potentiellement présents à La Réunion. En effet, sur les 2 échantillons de miels analysés à La Réunion, deux néonicotinoïdes ont été mis en évidence : l'acétamipride (présent dans un seul échantillon à hauteur de 0.054 ng/g) et l'imidaclopride (présent dans les deux échantillons avec un maximum à 0.301 ng/g de miel) (Mitchell *et al.*, 2017)

8.2.3.2. Maurice

Maurice est la plus ancienne île des Mascareignes avec un âge estimé à 8,9 ± 0,17 millions d'années (McDougall and Chamalaun, 1969, Montaggioni, 1976, Moore *et al.*, 2011b).

Très peu de données sont disponibles sur l'apiculture mauricienne. Quelques données de la Food and Agriculture Organization (FAO) donnent des informations lacunaires : Des abeilles européennes ont été importées et continuent d'être importées notamment depuis l'Australie par le Service d'Entomologie du ministère de l'Agro-industrie et de la Pêche.

La production totale de miel à Maurice et Rodrigues atteindrait 75 tonnes. Il y a environ 400 apiculteurs recensés pour 2 000 colonies. Quelques exemples de ruchers sont montrés sur la Figure 41. Les principales essences mellifères sont le *Schinus terebenthifolius*, *Eucalyptus tereticornis, Tamarindus indica* ainsi que des fleurs de jardins et quelques cultures. Les principales difficultés pour l'apiculture mauricienne sont climatiques avec les cyclones, les épisodes de sécheresse. La déforestation ainsi que la difficulté à pouvoir installer un rucher ont tendance à décourager les apiculteurs.

L'apiculture est très présente sur l'île avec environ 200 apiculteurs sur l'île. En 2006, l'île comptait 191 apiculteurs et 2313 colonies. 58 tonnes de miel avaient été produites cette année-là (Giraudet *et al.*, 2007). Le nombre de colonies sur l'île a plus que doublé entre 2000 et 2007 (1050 colonies en 2000, 2234 en 2007). Le potentiel mellifère de l'île est surtout tourné vers l'eucalyptus blanc (*Eucalyptus terticornis*), le pongame (*Pongamia glaba*), la liane antigone (*Antigonon leptopus*), le boule de gomme (*Bourginacea cordis*) et le limon (*Citrus aurantifolia*). Ce cycle est résumé sur la Figure 42.

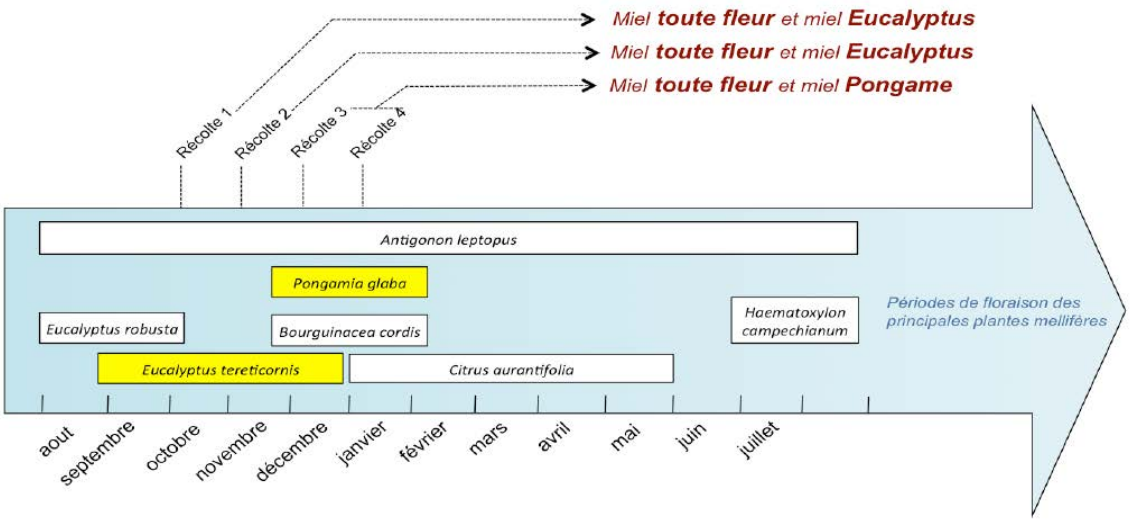


Figure 42 : Calendrier des miellées pour l'île Rodrigues (Belmin, 2010)

Figure 43 : Rucher à Rodrigues : à gauche : rucher avec une ruchette et des ruches Dadant 12 cadres ; à droite : cadre de miel d'Eucalyptus prêt à être récolté (© Olivier Esnault)

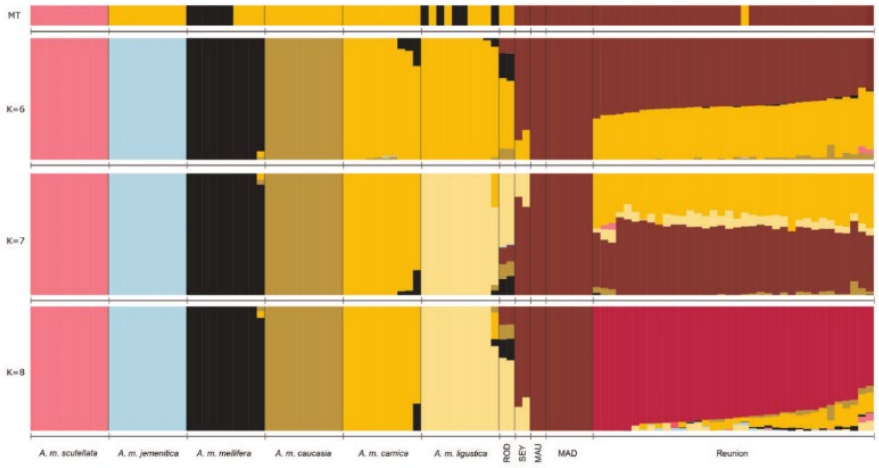


Figure 45 : Structuration génétique des populations d'*Apis mellifera* du Sud-Ouest de l'Océan Indien. La ligne en haut désigne les assignations des ADN mitochondriaux des quatre groupes identifiés. Les lignes suivantes représentent les mélanges représentés pour 6 à 8 fonds génétiques (Wragg et al., 2018)

8.2.3.3. Rodrigues

Selon la datation des laves, l'âge de Rodrigues est estimée à 1,5 ± 0,05 millions d'années (McDougall, 1965, Montaggioni, 1976). A cause de l'érosion et de l'enfoncement de l'île dans l'océan (Hume, 2005), Rodrigues serait en réalité aussi âgée que Maurice (Thébaud *et al.*, 2009). L'île est de petite taille (104 km²) et située à 653 km à l'Est des côtes mauriciennes. Administrativement, Rodrigues fait partie intégrante de la République de Maurice avec un statut lui conférant une certaine autonomie de gestion.

L'île étant très petite, elle est soumise aux aléas climatiques, notamment les épisodes de sécheresse et les cyclones. Dans les années 40, l'apiculture était très répandue à Rodrigues et connaissait un certain succès. Dans les années 70, des épisodes successifs de sécheresse et de cyclones intenses auraient décimé toutes les colonies de l'île. En 1981, sept reines en provenance des USA auraient été introduites par les techniciens de la division entomologie du ministère de l'Agro Industrie de Maurice. D'après l'un d'entre eux, 6 étaient des *Apis mellifera ligustica* et une hybride *A. m. ligustica* × *A. m. mellifera* (Belmin, 2010).

8.3. Les abeilles de l'Océan Indien

Apis mellifera unicolor (Latreille, 1804) est la sous-espèce endémique de Madagascar. Sur la Grande Île la population est assez homogène avec une assez faible diversité génétique. La population d'abeilles locales peut être scindé en deux sous-groupes génétiques correspondant à des secteurs géographiques différents malgré la destruction d'habitats naturels en cours à Madagascar (Rasolofoarivao *et al.*, 2015a). Deux écotypes ont été identifiés sur l'île (Ralalaharisoa-Ramamonjisoa *et al.*, 1996).

A. m. unicolor est la sous-espèce dominante dans le Sud-Ouest de l'Océan Indien où la lignée A est présente à 100% aux Seychelles, 95,2% à La Réunion et à seulement 54,2% à Maurice. Un nouvel haplotype mitochondrial A1 a été défini pour le SOOI. Les haplotypes européens C et M ont été retrouvés seulement à La Réunion (4,6%) et en proportion beaucoup plus importante à Maurice (44%) (Techer *et al.*, 2017a). Ces résultats sont montrés sur la Figure 44. De manière plus précise, le fonds génétique africain prédomine à La Réunion et la présence des haplotypes européens s'explique par des importations officielles d'abeilles qui ont eu lieu entre 1875 et 1982 (Aymé, 2014). Par ailleurs, la population d'abeille réunionnaise est très homogène et ne constitue qu'un seul cluster génétique malgré une île à la topographie typique avec la présence de cirques, pitons et remparts (Techer *et al.*, 2017a). Par contre, à Maurice, la situation est différente avec la présence de lignées africaines et européennes et d'hybridation entre ces deux lignées (Figure 44). Des importations régulières d'abeilles

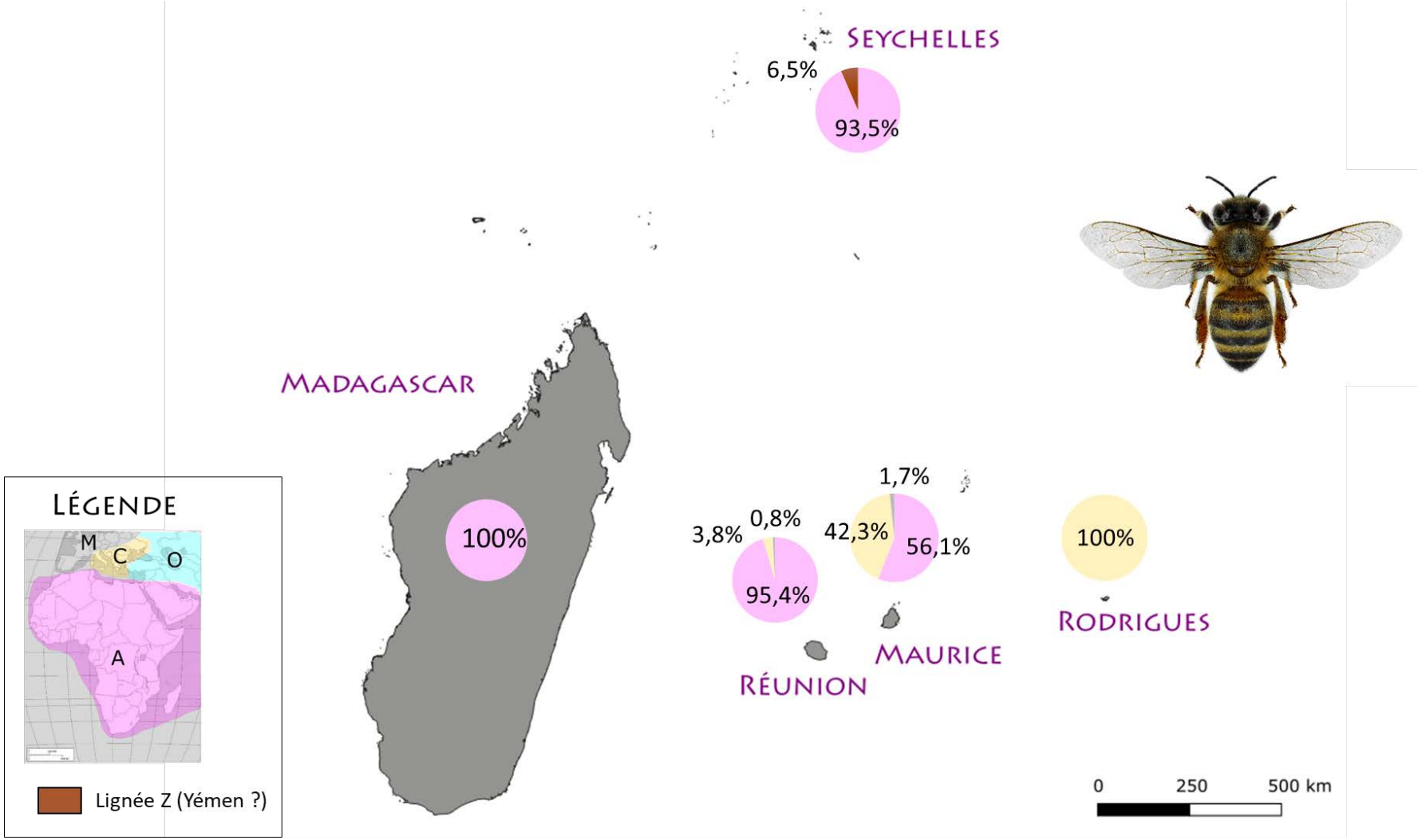


Figure 44 : Représentation des lignées évolutives des abeilles du Sud-Ouest de l'Océan Indien basé sur les analyses des régions CO1-CO2 de l'ADN mitochondrial. D'après Techer et al., 2017a

européennes sont réalisées à Maurice soit à l'initiative d'apiculteurs privés soit du service d'entomologie du ministère de l'agro-industrie et de la pêche (Techer *et al.*, 2017b). Des séquençages complets d'ADN d'abeilles de La Réunion ont été réalisés sur 30 ouvrières et 6 mâles et ces génomes ont été comparés à des génomes d'abeilles issus de la zone Océan Indien et d'Europe. Les analyses ont confirmé un ADN nucléaire majoritairement africain chez les abeilles réunionnaises (53.2 ± 5.9% d'*A. m. unicolor*). Concernant les analyses du génome mitochondrial, seul un échantillon présentait un fonds original européen laissant suggérer des mécanismes de sélection ayant favorisé *A. m. unicolor* d'origine tropicale au détriment des abeilles d'origine européennes possiblement moins adaptées au contexte biogéographique (Wragg *et al.*, 2018).

Concernant Rodrigues, aucune abeille appartenant à la lignée A n'a été identifiée. Les haplotypes retrouvés à Rodrigues sont les haplotypes européens C1 (81,3%) et C2 (18.0%) correspondant respectivement à *A. m. ligustica* et *A. m. carnica* (Techer *et al.*, 2015). Cependant, un fonds génétique africain est existant dans les populations d'abeilles « européennes » de Rodrigues (Figure 45), leur conférant vraisemblablement un caractère adaptatif aux écosystèmes de l'île (Wragg *et al.*, 2018).

Scènes apicoles réunionnaises (© Olivier Esnault)

Objectifs

L'objectif principal de ce travail de thèse a été d'étudier la diversité des agents pathogènes de l'abeille dans le SWIO dans un contexte d'invasion récente de *Varroa destructor* et de mortalités associées.

Le premier objectif de mon manuscrit était de décrire la dynamique de *V. destructor* à grande échelle (chapitre 1) en nous intéressant à la situation sanitaire à Madagascar. Ainsi, nous avons réalisé le suivi de la dynamique de varroa de 2010 à 2017 sur cette île continentale.

Une première enquête sanitaire s'est déroulée 5 ans après la mise en évidence du parasite qui nous a permis de mettre en évidence la diversité des agents pathogènes associés au parasite invasif et leurs impacts. Une seconde enquête de l'invasion de *V. destructor* a été conduite annuellement de 2015 à 2017.

Mon second objectif a été d'opposer des situations épidémiologiques contrastées avec et sans varroa afin de mieux comprendre l'impact direct de cet ectoparasite sur les mortalités d'abeilles. Pour ce faire, nous nous sommes intéressés à la situation sanitaire des colonies à Maurice, Rodrigues et aux Seychelles. A Maurice, l'enquête a été réalisée pendant la détection du parasite alors que sur les deux autres territoires le parasite est absent. Le troisième objectif nous a permis de regarder finement la situation sanitaire avant et après l'invasion de varroa sur un même territoire. Ainsi, nous avons décrit la situation sanitaire (et réalisé un bilan complet de la diversité des agents pathogènes) sur l'île de La Réunion avant l'arrivée de varroa et dans un deuxième temps, nous avons décrit l'invasion de varroa et son impact en termes de mortalités après sa première année d'invasion.

Enfin le dernier objectif de ma thèse s'est focalisé sur l'étude des interactions pathogènes/pathogènes entre varroa et un autre ectoparasite (*Braula pretoriensis)*.

Scènes apicoles malgaches (© Olivier Esnault)

Chapitre 1

Dynamique d'invasion de *Varroa destructor* à Madagascar de 2015 à 2017 et enquête épidémiologique descriptive des pathogènes de l'abeille mellifère

Depuis les années 50, l'acarien *Varroa destructor* inféodé à l'abeille *A. cerana* a réalisé un changement d'hôte et s'est adapté à *A. mellifera* (Akratanakul et Burgett, 1975). Il a ainsi envahi la zone d'origine de l'abeille mellifère et en définitive le monde. La zone de l'océan Indien, indemne jusqu'en 2009 a subit son invasion avec une première détection de cet ectoparasite à Madagascar en 2010, puis à Maurice en 2014 (Esnault et al., 2018) et à la Réunion en 2017 (Esnault et al., soumis). Des suivis de ruchers, réalisés un an après sa première détection à Madagascar, ont montré de très forts taux de mortalité (48 à 100%) (Rasolofoarivao et al., 2013).

Madagascar est une île continentale située à 400 km de l'Afrique orientale qui possède une grande diversité d'écosystèmes (Goodman et al., 2008) avec une exceptionnelle biodiversité caractérisée par un taux d'endémisme élevé (90% des espèces végétales et animales répertoriées (Hobbs, 2016)) et constitue l'un des principaux hostspot de biodiversité (Myers et al., 2000, Mittermeier et al., 2011) mondial. La sous-espèce d'abeille rencontrée à Madagascar est de lignée évolutive africaine et est endémique de l'île : *A. m. unicolor* (Latreille, 1804). Cette abeille mellifère a des caractéristiques particulières, décrite comme la plus petite sous-espèce des 29 existantes, avec une couleur noire, une courte trompe et de longues ailes antérieures (Latreille, 1804). Cette abeille est présente dans tous les écosystèmes malgaches et est en forte interaction avec sa flore. L'arrivée de l'ectoparasite *V. destructor* en 2010 sur l'île, et les mortalités associés observées sur les ruchers en font l'une des principales menaces non seulement pour l'apiculture mais aussi pour la flore endémique.

Les objectifs de cette étude étaient (i) d'évaluer les effets sanitaires du varroa à Madagascar cinq ans après sa première détection et (ii) de réaliser une étude épidémiologique descriptive des agents pathogènes présents sur l'île et d'étudier la diversité des principaux agents pathogènes retrouvés et enfin de (iii) réaliser des enquêtes visant à suivre l'expansion de *V. destructor*.Une enquête épidémiologique couplée à un échantillonnage a été réalisée en 2015 dans la zone avec et sans *V. destructor* sur 23 sites de 23 apiculteurs différents (43 colonies prélevées). La présence de parasites (*V. destructor, Aethina tumida, Galleria mellonella)* a été notée et évaluée quand cela été possible. Les échantillons ont été ensuite analysés au laboratoire afin de rechercher par méthodes moléculaires

différents pathogènes (bactéries : *Paenibacillus larvae*, *Melissococcus plutonius*, 2 microsporidies (*Nosema apis* and *N. ceranae*) et 6 virus (ABPV, BQCV, CBPV, DWV, KBV et SBV.).

Dans un second temps une enquête de suivi de l'expansion de l'ectoparasite a été réalisée de 2015 à 2017.

Aucune bactérie pathogène, agent de loque n'a été mise en évidence. Seule la microsporidie *N. ceranae* (9.5%) et 3 virus (BQCV (45%), DWV (31%), CBPV (2%)) ont été détectés. Parmi les autres parasites, *Aethina tumida* et *Galleria mellonella*, ont été détectés dans une partie des colonies inspectées (*A. tumida* 19.5% : *G. mellonella :* 34%).

Les séquences de BQCV analysées ont montré 80% d'identité et 93% de taux de couverture avec une souche australienne de BQCV (KY465684). Sur les séquences obtenues, 36 sites polymorphes ont été identifiés. Concernant DWV, la souche la plus proche, avec 99% d'identité et 99% de taux de couverture est une souche de DWV identifiée en Serbie (KM001909) qui porte 3 sites de mutations. Les séquences de DWV obtenues sont originaires de la région des Hauts Plateaux où l'invasion de varroa date de 2010. Enfin ces séquences sont relativement éloignées des séquences connues de VdV-1 (DWV Type A).

L'invasion de varroa n'est pas stabilisée à Madagascar 5 ans après sa détection. Différents fronts de colonisation sont en cours, au Sud, au Nord et à l'Ouest de l'île. Sachant que les apiculteurs malgaches pratiquent peu la transhumance, varroa se disperse donc de proche en proche.

La diversité des pathogènes et l'impact de varroa sur l'apiculture malgache sont discutés.

N.B. Les variables utilisées pour la réalisation des enquêtes sont présentées en ANNEXE 6 et la présentation des enquêtes sera intégrée dans cet article.

Epidemiological study of mortalities and pathogen diversity of the endemic honeybee *Apis mellifera unicolor* (Latreille, 1804) in Madagascar

Authors

Olivier Esnault [a,b], Jérémy Hascoat [b], Henriette Rasolofoarivao[c], Nivohanitra Perle Razafindraibe[d], Samuel Peter Fenozara[d], Nicolas Cazanove[a], Marie-Pierre Chauzat [e], Hélène Delatte [b]

Corresponding author: Olivier Esnault,

[a]: GDS Réunion

[b]: CIRAD UMR PVBMT

[c]: Université d'Antananarivo

[d]: DSV Madagascar

[e]: ANSES Sophia Antipolis, unite pathologie de l'abeille

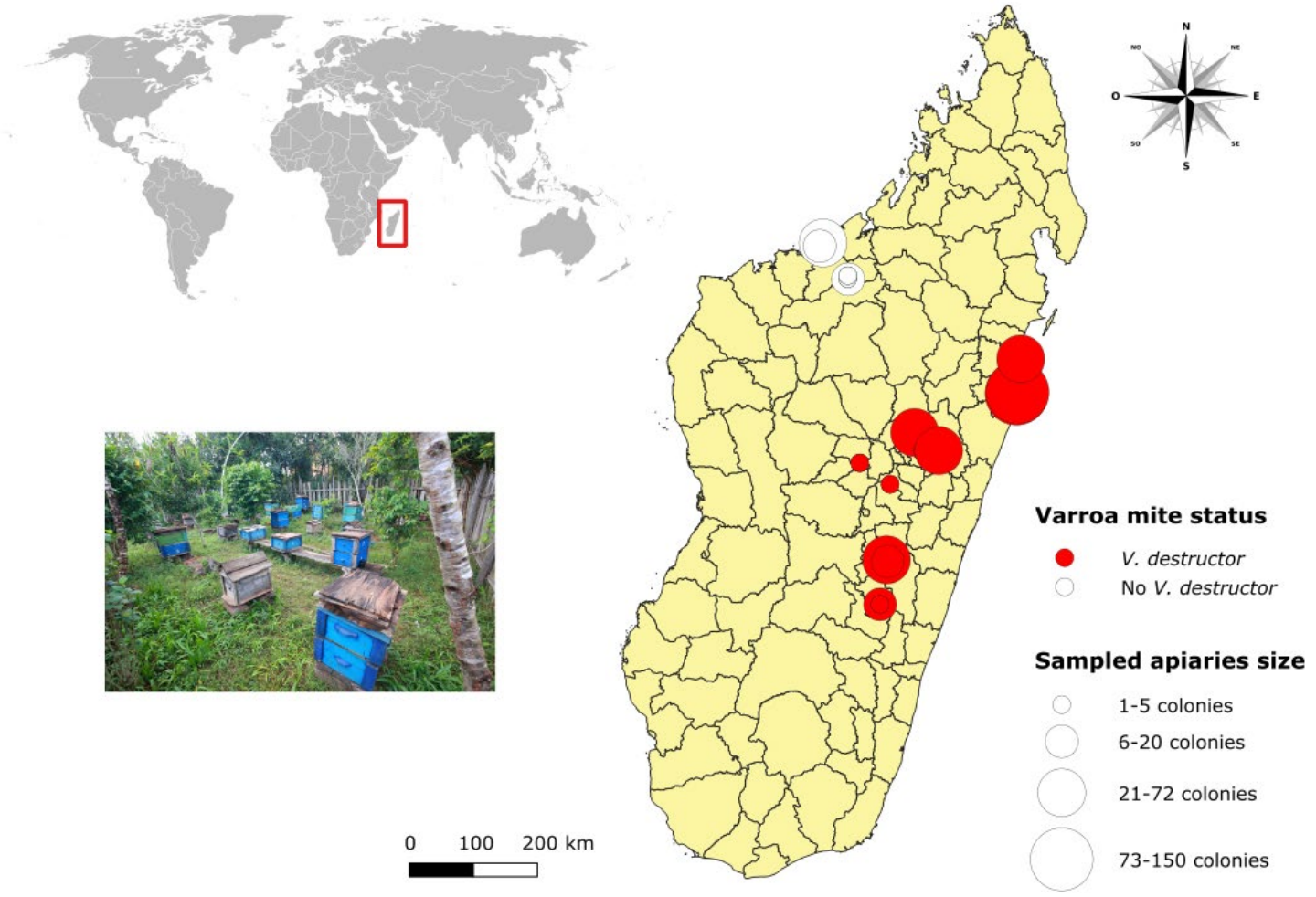


Figure 1: Sampling sites in Madagascar

Introduction

Honeybees (*Apis mellifera*) are efficient pollinators and contributes to ecosystemic services for crops and naturel ecosystem (Carreck and Williams, 1998, Gallai *et al.*, 2009, Breeze *et al.*, 2011, Breeze *et al.*, 2014) in its indigenous repartition area, e.g. Europe, part of Asia, Africa and South West Indian Ocean (SWIO) region (Ruttner, 1988, De la Rua *et al.*, 2009). Honeybees contributes also to human well-being (Potts *et al.*, 2016). Since the 90's severe honeybee colony mortalities are occurring in developed countries, especially in North America and Europe (Vanengelsdorp *et al.*, 2009a, Dainat *et al.*, 2012b, Laurent *et al.*, 2015). The etiology of these mortalities is complex and is likely due to a combination of interactions concerning pesticides, food scarcity, immunity and diversity of pathogens (Nazzi *et al.*, 2012, DeGrandi-Hoffman and Chen, 2015, Degrandi-Hoffman *et al.*, 2015, Goulson *et al.*, 2015, Nazzi and Pennacchio, 2018). Among those pathogens the major sanitary threat is the ectoparasite *Varroa destructor* (Nazzi and Le Conte, 2016, Wegener *et al.*, 2016). *V. destructor* feeds primarily on fat body tissues (Ramsey *et al.*, 2018) and is able to transmits several viruses, especially DWV (Shen *et al.*, 2005, de Miranda and Genersch, 2010). The combination of both pathogens creates a deleterious cocktail that affects severely honeybee health and can be responsible of high rates of colony losses (Dainat and Neumann, 2013b, Roberts *et al.*, 2017). Since the mid 50's, *V. destructor* switched host from *A. cerana* to *A. mellifera* (Akratanakul and Burgett, 1975) and is now present on every continent. In this expansion context, the alien mite was detected in 2010 in Madagascar with high mortality rates associated reaching 100% in some apiaries (Rasolofoarivao *et al.*, 2013). Madagascar was the first Island of the South West Indian Ocean (SWIO) region where *V. destructor* was reported (Rasolofoarivao et al., 2013), then the invasive ectoparasite was detected in Mauritius in 2014 (Esnault *et al.*, 2018) and in La Réunion in 2017 (Esnault *et al.*, submitted).

Madagascar is a continental island located at 400 km East of Africa (Figure 1) in the Southern hemisphere between 12°S and 25°30'S. The island has a great ecosystem diversity going from lowland to high plateau and going from tropical rainforest to desert areas (Goodman *et al.*, 2008). In this

context, flora and fauna sustained a particular evolution and nowadays the Madagascar biodiversity is characterized by a high rate of endemism (90% of the recorded vegetal and animal species are endemic (Hobbs, 2016)) and constitutes one of the main biodiversity hotspot (Myers et al., 2000, Mittermeier et al., 2011). Pathogen diversity is partially known in Madagascar. V. destructor was highlighted like several scavengers such as *Galleria mellonella* and *Aethina tumida* which is supposed to be indigenous in Madagascar (Rasolofoarivao *et al.*, 2013), but no data are available about other pathogen such as microsporidia, bacteria and viruses.

The subspecies of honeybee found in Madagascar is *A. m. unicolor* (Latreille, 1804) and this subspecies was defined as the smallest of the subspecies, with black color, short proboscis and long forewings by Ruttner (Ruttner, 1988). *A. m. unicolor* belongs to the A lineage (Rasolofoarivao *et al.*, 2015a) and radiated in the SWIO islands from Madagascar and was mixed with European subspecies in the different islands of Seychelles, La Réunion and Mauritius (Techer *et al.*, 2017a, Techer *et al.*, 2017b, Wragg *et al.*, 2018).

The aims of this study were (i) to assess the sanitary effects of varroa mite on the island five years after its first detection and, (ii) to realize a descriptive epidemiology study of the pathogens present in the Island and,(iii) to measure the inter and intraspecific diversity of the main honeybee pathogens in the original area of *A. m. unicolor*.

Material and methods

Sampling sites and study area

Few and incomplete data are available about the number of beekeepers, apiaries and colonies present in Madagascar. The sampling strategy was therefore built according to the spread of varroa mite within the island. Since its first detection on the island in 2010 (Rasolofoarivao *et al.*, 2013, Rasolofoarivao *et al.*, 2015a) varroa had been reported from Antananarivo to the Eastern part up to the coastal area of Tamatave, then further South until Ambositra. Nevertheless it had never been reported on the West part of the island, either elsewhere. Sampling was then realized in the Central, East (that could be

defined as “varroa zone” earlier reported or VZ) and West part of the island “varroa free zone” (VFZ). The sampling sites are summarized on Figure 1. Contacts with local beekeepers were established with the national and local veterinary services, and associations of beekeepers in relation with the University of Antananarivo. All the samplings were conducted between the 23rd of April and the 07th of May 2015. During this sanitary survey, 43 colonies belonging to 23 beekeepers on 23 different sites were sampled.

Fifty forager honeybees were collected per sampled colony. The honeybee were placed in 90° ethanol, and then stored at -20°C in a freezer for further pathogen detection analyses.

Colonies description and mortalities assessment

Each colony identified was georeferenced then described when it was possible regarding to beekeeping techniques used. The type of hive was recorded; the strength of the colony was evaluated by combining the number of brood frames, the number of storage brood (honey, bee bread) and the size of the reserves around the comb. The type of hive supports was also described and the beekeepers sanitary practices were registered. Any clinical signs such as irregular brood, pile of dead honeybees in front of the hives or deformed wings were compiled. Varroosis case was defined when at least one of these three clinical signs was observable: (1) varroa mites visible on honeybees, (2) irregular brood and (3) honeybees showing deformed wings. Mortalities were evaluated with the beekeepers via a face to face questionnaire. The first mortalities due to the varroa invasion since 2010 were evaluated and the sanitary situation in 2014 and 2015.

Ectoparasites and scavengers detection

V. destructor was highlighted by several ways. When it was possible, 300 inner bees were sampled and washed with icing sugar (OIE, 2012). Then, the phoretic mite ratio was established for 100 honeybees. Otherwise, the colony status (varroa positive/negative) was assessed by i) direct observation on honeybees or ii) a piece of comb (male or worker) was uncapped and checked for varroa presence.

Concerning *Aethina tumida* detection, the adults of small hive beetle were actively searched by removing frames when the hive architecture allowed it. For *Galleria mellonella* detection, the colony was considered as positive when the third instar (L3) of the larva was seen or indirect signs of gallieriosis such as tunnel into the wax comb or extensive silk thread spun on at least one comb (Vidal-Naquet, 2015). The early stages of *G. mellonella* (L1 & L2) were not specifically seeked.

Pathogens molecularly screened were two bacteria (*Paenibacillus larvae*, *Melissococcus plutonius*), two microsporidia (*Nosema apis* and *N. ceranae*) and six viruses (ABPV, BQCV, CBPV, DWV, KBV and SBV).

DNA and RNA extraction

On the 50 sampled honeybees, 30 honeybees were pre-crushed in a mortar. The samples were diluted in 3 ml PBS and then lysed in a 2ml sterile tube with Tissue Lyser II (Qiagen®). DNA and RNA extraction were realized simultaneously by using the kit All Prep DNA/RNA mini kit (Qiagen®) following the manufacturer instructions. RNA was eluted in 30 µl DNase Free Water (Qiagen®) and DNA in 100 µl of EB buffer (Qiagen®). DNA and RNA concentrations were then evaluated by spectrophotometry (Nanodrop 2000®).

Pathogens detection

cDNA were synthetized by using oligo(dT)15 primers of the commercial kit GoScript™ Reverse Transcription System by Promega® on the RNA elutions. cDNA quality was assessed by using EF-1α primers as a control (Kojima *et al.*, 2011).

Primers used for pathogen detection are summarized in Table 1. CBPV detection was provided by using a quantitative PCR using the primers qCBPV9: 5'- CGCAAGTACGCCTTGATAAAGAAC -3', qCBPV10: 5'-ACTACTAGAAACTCGTCGCTT CG - 3' and a TaqMan probe CBPV 2: 5'- (6-Fam) TCA AGA ACG AGA CCA CCG CCA AGT TC (Tamra)-3'.

Viruses molecular phylogeny

Table 1: primers used for pathogen detection. Fragment sized obtained in PCR are summarized in this table.

Pathogens	Primers nales	Primers	Size (pb)	Tm (°C)	References
Nosema ceranae	MITOC-FOR	5'-CGGCGACGATGTGATATGAAAATATTAA-3'	218-219	62	Martin-Hernandez et al., 2007
	MITOC-REV	5'-CCCGGTCATTCTCAAACAAAAAACCG-3'			
Nosema apis	APIS-FOR	5'-GGGGGCATGTCTTTGACGTACTATGTA-3'	321	62	Martin-Hernandez et al., 2007
	APIS-REV	5'-GGGGGGCGTTTAAAATGTGAAACAACTATG-3'			
Melisococcus plutonius	EFB-1	5'-GAAGAGGAGTTAAAAGGCGC-3'	832	55	ANSES (internal method)
	EFB-2	5'-TTATCTCTAAGGCGTTCAAAGG-3'			
Paenibacillus larvae	AFB-3	5'-CTTGTGTTTCTTTCGGGAGACGCCA-3'	1096	55	ANSES (internal method)
	AFB-4	5'-TCTTAGAGTGCCCACCTCTGCG-3'			
ABPV	ABPV 3	5'-CATATTGGCGAGCCACTATG-3'	398	55	Bakonyi et al., 2002
	ABPV 4	5'-CCACTTCCACACAACTATCG-3'			
KBV	KBV 6f	5'-TATGCTGAACAACGCAAAGA-3'	659	55	Carletto et al., 2010
	KBV 6r	5'-ACAACACGATGTCTGGGTTT-3'			
DWV	DWV3	5'-GGTCCGCGGCTAAGATTGTA-3'	420	55	Blanchard et al., 2007
	DWV 4	5'-CGGCTGTTTGATGGAAGAAGTT-3'			
SBV	SBV 1	5'-ACCAACCGATTCCTCAGTAG-3'	469	55	Grabensteiner et al., 2001
	SBV2	5'-CCTTGGAACTCTGCTGTGTA-3'			
BQCV	BQCV 3	5'-GGTGCAAGTCTCTTCCTAG-3'	606	55	Blanchard et al., 2007
	BQCV 4	5'-AATAACCTGAAAGGCCAAGAG-3'			

Viral sequences were edited manually in Mega X software (Kumar *et al.*, 2008) and aligned with Clustal W (Thompson *et al.*, 1994). JModelTest (Posada, 2008) was used to identify the optimal model of sequence evolution. Bayesian trees were constructed with MrBayes (Ronquist and Huelsenbeck, 2003) for each viral species and then were edited with Figtree 1.4.3 (Rambaut and Drummond, 2006).

Statistical analysis and GIS

Statistical analyses were carried out by using R software (R Development Core Team, 2013) and geographical information system as realized by using QGIS (QGIS Development Team, 2016).

Results

Colony description

A maximum of 3 colonies were sampled by apiary. The size of the sampled apiaries ranged from 1 colony to a maximum of 150 colonies per apiary. The 43 sampled colonies were hosted in several types of hives: top bar hives (n=2), wooden case (n=9), langstroth hives 10 frames (n=21), langstroth hives 8 frames (n=2), Dadant hives 10 frames (n=7), Dadant hive 12 frames (n=1) and one was a traditional hive made in a trunk. Fourteen of them were placed on bricks or concrete blocks, 18 on a wooden support and the others on massive stones (n=1), old tires (n=3), tree stumps (n=5) and the others were placed on the ground. Only two hives were having a queen excluder and were located in an apiary belonging to one beekeeper. The bottom of the hives were mainly wood made (n=39). During the survey, only one beekeeper was able to rear queens for their renewal. Furthermore, 10 on the 23 surveyed beeekeeprs were able to estimate their queen ages.

Concerning the strength of the sampled colonies, only two colonies visited were really weak. On the 31 measurable colonies, the ratio of brood comb on the total comb within each visited hive was going from 20 to 100%. The average of brood combs for the period was 55% (+/-se). The two weakest colonies presented a brood comb ratio between 20% and 40%. The observed reserve comb ratio was going from 0% to 50% and the measured average was 12.8% (+/-se).

Colony mortalities and beekeepers practices associated

Concerning beekeepers practices, no surveyed beekeeper used to move their colonies to follow the blooming seasons on the island. No beekeepers used to buy wax foundation. And only one beekeeper was using boiling water to disinfect its supplies.

No past nor recent acute mortalities of colonies were recorded in the VFZ during the 2 years before the survey. Among the 17 surveyed beekeepers in the VZ, 9 had sanitary troubles within their colonies for 2015 and only 7 in 2014. The sanitary troubles were described as “mortalities” by beekeepers (n=5 in 2015, n=5 in 2014) and the rest of the cases were declared as “varroa” by surveyed beekeepers (Table 2).

Fourteen beekeepers out of the 17 surveyed beekeepers in the VZ were able to give some information about the incurred losses. The average of estimated mortalities by beekeepers is 90% and goes from 66.7% to 100.0% and the most ancient mortalities started in 2011 and the most recent occurred in 2014 (Table 2).

After all, on the 17 beekeepers, only 2 reduced the size of their livestock from 2014 to 2015, 5 stabilized their livestock and 10 raised their number of owned colonies (Table 3).

Symptoms and pathogens prevalences recorded

No clinical signs were observed during the survey except irregular brood and deformed wings (n=2) and dying bees in front of the hive were recorded during the survey. All these symptoms recorded were observed in the VZ. As expected, varroa mite was found in all the colonies in the VZ and not in the VFZ. Nevertheless, carroa mite was highlighted in the Manakara area, in the south of Ranomafana. Varroa phoretic mite prevalences were able to be measured in only 14 colonies and the varroa ration for 100 honeybees were from 15% to 0.33%. Varroosis was observed in 26.2% of the colonies ($SD_{95\%}$ = 13.3%) and no correlation was established between the varroa phoretic mite load and the clinical signs.

ApID	Locality	Latitude	Longitude	Date of mortalities onset	Colonies headcount at the mortalities onset	Ratio	Number of colonies in 2014	Numlber of colonies in 2015	Evolution
Madapi1	Ambatolampy	19°23'1" S	47°26'21" E	2012	1	100.0%	4	5	+25.0%
Madapi2	Ambositra	20°32'11" S	47°14'46" E	2012	25	96.0%	1	1	0.0%
Madapi3	Soanirina	20°37'42" S	46°40'14" E	NDR	NDR	NDR	20	40	+100.0%
Madapi4	Andrianizaka	20°39'0" S	47°22'29" E	NDR	NDR	NDR	14	20	+42.9%
Madapi5	Soamatao	21°25'28" S	47°7'2" E	2014	23	73.9%	50	115	+130.0%
Madapi6	Ranomafana	21°15'36" S	47°27'5" E	2015	8	100.0%	NDR	NDR	NDR
Madapi7	Anzozorobe	18°24'0" S	47°52'12" E	2012	18	100.0%	10	10	0.0%
Madapi8	Amparihinandriana	16°48'31" S	46°57'59" E	2013	25	80.0%	50	30	-40.0%
Madapi9	Itasy	19°4'54" S	46°44'41" E	2012	10	80.0%	2	2	0.0%
Madapi10	Mandraka	18°54'46" S	47°53'33" E	2011	9	66.7%	3	5	+66.7%
Madapi11	Moramanga	18°56'54" S	48°14'22" E	2013	1	100.0%	1	1	0.0%
Madapi12	Moramanga	18°56'54" S	48°14'22" E	2013	1	100.0%	1	1	0.0%
Madapi13	Andranokobaka	18°54'54" S	48°10'23" E	NDR	NDR	NDR	NDR	NDR	NDR
Madapi14	Antetezambaro	18°0'49" S	49°24'8" E	2013	180	83.3%	180	150	-16.7%
Madapi15	Mahambo	17°29'13" S	49°27'20" E	2011	100	99.0%	60	72	+20.0%
Madapi16	Toamasina	18°8'39" S	49°23'45" E	2012	25	92.0%	25	60	+140.0%
Madapi17	Manerinirina	18°0'39" S	47°9'12" E	2011	50	84.0%	120	140	+116.7%

Table 2: mortality rates recorded by locality during the survey and evolution of the number of colonies for sampled beekeepers during 2014-2015 period. NDR means “no data recorded”. These data were not available when the colonies owner was absent during the survey (Madapi 13 and Madapi6) and for Madapi3 and Madapi4 the beekeepers couldn’t provide any data.

No foulbrood bacteria, *P. larvae* nor *M. plutonius* were detected during this survey. Concerning microsporidia, only *N. ceranae* was identified in Madagascar with a colony prevalence of 9.5%.

Three viruses were identified: BQCV was found in 45.24% ($SD_{95\%}$ = 30.2%-60.3%) of sampled colonies , DWV in 31% ($SD_{95\%}$ = 17.0%-44.9%) of the colonies, and CBPV in one colony (2.38% , $SD_{95\%}$ = 0.0%-6.99%). Apiary prevalences are available in Table 3.

Two scavengers were searched in all colonies sampled (except one that was located in a trunk hive, so it was not possible to easily assess scavengers presence): *A. tumida* was found in 8 colonies (colony prevalence = 19.5% [7.4%-31.6%]) and *G. mellonella* in 14 colonies (colony prevalence = 34.15% [19.6%-48.7%]).

No risk factors nor association between pathogens were identified during this survey.

<u>BQCV and DWV diversity</u>

Four BQCV and two DWV sequences were obtained and blasted in Genbank.

The closest BQCV sequence identified with our sequences was with only 80% of identity (93% of query cover) with an Australian strain of BQCV (KY465684). High diversity was found within the 4 sequences obtained in Madagascar (fragment size = 485 bp) with 36 polymorphic sites identified. One sequence of BQCV from the VFZ was identified in a different clad (VFZ) different from the clad of 3 sequences from the VZ on the high plateau (MAD_18) and in the lowland area (MAD-25 & 26) (Figure 3).

The closest DWV sequence identified was with 99% identity (99% query cover) with a Serbian strain (KM001909). A lower genetic diversity was found with only 3 polymorphic sites identified (fragment size = 371 bp). The two sequences from DWV were identified from the high plateau area (VZ) and showed high similarities with DWV strains from Europe and Asia, but were distant from VdV-1 strains (Figure 4).

Table 3: pathogen prevalences observed in sampled colonies and in sampled apiaries

Pathogen	Colony prevalence (%)	$CI_{95\%}$ (%)	n	Apiary prevalence (%)	$CI_{95\%}$ (%)	n
V.destructor	71.43	57.77-85.09	42	72.73	54.12-91.34	22
A. tumida	19.50	7.37-31,63	41	22.73	5.22-40.24	22
G. mellonella	34.15	19.63-48.67	41	45.45	24.64-66.26	22
N.ceranae	9.52	0.65-18.40	42	13.64	0.00-27.98	22
BQCV	45.24	30.19-60.29	42	68.18	48.72-87.65	22
DWV	30.95	16.97-44.93	42	45.45	24.65-66.26	22
CBPV	2.38	0.00-6.99	42	4.55	-0.00-13.25	22

To build the phylogenetic tree, reference sequences from several countries were used according to the GTR + I R best fitted model and the availableseveral of the African sequences whenever available where included (Figure 2). No African DWV sequences were available to build the phylogenetic tree. The tree was outgrouped with *Formica expecta* virus 2 (Figure 3).

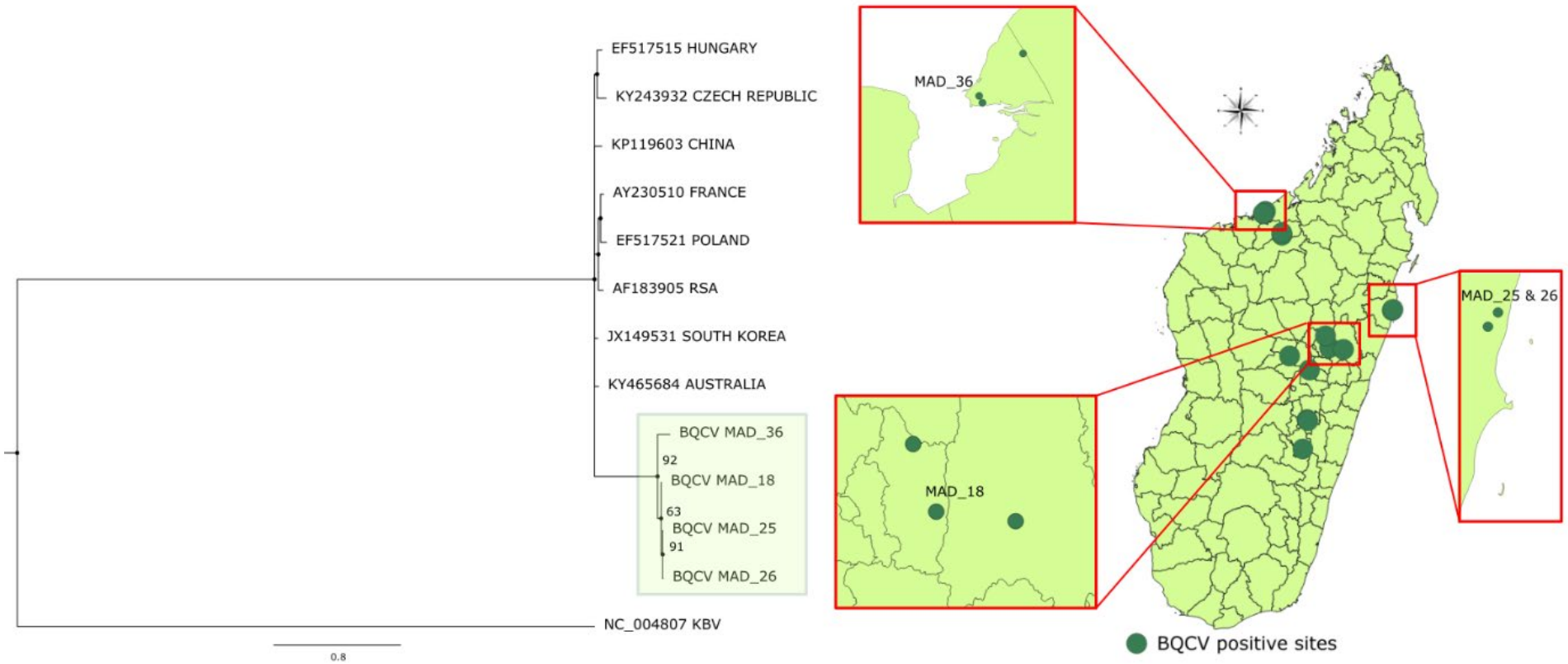


Figure 2: BQCV Bayesian phylogenetic tree with 4 sequences from 4 different sites and 3 were located in the VZ and one in the VFZ. Numbers associated with nodes indicate the posterior probability for each node. The model chosen for building the tree was GTR+I+G.

The BQCV phylogenetic tree counted one sequence of BQCV from the Republic of South Africa (AF183905) and the tree was outgrouped with a KBV strain that belongs to the Dicistroviridae like BQCV but the two viruses belong to different genus, *Apavirus* and *Cripavirus* respectively

Discussion

Beekeeping practices in Madagascar

The description of the sampling showed a great diversity of beekeeping practices in Madagascar. The different kind of hives used by local beekeepers showed a great diversity in practices going from local hobbyist beekeepers to professional beekeepers in the East part of the island. Beekeeping and the use of hive product is important in Malagasy culture (Crane, 2013). Locally, honey is used as food complement or as medication against targeted diseases. It could be also used for cosmetics and food (Rasolofoarivao, 2014). The local production is divided in two parts: one for local and domestic use with beekeepers with a small number of colonies and exportation to European Union and Asia with professional beekeepers gathered in associations or cooperatives (Rasolofoarivao, 2014). This practices diversity level was high so diversity give difficult to uniformized practices for risk factors assessment.

Varroa mite spread and mortality impacts on Madagascar honeybee colonies

This study confirmed the absence of varroa mite within the VFZ but the varroa spread is still ongoing (Figure 4). The initials outbreaks occurred in two different areas in 2010 (OIE notification, 11 February 2010) in the Analamanga region in the highlands (three districts infested) and in the Analanjirofo region in the lowlands of the East coast (1 district infested). In 2011 and 2012, the newly infested districts (n=9) were concentrated in the areas around the two initial outbreaks (Rasolofoarivao *et al.*, 2013). The dispersion velocity was estimated at around 40km/year. In 2015, the results of measured spread were congruent with the hypothesis of velocity with a high infestation of the central and eastern part of the island and an increase further to the South (Figure 1). But, in spite of that the area of Mahajunga in the western part of the island was still free of varroa and according to the sampling, varroa mite didn't seem to spread intensively in the occidental part of the island. Two hypotheses could be propose. The first one is that, according to our survey, Malagasy beekeepers seem not to practice transhumance, however the small size of surveyed beekeepers sampling (n=23) is probably not

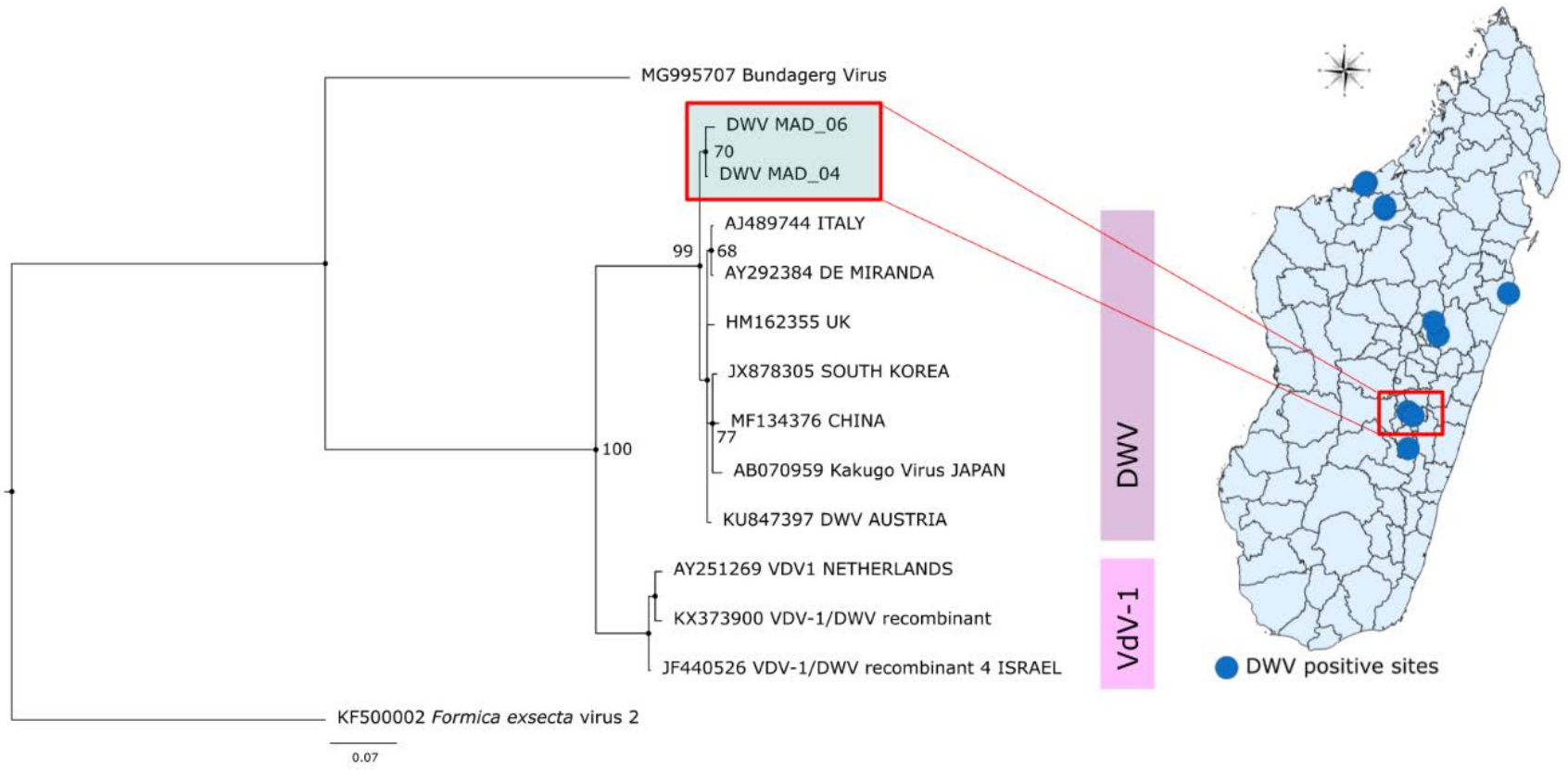


Figure 3: DWV Bayesian phylogenetic tree with 2 sequences from different sites in the VFZ. Numbers associated with nodes indicate the posterior probability for each node. The model chosen for building the tree was GTR+I+G.

Sequences from several parts of the world were added in the phylogenetic construction and sequences from relative viruses (Bundaberg virus, Kakugo virus and VdV-1).

representative of all Madagascar beekeeping practices because some case of transhumance were recorded in 2012 (Rasolofoarivao *et al.*, 2013). The other hypothesis is that there is a natural barrier between highlands and western coastal lowlands. During the survey, no beekeepers were identified in this area following an important road between Antananarivo and Toamasina. During the first varroa record, all the sites were positive along the road and varroa was simultaneously highlighted in Antananarivo and Toamasina area (Rasolofoarivao *et al.*, 2013)and during the sampling the food resources for honeybees seemed to be limited). This hypothesis should be investigated in the future by more ecological approaches.

No recorded mortalities were recorded in the VFZ before and during the survey. It confirms the fact that without varroa mite, no acute mortalities occurs like it was in Reunion Island before varroa introduction (Esnault et al., submitted) or in Australia (Roberts *et al.*, 2017) or in Republic of South Africa before varroa mite first detection (Allsopp *et al.*, 1997, Allsopp, 2007) highlighting the deleterious effects of *V. destructor* on honeybee colonies (Nazzi and Le Conte, 2016, Wegener *et al.*, 2016).

The high rates of mortalities declared by beekeepers showed from 2011 the major impact of colony losses in Madagascar due to varroa mite. One year after its detection, a beekeeper declared having lost 66.7% of its colony livestock. The highest rates of mortalities were recorded 2 to 4 years after the first detection. In tropical countries, the lethality induced by varroa mite seems to be more rapid (Allsopp, 2007)than what has been observed in Europe in the early 80's during the *V. destructor* invasion (Ritter, 1981). In temperate countries, the colonies collapse 3 to 4 years after varroa mite infestation (Büchler, 1994, Rosenkranz *et al.*, 2010). In Madagascar, these mortalities could be explained by a varroa introduction that was anterior to 2010 because the first suspicious cases were cases with mortalities, supposing an earlier introduction of the parasite which might have been occurred 1 or 2 years earlier. The other fact in tropical countries like Madagascar is that there is no winter diapause and brood all year long, facilitating mite reproduction. The other difficulties

encountered by Madagascar beekeepers concern the varroa treatments accessibility. Only one beekeeper met during the survey had an access to acaricide treatment (Amitraz ©) with a non-governmental organization and we recorded a wide diversity of empirical treatments applied directly in the hives : tobacco leaves (*Nicotiana tabacum*), neem leaves (*Azadirachta indica*), vandelaka leaves (*Melia azedarach*) or lendeny leaves (*Anthocleista madagascariensis*).

However, in spite of these huge colony losses incurred by beekeepers, the majority of them tried to increase their number of owned colonies. Five years after varroa first detection, colony health seemed to be better than during the 5 years before (table XX) and without any control program at the country level. Situation seems to be similar to what happened in Republic of South Africa with a decrease of mortalities 5 years after varroa mite detection (Allsopp, 2007, Locke, 2016, Mortensen *et al.*, 2016). A lineage honeybees seem to be more tolerant to varroa (Fazier *et al.*, 2010, Strauss *et al.*, 2013, Strauss *et al.*, 2014a, Strauss *et al.*, 2014b, Strauss *et al.*, 2015a, Strauss *et al.*, 2015b). If all the mechanisms of resistance or tolerance has not be fully elucidate, hygienic behaviour is pointed out as a major factor of contribution to this observed resistance (Fazier *et al.*, 2010, Locke, 2016). An evaluation of hygienic behavior of *A. m. unicolor* in Madagascar 3 years after varroa mite detection showed an evident increase of this behavior in the area where varroa was present. These characters are hughly heritable and even selectable. This trait was probably selected inside the *A. m. unicolor* population in response of varroa infestation (Rasolofoarivao *et al.*, 2015b). *A. m. scutellata*, another A lineage subspecies from Kenya, has been shown to significantly reduce mite reproduction ability and has great capacities of hygienic and grooming behaviors (Nganso *et al.*, 2017, Nganso *et al.*, 2018). The evaluation of the grooming or suppression mite reproduction (SMR) of *A. m. unicolor* should be assessed in the future to measure the selection of those traits in the Madagascar population due to the selection pressure induce by *V. destructor*.

Pathogen prevalences and varroosis

N. ceranae detection is the first report for Madagascar. *N. ceranae* is present on all continents (Higes *et al.*, 2006, Huang *et al.*, 2007, Klee *et al.*, 2007, Williams *et al.*, 2008, Giersch *et al.*, 2009, Pirk *et al.*, 2016) and not surprisingly in Madagascar. *N. ceranae* prevalences are variable and the rates are similar to what was observed in the USA (Cavigli *et al.*, 2016) but is lower than situation in Hungary with 57% of observed prevalence (Csaki *et al.*, 2015) or in Italy (30-69%) (Porrini *et al.*, 2016). In a tropical context, higher prevalences have been observed in Hawaii (89-95%) (Martin *et al.*, 2013) or in Dominic (97.1%) (Rangel *et al.*, 2018) and much lower from the 100% prevalence rates observed in La Reunion Island in the SWIO area (Esnault et al., submitted). This low prevalence level could be due to a seasonal variability.

The pathogen role of *N. ceranae* is discussed because the microsporidia is known to cause severe mortalities in Spain (Higes *et al.*, 2006, Higes *et al.*, 2008) but seems not to be responsible of high mortalities in La Reunion (Esnault et al., submitted). It is known to have synergistically effects with insecticides at individual scale (Vidau *et al.*, 2011, Pettis *et al.*, 2012, Aufauvre *et al.*, 2014), but no data are available about environmental pollution in Madagascar and information about phytosanitary practices are scarcely available. These aspects should be investigated.

P. larvae and *M. plutonius* bacteria are found all over Africa (Pirk *et al.*, 2016), except in Madagascar. *P. larvae* is present in Republic of South Africa (RSA), (Allen and Ball, 1996, Ellis and Munn, 2005) and *M. plutonius* is present in the close countries of Madagascar, such as RSA, Tanzania (Mumbi *et al.*, 2014), Kenya (Muli *et al.*, 2014), Botswana (Allsopp, 2007) and Zambia (Ellis and Munn, 2005). Presence of these two bacteria in the Southern and Eastern part of Africa, the close vicinity of Madagascar is at high risk for the country and constitutes another main threat that could be considered as a major concern for epidemiovigilance by Madagascar veterinary services.

Three viruses (BQCV, DWV and CBPV) were identified during this survey. CBPV is a major virus and can be responsible of high colony mortalities (Ribiere *et al.*, 2010, Vidal-Naquet, 2015). Nevertheless its

sanitary impact can be variable and CBPV was not retained as a risk factor of European honeybeesduring 2013 and 2014 beekeeping seasons (De Graaf *et al.*, 2016). In Madagascar, only one colony was found positive to this virus with no associated mortalities or even symptom so we cannot conclude that this virus is a threat for Madagascar honeybee colonies.

BQCV has a worldwide repartition (Antunez *et al.*, 2006, Kajobe *et al.*, 2010, Antunez *et al.*, 2012, Muz and Muz, 2018). The virus was identified in collapsing colonies (Cornman *et al.*, 2012) but its global impact on drones or worker health is not important (Retschnig *et al.*, 2014b). The virus prevalence in Kenya was estimated about 69% between 2013 and 2014 (Ongus *et al.*, 2017). BQCV in Madagascar shows an important diversity inside the island. The sequences analyzed came from three different parts of the island. The closest strain identified was from Australia, with however a very low percentage of nucleotide identity on a small portion of is viral RNA. The RSA strain inspite of a relative geographic proximity from Madagascar was found quite different from the Malagasy strain. As it was observed in Mongolia or in La Reunion island, the proximity of European or exotic strains could be related to a former introduction of honeybees from these areas (Tsevegmid *et al.*, 2016) Esnault et al, submitted. Concerning the difference seen between the VFZ and VZ, varroa mite could play a role in BQCV transmission (Mondet *et al.*, 2014)

DWV was identified in both areas with and without varroa in Madagascar. The virus has been found worldwide with or without varroa and the parasite change the strains of DWV (Martin *et al.*, 2012). DWV is in a global epidemic phase due to varroa spread (Wilfert *et al.*, 2016). However, Australia is a varroa free territory and no DWV was recorded these pas years conferring a good health of the honeybee colonies (Roberts *et al.*, 2017). The closest strain identified is a DWV from Italy and one of the hypothesis of explanation could be related to a varroa introduction from this area. Unfortunately, no DWV sequences were readable from the VFZ. Further sampling should be done to better characterize DWV diversity in Madagascar focused with collecting honeybee samplings from all the VZ and VFZ. DWV like BQCV could be transmitted to wild bees (e.g. solitary bees)

(Zhang *et al.*, 2012, Tehel *et al.*, 2016) and concerning to the high diversity and species richness of solitary bees reported in Madagascar (Lees *et al.*, 1999, Pauly *et al.*, 2001, Le Ru *et al.*, 2007, Monaghan *et al.*, 2009), a survey on this wild fauna should be conducted to see the virus diversity, potential reservoir role and its potential impacts on these populations.

Varroosis symptomatology is not clear and mainly consists in colony mortalities in presence of varroa (Boecking and Genersch, 2008, Vidal-Naquet, 2015). *V. destructor* can affect the brood structure by reproducing inside the capped cell (Rosenkranz *et al.*, 2010), can generate deformed wings by transmitting DWV (de Miranda and Genersch, 2010) and when the varroa population is too important, varroa mites can be identify directly on the thorax or abdomen of workers and weaken the honeybee by its spoliation action. The DWV viral load determines the clinical expression of deformed wings (Brettell *et al.*, 2017). Among the 11 cases of varroosis recorded, only 4 cases were DWV positive and when it was measurable the ratio of varroa was measured for two colonies and the measured ratio was 0.3% and 9.7%. Among the 11 cases, in 9 cases varroas were visible and two cases showed clearly deformed wings on honeybees. So, varroosis seems not to be caused only by a synergistic effect of varroa and DWV but seems to be mainly due to the varroa presence. Considering the varroa population dynamics and its impact on colony dynamics (Morton *et al.*, 2005, Noireterre, 2011), the colonies showing these clinical signs could have collapsed in the weeks following the survey. The data recorded were obtained at a given moment and the survey was not following a longitudinal design. So we because the virus dynamics is different during the year it's difficult to conclude. The other fact is that the presence of deformed wings is a predictor of colony collapse (Dainat and Neumann, 2013a). To better characterize varroosis, the colonies should be monitored during a longer period to improve the knowledge on varroosis on tropical honeybees and to measure its real mortality impact when the parasite tend to become epidemiologically endemic.

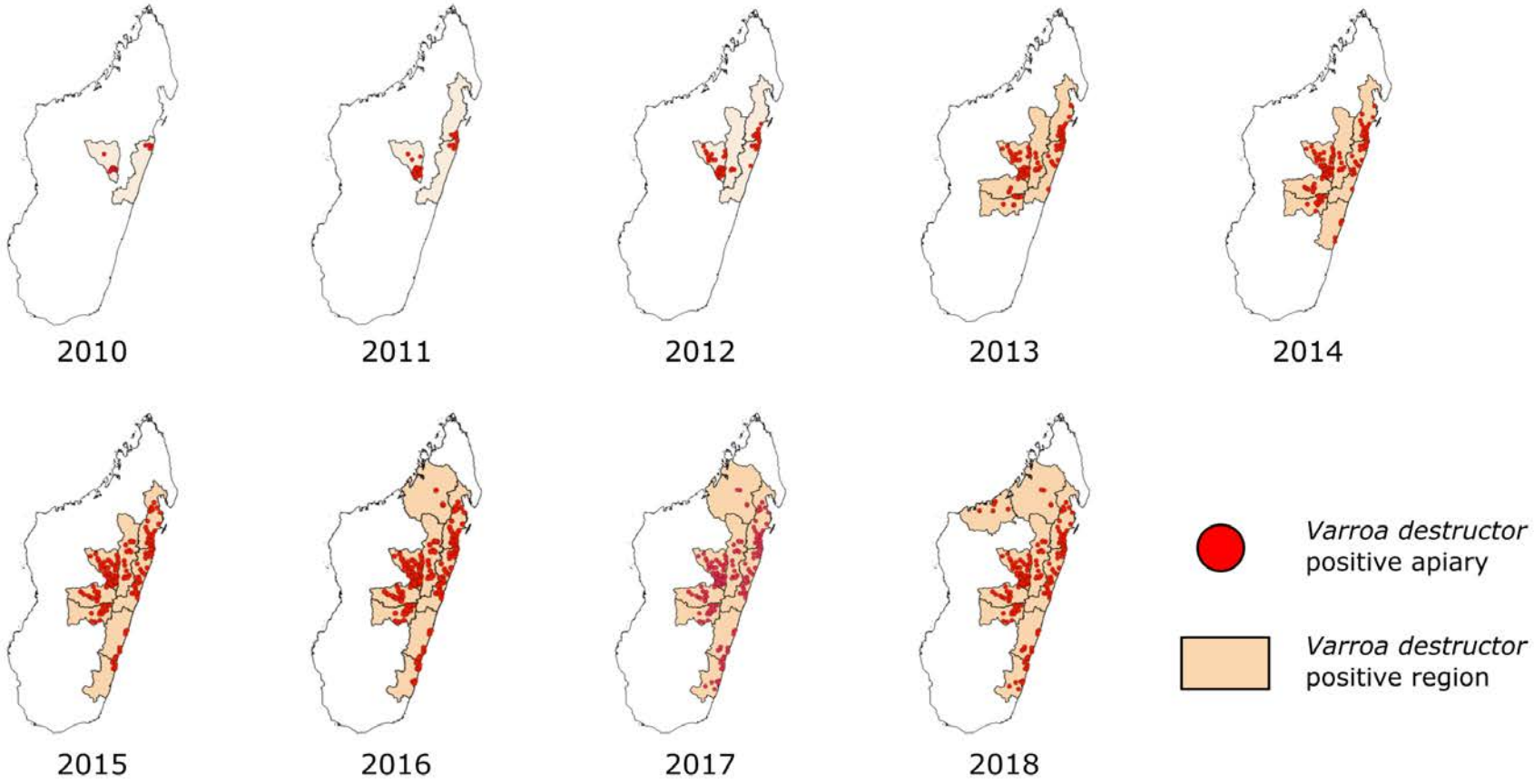


Figure 4: Varroa mite spread on the different regions from Madagascar between 2015 and 2017

Acknowledgment:

The study was supported by ePRPV, EPIBIO CIRAD, GDS Réunion. Thanks to Madagascar beekeepers for their kindness. Special thanks for the technical support on the field (Henriette and all the vet students team).

Scènes apicoles seychelloises (© Olivier Esnault)

Chapitre 2

Un contexte épidémiologique contrasté sur trois territoires du Sud-Ouest de l'Océan Indien: cas de Maurice, Rodrigues et des Seychelles

Ce chapitre est sous forme d'un article scientifique rédigé en anglais dont le titre provisoire est le suivant : **From Seychelles to Mauritius through Rodrigues: *Varroa destructor* is the most serious candidate as honeybee colony killer in South West Indian Ocean among *Apis mellifera* pathosphere**

Après Madagascar, l'île Maurice est le second territoire où varroa a été mis en évidence en septembre 2014. Trois enquêtes épidémiologiques ont été menées sur les différents territoires : en septembre 2014 à Maurice, novembre 2014 à Rodrigues et mai 2015 aux Seychelles.

Les enquêtes descriptives ont montré des situations apicoles très contrastées en fonction des territoires. Mis à part à Maurice, aucun signe clinique particulier n'a été observé et les apiculteurs enquêtés n'ont pas signalé de problèmes sanitaires particuliers.

A Maurice, l'échantillonnage a été réalisé pendant la période d'invasion du varroa. Une partie de l'île était encore indemne tandis qu'ailleurs, des signes clinique de varroose étaient observés. Ces points seront détaillés dans le chapitre 4.

Concernant la présence des agents pathogènes, *Braula pretoriensis* n'a été mis en évidence que sur les deux îles Maurice et Rodrigues, à des prévalences élevées (respectivement 96.7% et 71.4%). L'autre agent pathogène majoritairement retrouvé sur les 3 territoires est la microsporidie *Nosema cerana* avec une prévalence observée à Maurice de 91.7%, à Rodrigues de 79.6% et aux Seychelles de 86.1%. À noter que l'autre microsporidie *N. apis* a été mise en évidence à Rodrigues. Comme à Madagascar, les patterns de virus observés sont similaires avec la présence des 3 virus BQCV, CBPV et DWV. Seul CBPV n'a pas été mis en évidence à Rodrigues. Les prévalences de BQCV sont très variables avec des prévalences observées allant de 4.1% à Rodrigues à 51.2% aux Seychelles. Le virus du CBPV a une prévalence faible à Maurice (5.6%) et plus élevée aux Seychelles (14%). Enfin, DWV est retrouvé sur les 3 îles indépendamment de la présence de varroa qui joue un rôle important dans la dissémination

du virus. La prévalence du virus est particulièrement importante aux Seychelles avec une prévalence observée de 39.5% qui est similaire à celle de Maurice (36.7%) et largement supérieure à ce qui est observé à Rodrigues (4.1%).

Aucun facteur de risque issu des enquêtes sanitaires n'a été identifié pour aucun des territoires étudiés.

L'analyse de la diversité génétique des séquences virales (BQCV et DWV) ont montré des clades spécifiques à la zone Océan Indien. Cette diversité régionale est discuté plus amplement au regard de la distribution mondiale des souches décrites de ces virus.

Malgré les prévalences importantes de DWV aux Seychelles, le seul territoire où nous avons constaté de fortes mortalités est à Maurice en présence de *V. destructor.* Les implications de ces mortalités sont plus amplement discutées.

From Seychelles to Mauritius through Rodrigues: *Varroa destructor* is the most serious candidate as honeybee colony killer in South West Indian Ocean among *Apis mellifera* pathosphere

Authors

Olivier Esnault [a,b], Anna Doizy[b], Jérémy Hascoat[b], Nicolas Cazanove[a], Marie-Pierre Chauzat[c], Hélène Delatte[b]

[a]: GDS Réunion

[b]: CIRAD UMR PVBMT

[c]: Université d'Antananarivo

[d]: DSV Madagascar

[e]: ANSES Sophia Antipolis, unite pathologie de l'abeille

Corresponding author: Olivier Esnault,

Introduction

In the main parts of the world and since the end of the 90's honeybees (*Apis mellifera*) population suffer of dramatic losses (Vanengelsdorp *et al.*, 2009a, Chauzat *et al.*, 2014, Jacques *et al.*, 2017). This global pollinator decline concerns mainly developed countries from the northern hemisphere (Lever *et al.*, 2014, Bauer and Sue Wing, 2016) and is poorly studied in tropical countriesHoneybee severe declines are under several causes and the colony mortalities to be fully understood need to mix several approaches. Pesticides and in the first instance neonicotinoids (van der Zee *et al.*, 2015, Brandt *et al.*, 2016, Tsvetkov *et al.*, 2017) can affect severely honeybee lifespan. Other abiotic stressors could be involved such as the honeybee nutrition quality and beekeeping practices (Nazzi and Pennacchio, 2014, Nazzi and Pennacchio, 2018). Honeybee pathosphere is better and better known and honeybee health at the individual or colony level can be affect by fungi, bacteria, viruses, protozoans or arthropods (Evans and Schwarz, 2011). Among the arthropods, *Varroa destructor* is probably the main sanitary threat for honeybees (Le Conte *et al.*, 2010).

Tropical honeybee pathosphere in its native area (e.g. mainly Africa) is better known (Strauss *et al.*, 2013, Muli *et al.*, 2014, Mumoki *et al.*, 2014, Pirk *et al.*, 2016) but is scarcely known in the SWIO region (Esnault *et al.*, 2018). Twenty nine honeybee supbspecies have been described from 4 lineages (Ruttner, 1988, Sheppard and Meixner, 2003, Whitfield *et al.*, 2006, Alburaki *et al.*, 2013).

SWIO area belongs to the Madagascar biodiversity hotspot (Mittermeier *et al.*, 2011). Comoros, Mascarene and Seychelles archipelago belongs to the region. The subspecies found on the islands is *Apis mellifera unicolor* that belings to the A lineage (Franck *et al.*, 2001) and is endemic to Madagascar (Ruttner, 1988). *A. m. unicolor* radiated to the islands (Techer *et al.*, 2017a, Techer *et al.*, 2017b), and has a mixed genetic background with European subspecies, exception on Rodrigues where C lineage honeybees are found (*A. m. carnica* and *A. m. ligustica*) (Techer *et al.*, 2015) but traces of the ancestral A lineage genetic background found (Wragg *et al.*, 2018). Sanitary situation in Seychelles is unknown

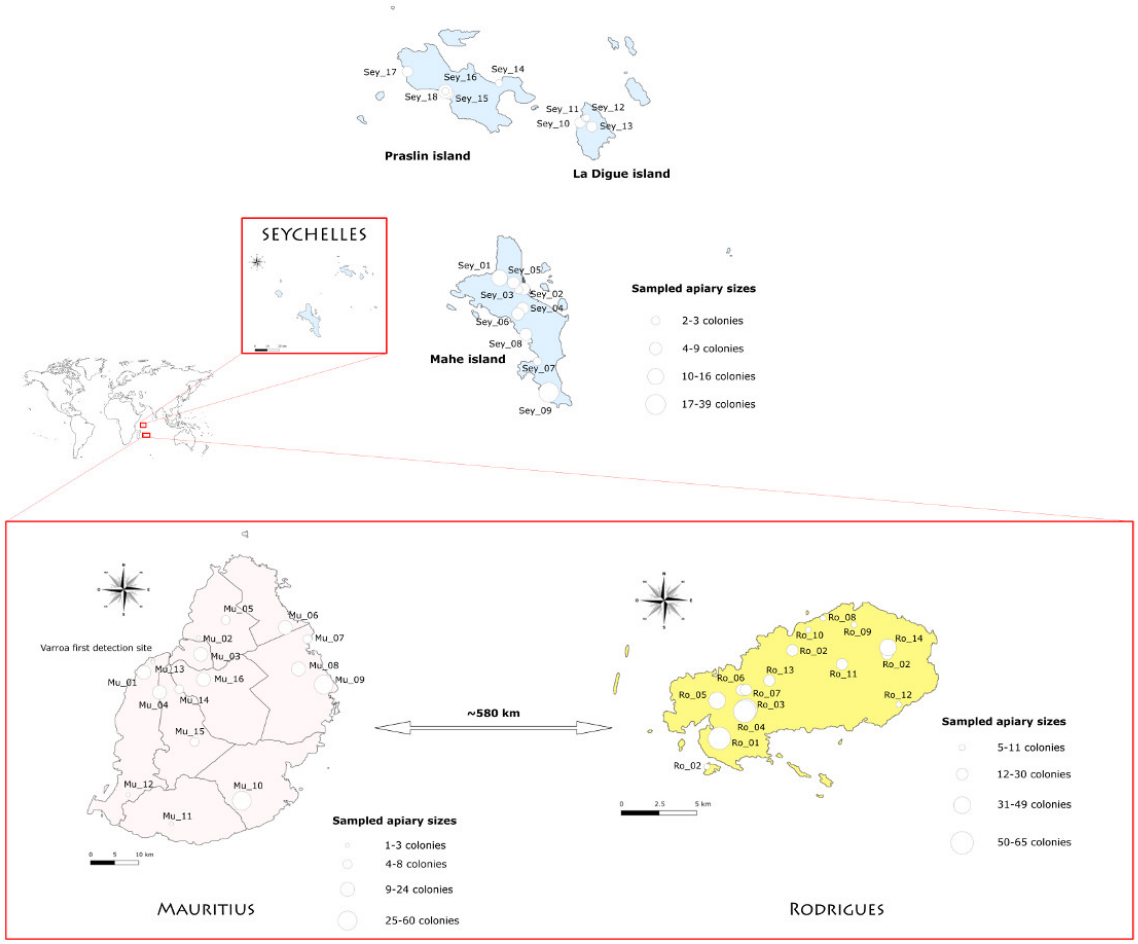


Figure 1: Localisation of the studied island in the South-West Indian Ocean and sampling sites and apiary sizes at each sampled site.

but presumed to be good and the situation was partially known for Mauritius and Rodrigues, but focused on *V. destructor* and *Braula pretoriensis* situation (Esnault *et al.*, 2018).

In this particular context with the varroa introduction in Mauritius and its absence on the other islands an epidemiological survey of honeybee pathogens was a real opportunity to assess the sanitary context. This is the first multipathogen survey realized in Mauritius, Rodrigues and Seychelles.

To assess a complete epidemiological survey (i) a description of the local beekeeping conditions, (ii) the pathogen presence and genetic diversity in the local honeybee populations, (iii) and the evaluating of the local honeybee health in light of local pathosphere or beekeeping practices was performed.

Material and methods

Sampling sites and study area

Mauritius and Rodrigues belongs to the Mascarene archipelago and the two islands are the biggest islands of the Republic of Mauritius. These two volcanic islands are aged of 8.9 ± 0.17 million years and 1.5 ± 0.05 million years, respectively (McDougall, 1965, McDougall and Chamalaun, 1969). Rodrigues seems to be older but its age is difficult to evaluate and should be as old as Mauritius (Hume, 2005). Mauritius is bigger than Rodrigues (1,865 km² vs. 104 km²). In Rodrigues, in spite of its small size, beekeeping is a major socio-economic activity with 191 beekeepers recorded for 2234 colonies in 2006 (Giraudet *et al.*, 2007). In Mauritius, the hive density is about 1.1 colony/km² vs. 21.5 colonies/km² in Rodrigues. Rodrigues *Eucalyptus sp.* honey is world famous. Just a few data are available for beekeeping in Mauritius and beekeeping seems not to be a major activity in this island. According to FAO, there was among 400 beekeepers and 2000 colonies.

The three main granitic islands of the Seychelles archipelago were sampled during this survey. These islands are continental islands and separated from Gondwana approximatively 130 million years ago

Table 1: primers used for pathogen detection. Fragment sized obtained in PCR are summarized in this table.

Pathogens	Primers nales	Primers	Size (pb)	Tm (°C)	References
Nosema ceranae	MITOC-FOR	5'-CGGCGACGATGTGATATGAAAATATTAA-3'	218-219	62	Martin-Hernandez et al., 2007
	MITOC-REV	5'-CCCGGTCATTCTCAAACAAAAAACCG-3'			
Nosema apis	APIS-FOR	5'-GGGGGCATGTCTTTGACGTACTATGTA-3'	321	62	Martin-Hernandez et al., 2007
	APIS-REV	5'-GGGGGGCGTTTAAAATGTGAAACAACTATG-3'			
Melisococcus plutonius	EFB-1	5'-GAAGAGGAGTTAAAAGGCGC-3'	832	55	ANSES (internal method)
	EFB-2	5'-TTATCTCTAAGGCGTTCAAAGG-3'			
Paenibacillus larvae	AFB-3	5'-CTTGTGTTTCTTTCGGGAGACGCCA-3'	1096	55	ANSES (internal method)
	AFB-4	5'-TCTTAGAGTGCCCACCTCTGCG-3'			
ABPV	ABPV 3	5'-CATATTGGCGAGCCACTATG-3'	398	55	Bakonyi et al., 2002
	ABPV 4	5'-CCACTTCCACACAACTATCG-3'			
KBV	KBV 6f	5'-TATGCTGAACAACGCAAAGA-3'	659	55	Carletto et al., 2010
	KBV 6r	5'-ACAACACGATGTCTGGGTTT-3'			
DWV	DWV3	5'-GGTCCGCGGCTAAGATTGTA-3'	420	55	Blanchard et al., 2007
	DWV 4	5'-CGGCTGTTTGATGGAAGAAGTT-3'			
SBV	SBV 1	5'-ACCAACCGATTCCTCAGTAG-3'	469	55	Grabensteiner et al., 2001
	SBV2	5'-CCTTGGAACTCTGCTGTGTA-3'			
BQCV	BQCV 3	5'-GGTGCAAGTCTCTTCCTAG-3'	606	55	Blanchard et al., 2007
	BQCV 4	5'-AATAACCTGAAAGGCCAAGAG-3'			

(Coffin and Rabinowitz, 1987). Beekeeping seems not to have been a great tradition in Seychelles, inhabitants were more focused on honey-gathering than beekeeping (Crane, 2013).

The climatic context is different on the three territories studied. Seychelles granitic islands are close to the equator with a hot and humid climate all year long. Mauritius and Rodrigues are located in the Capricorn tropical area with two seasons: a temperate and dry in austral winter and hot and humid in summer. In the three areas, honeybees produce brood all year long.

Mauritius sampling was realized between the 1st of September and the 04th of September 2014, Rodrigues sampling between the 17th of November and the 20th of November 2014 (Esnault et al., submitted), and Seychelles between the 28th of March and the 02nd of April 2015.

Honeybee sampling, colonies description and mortalities assessment

For each sampled area the type of hives was described, the strength of the colony was evaluated when it was possible. A questionnaire was realized face to face with the beekeeper about his practices and the mortalities were evaluated for the year of the survey and the year before.

The sampling was organized according to the available time on each island and with data from respective Agricultural ministries. Fifty forager honeybees were collected in kraft paper envelope and stored at +4°C for each colony. Then, in the laboratory they were stored in 90° ethanol. The samples were then analyzed in La Reunion laboratory (CIRAD Pôle de Protection des Plantes). Each sample was georeferenced.

Ectoparasites and scavengers detection

Pathogen molecularly screening was made on two bacteria (*Paenibacillus larvae*, *Melissococcus plutonius*), two microsporidia (*Nosema apis* and *N. ceranae*) and six viruses (ABPV, BQCV, CBPV, DWV, KBV and SBV).

DNA and RNA extraction

On the 50 sampled honeybees per colony, 30 honeybees were pre-crushed in a mortar. The samples were diluted in 3ml PBS and then lysed in a 2ml sterile tube with Tissue Lyser II (Qiagen®). DNA and RNA extraction are realized simultaneously by using the kit All Prep DNA/RNA mini kit (Qiagen®). The mix is then diluted in 600µl of RTL Plus Buffer (Qiagen®) with 0.01% mercaptoethanol. The mix is centrifuged 3 minutes at +4°C. The supernatant is used for extraction following the provider recommendations. RNA is eluated in 30 µl DNase Free Water (Qiagen®) and DNA in 100µl of EB buffer (Qiagen®). DNA and RNA concentrations are evaluated by spectrophotometry (Nanodrop 2000®).

cDNA were synthetized by using oligo(dT)15 primers of the commercial kit GoScript™ Reverse Transcription System by Promega®. cDNA quality is assessed by using EF-1α primers (Kojima *et al.*, 2011).

Pathogen detection

Primers used for pathogen detection are summarized in Table 1. CBPV detection was assessed by using a quantitative PCR using the primers qCBPV9: 5'- CGCAAGTACGCCTTGATAAAGAAC -3' and qCBPV10: 5'- ACTACTAGAAACTCGTCGCTT CG - 3' and a TaqMan CBPV 2 probe: 5'- (6-Fam) TCA AGA ACG AGA CCA CCG CCA AGT TC (Tamra)-3'.

Viruses' molecular phylogeny

Viral sequences were edited manually in Mega X software (Kumar *et al.*, 2008) and aligned with Clustal W (Thompson *et al.*, 1994). JModelTest (Posada, 2008) was used to identify the optimal model of sequence evolution. Bayesian trees were constructed with MrBayes (Ronquist and Huelsenbeck, 2003) for each viral species and then were edited with Figtree 1.4.3 (Rambaut and Drummond, 2006).

Statistical analysis and GIS

Statistical analyses were carried out by using R software (R Development Core Team, 2013). FactoMineR library was used for factor analysis of apiaries pathological profiles (Lê *et al.*, 2008) and

vegan library (Dixon, 2003) for calculating the checker board score between pathogens (Stone and Roberts, 1990). GIS was realized by using QGIS (QGIS Development Team, 2016).

Results

Sampling descriptions

In Mauritius, 60 colonies belonging to 14 beekeepers for 16 sites and a wild colony were sampled. In Rodrigues, 49 colonies belonging to 14 beekeepers for 16 sites were examined and sampled. In Seychelles, 43 colonies belonging to 18 beekeepers were sampled.

Beekeeping in Seychelles is rather different from Mauritius and Rodrigues where the kind of hives used are mainly standardized. In Mauritius all the sampled colonies where in Langstroth 12 frames (or in 5 frames hives for young swarms) and in Rodrigues, all the hives were Dadant type. In Seychelles, several types of hives were found as diverse as Dadant, Langstroth, top bar hives or "traditional" hives that consists mainly in wood box. The size of the sampled apiaries is also various, with the lowest number of colonies observed in Seychelles (average of 8.2 colonies/ apiary), average number for Mauritius (average of 12.6 colonies/apiary) and the highest for Rodrigues (average of 28.4 colonies/apiary). No humidity signs were observed in Seychelles hives. The bottoms of the hives were more in wood than in aerated plastic (36 vs. 6) in Seychelles. The activity of the colonies was mainly good (35/43). The strength of the visited colonies was difficult to measure due to the great variability of type of hives locally used. Queen renewal is natural, beekeepers do not import wax. Beekeepers do not practice migratory beekeeping and no sanitary practices were applied by surveyed beekeepers. Concerning the colonies description and beekeeping in Mauritius and Rodrigues please refer to (Esnault *et al.*, 2018)

Prevalence and pathogen patterns in the different islands

Mauritius

Table 2: Prevalence observed of pathogens per island, apiaries and colonies.

Territory	Pathogen	Colony prevalence (%)	$CI_{95\%}$ (%)	n	Apiary prevalence (%)	$CI_{95\%}$ (%)	n
Mauritius	*V.destructor*	51.67	39.02-64.31	60	64.71	41.99-64.48	17
	B.coeca	96.67	92.12-100	60	100		17
	N.ceranae	91.67	84.67-98.66	60	100		17
	BQCV	33.33	21.41-45.26	60	76.47	56.31-76.27	17
	DWV	36.67	24.47-48.86	60	76.47	56.31-76.27	17
	CBPV	5.56	0.00-13.04	36	20.00	0.00-19.75	10
Rodrigues	*B.coeca*	71.43	58.78-84.08	49	100		16
	N.apis	2.04	0.00-6.00	49	6.25	0.00-18.11	16
	N.ceranae	79.59	68.31-90.88	49	93.75	81.89-105.61	16
	BQCV	4.08	0.00-9.62	49	12.5	0.00-28.71	16
	DWV	4.08	0.00-9.62	49	12.5	0.00-28.71	16

Mauritius is the only territory in the study where *V. destructor* was described. The two other most frequent pathogens are *B. pretoriensis* and *N. ceranae* with a colony prevalence observed of respectively 96.7% ($CI_{95\%}$ = 4.6%) and 91.7 % ($CI_{95\%}$ = 7.0%). Three viruses were identified in colonies: BQCV (33.3%; $CI_{95\%}$ = 11.9%), DWV (36.7%; $CI_{95\%}$ = 12.2%)) and CBPV (5.6%; $CI_{95\%}$ = 7.5%). At the apiary levels, *B. pretoriensis* and *N. ceranae* were found in every sampled apiary. BQCV and DWV apiary's prevalence are at the same levels (76.5%; $CI_{95\%}$ = 20.2%) and CBPV apiary's prevalence is about 20% (Table 2).

Rodrigues

In Rodrigues, the most prevalent pathogen is *B. pretoriensis* (71.4%; $CI_{95\%}$ = 12.6%), then like in Mauritius *N. ceranae* with an estimated prevalence of 79.6% ($CI_{95\%}$ = 11.3%). One single case of *N. apis* was identified. Just two viruses were found in Rodrigues with the similar low prevalences: BQCV and DWV (4.1%; $CI_{95\%}$ = 5.5% ; Table 2).

Seychelles

In Seychelles, the dominant pathogen is *N. ceranae* with an estimated prevalence at the colony level of 86.1% ($CI_{95\%}$ = 10.4%). Three viruses were identified: BQCV (51.2%; $CI_{95\%}$ = 14.9%), DWV (39.5%; $CI_{95\%}$ = 14.6%) and CBPV (14.0%; $CI_{95\%}$ = 10.4%). The apiary prevalence of *N. ceranae* is 100%; 61.1 % concerning BQCV ($CI_{95\%}$ = 22.5%), 72.2% for DWV ($CI_{95\%}$ = 20.7%) and 33.3% for CBPV ($CI_{95\%}$ = 21.8%). All these results are summarized in Table 2.

Mortalities assessment and symptoms observed

Except in Mauritius where colony mortalities were only recorded during the varroa mite infestation phase in 2014 (and not in 2013) and two beekeepers (on 14 surveyed) were having colonies suffering from acute mortalities and were closed to the detection site. No acute colony mortalities were reported by beekeepers in Rodrigues neither for 2013 and 2014, nor in Seychelles for 2014 and 2015.

(Table 2 suite)

Seychelles	*N.ceranae*	86.05	75.69-96.40	43	100		18
	BQCV	51.16	36.22-66.10	43	61.11	38.59-83.63	18
	DWV	39.53	24.92-54.15	43	72.22	51.53-92.91	18
	CBPV	13.95	3.60-24.31	43	33.33	11.56-55.11	18

No abnormal clinical signs were observed during this survey except in Mauritius were two colonies had honeybees showing clinical signs of deformed wings in presence of Vd.

Pathogen patterns and risk factors associated

The observational unit considered was the colony, we excluded, from the analysis, colonies containing at least one missing value concerning pathogen presence (128 colonies were retained). The variables of interest were the presence or absence of observed pathogens (*B. pretoriensis*, *V. destructor*, *N. ceranae*, BQCV, CBPV and DWV). The explanatory variables were split according to two modalities: the territory (e.g. Mauritius, Rodrigues and Seychelles) and Mauritius was subdivided in function of *V. destructor* absence or presence. 22 unique pathological profiles were identified and each of these represented several colonies in a given territory. Colonies from Mauritius "without varroa" were closer to Rodrigues colonies due to their pathogen patterns, while Seychelles and Mauritius colonies "with varroa" were the most distant (Figure 3). The PCA projection of colonies from Mauritius and Rodrigues is showing an influence by *B. pretoriensis* presence and the colonies from Mauritius with varroa are influenced by the mite presence.

No risk factors were identified in this survey.

No interactions were identified between pathogens in each surveyed island and between the three islands, especially between *V. destructor* and DWV in Mauritius and for the three islands together.

Virus genetic diversity:

The virus genetic diversity was studied only for DWV and BQCV. Concerning DWV, the two positive sites of Rodrigues were analyzed and 3 sites from Mauritius (with *V. destructor* presence) and two samples from two different islands of Seychelles (Mahé and Praslin).

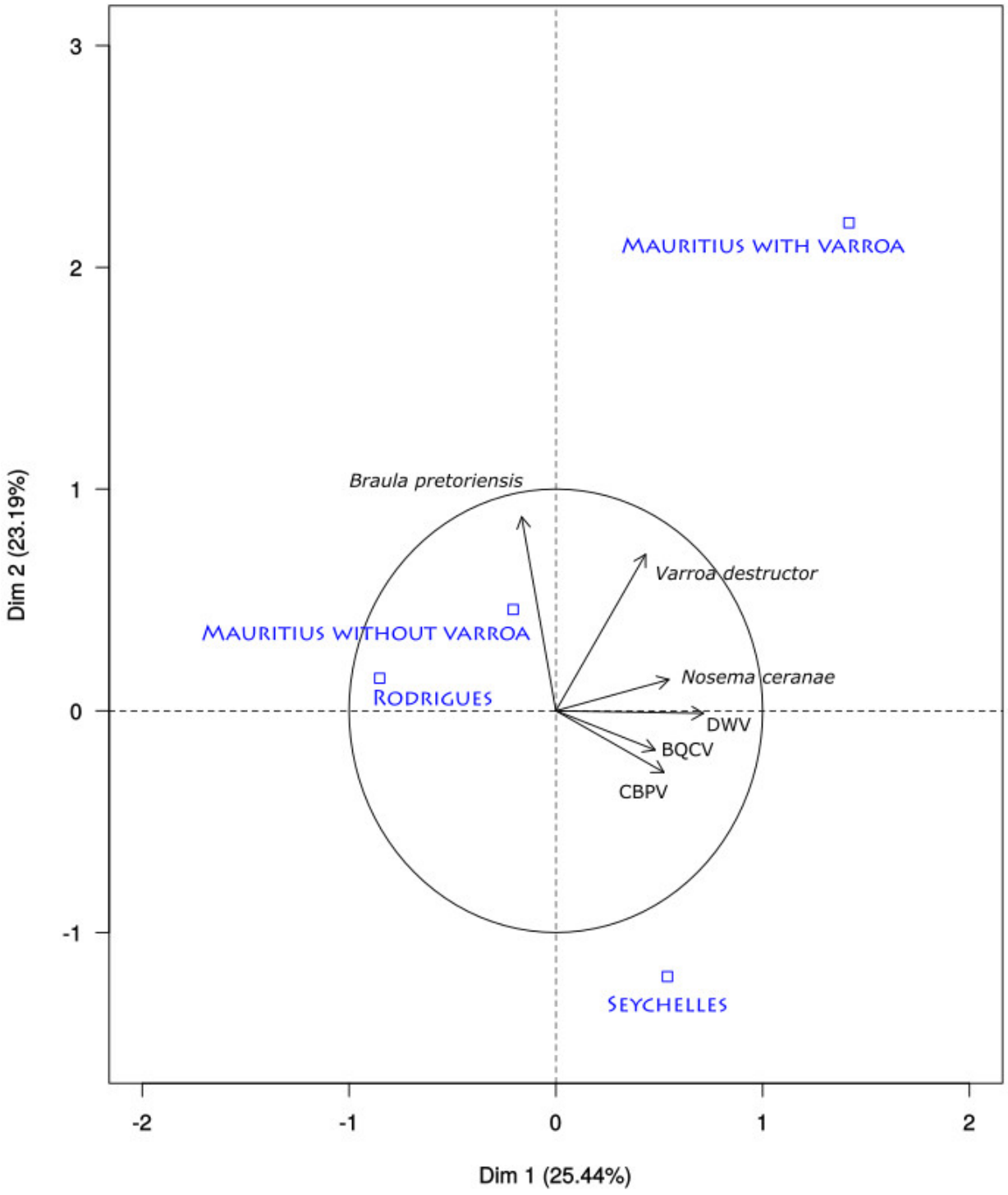
Both DWV sequences (n° seqce) from Rodrigues were very close to one (n° seq) from Mauritius (Fig. 3). Within the three islands among the 7 sequences obtained, seven haplotypes were found.

One genetic cluster, well supported, was grouping all SWIO sequences, with two clades (Fig 4). Within the most basal clad at least one haplotype of each island was found (Sey_10, MU36 (presence of V. destructor), RO25;31). The closest DWV strains from the literature that blasted with the SWIO haplotypes were from Europe on honeybees (ie Serbia KM …., ref) and from Magachile from Canada (KM…., ref).

In the second clad 3 sequences from Mauritius and Seychelles (Mu06 &07 (presence of V. destructor), SEy 34) grouped with a reference sequence from the VDV1 Israel virus. Neverheless, the three SWIO haplotypes being genetically closer to each other than from the VDV1 haplotype.

.

Figure 2: Variables (i.e. pathogens) factor map taken at the two first dimensions. In blue are the weighted barycenters of the individuals (i.e. colonies) for each sub-territory. Three viruses were found in the area and are presented here: DWV, BQCV, CBPV, such as the two ectoparasites: vd and bp, and one microsporidia: nc.



These viruses constitute a group different from DWV strains from other parts of Europe, Asia or America. For BQCV diversity analysis, we were only able to obtain 5 sequences from Seychelles and Mauritius (Fig. 4). All sequences analyzed were grouped by territory in the phylogenetic tree, even from Seychelles where the three sequences were coming from two different islands (Mahé and Praslin). The sequences from the SWIO are found in the same cluster in which two clads are found. (BQCV sequences from Australia, Asia Europe and Africa).

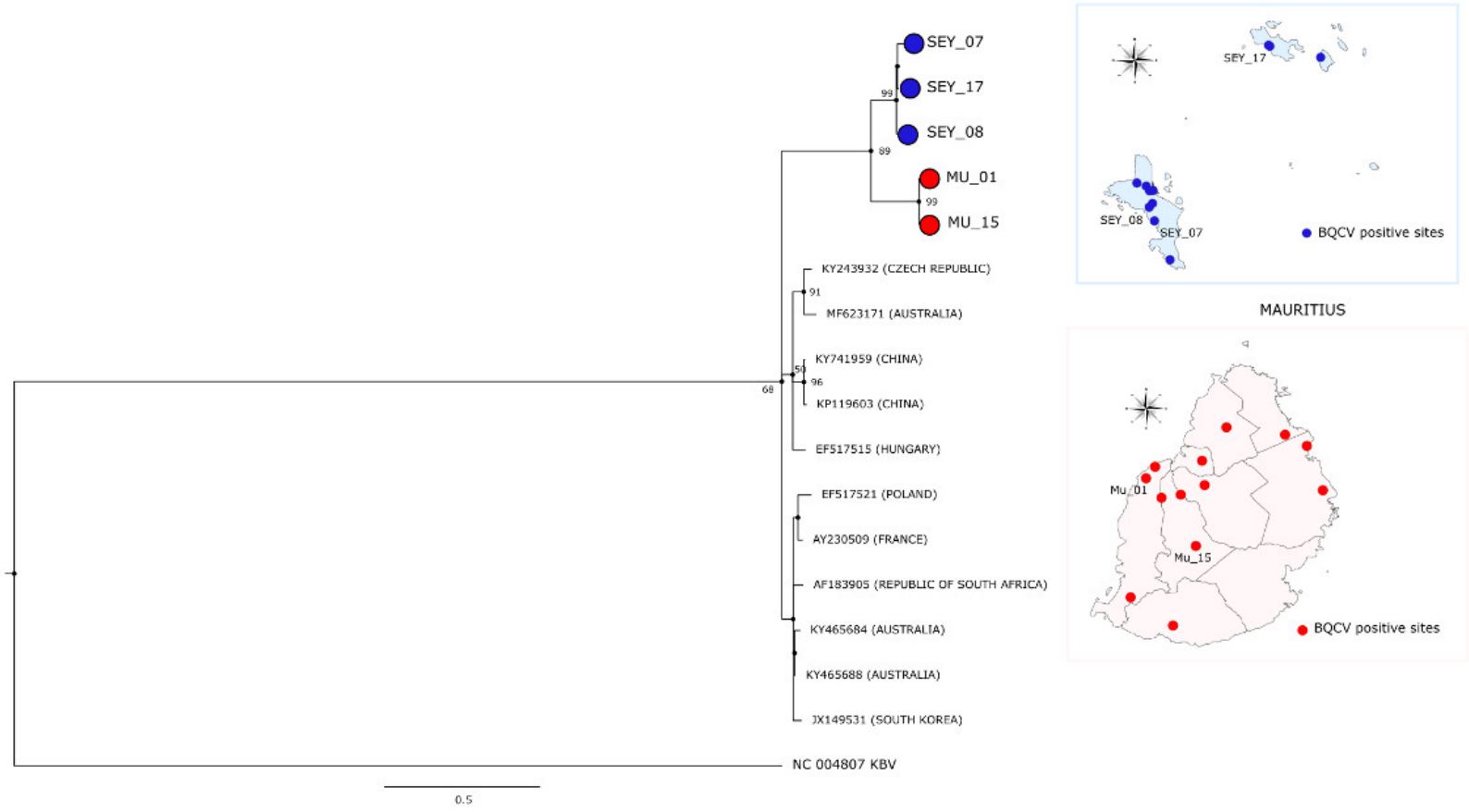
Discussion

Pathogen prevalences

B. pretoriensis was only found in Mauritius and Rodrigues and was not detected in the three main islands of the Seychelles. The presence of this kleptoparasite (Grimaldi and Underwood, 1986) was known from the two first island (Esnault *et al.*, 2018) but its status was unknown in Seychelles. The biology of *B. pretoriensis* is almost unknown contrary to its relative *B. coeca* which has a worldwide distribution (Smith and Caron, 1984, Zaitoun and Al-Ghzawi, 2008, Al-Ghzawi *et al.*, 2009, Gemechu *et al.*, 2013). Known as bee louse, this Diptera feeds of nutritional substances exchanged between honeybees during trophallaxia (Somerville, 2007a). *B. coeca* is not known to transmit any pathogen and its direct pathogenic role is supposed to be null (Vidal-Naquet, 2015). By extension, the putative pathogenic role of *B. pretoriensis* can be assessed as similar as *B. coeca*.

N. apis was found in only one colony in Rodrigues during this survey. *N. apis* affects the digestive tract of honeybees and can cause mortalities at the individual and colony level (Fries, 1993). In the South West Indian Ocean region, a similar case was identified in La Reunion island but the *N. apis* positive colony was not confirmed several months after (Esnault et al. submitted). *N. apis* seems to be confined in cold regions where the microsporidia spores are resistant to cold climate (Forsgren and Fries, 2010, Fries, 2010b). The presence of this microsporidia could be due to the importation of C lineage honeybee subspecies in Rodrigues (Techer *et al.*, 2015). Worldwide, *N. apis* is replaced by *N. ceranae*

Figure 4: BQCV Bayesian phylogenetic tree with 5 sequences (3 from Seychelles, 2 from Mauritius). Numbers associated with nodes indicate the posterior probability for each node. The model chosen for building the tree was GTR+I+G

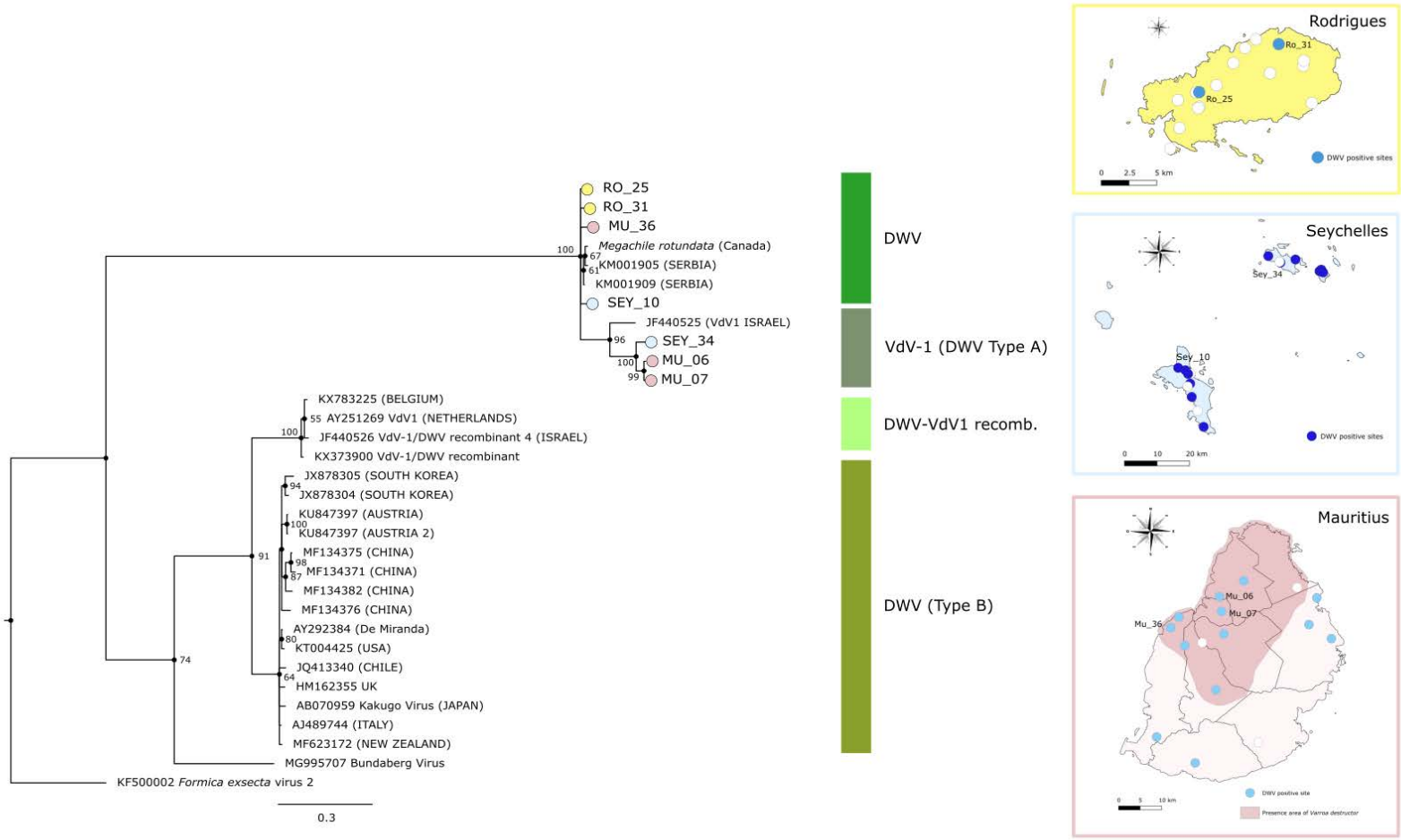


(Chen *et al.*, 2009), considered as an invasive species or emergent pathogen (Klee *et al.*, 2007) that was first described in *A. ceranae* (Fries *et al.*, 1996a). Its first detecttion in *A. mellifera* occurred in 2005 (Huang *et al.*, 2007) but evidences for older contacts between Africanized honeybees and *N. ceranae* were dated in the 90's in Brazil (Teixeira *et al.*, 2013).

The prevalences of *N. ceranae* observed in the three islands are high with a minimum observed in Rodrigues of 79.6%. These prevalences are similar to prevalences observed in La Réunion island (Esnault et al., submitted), but are over 8 times higher than in Madagascar(Esnault et al., in prep). In the smallest islands of SWIO region (e.g. La Reunion, Mauritius, Rodrigues and Seychelles) *N. ceranae* prevalences seems to be superior than in bigger islands or continents. Similar high prevalences (89 to 95%) were observed in other small islands like in Hawaii (Martin *et al.*, 2013) and in Dominica (97.1%) (Rangel *et al.*, 2018). On continental territories, prevalences seem to be lower like in Hungary (57%) (Csaki *et al.*, 2015), Australia with up to 33% (Chen and Huang, 2010), up to 15% in the USA (Cavigli *et al.*, 2016). And in Africa this microsporidia species seems to be absent from Ghana (Llorens-Picher *et al.*, 2017) or Republic of South Africa (Strauss *et al.*, 2013).

N. ceranae is a controversial pathogen agent. The microsporidia is suspected to cause Type-C nosemosis (Higes *et al.*, 2010b) that is mainly characterized by colony depopulation and mortalities (Vidal-Naquet, 2015). *N. ceranae* was associated with high mortality rates in Spain (Higes *et al.*, 2008, Higes *et al.*, 2009) and was identified in the first Colony Collapse Disorders (CCD) in Europe (Dainat *et al.*, 2012b). Synergy with insecticides, especially neonicotinoids, has been highlighted as the individual honeybee scale (Vidau *et al.*, 2011, Aufauvre *et al.*, 2012) but these results were not confirmed at the colony level under field conditions (Retschnig *et al.*, 2015). The results of high level prevalences obtained in the different islands of SWIO (La Reunion, Mauritius, Rodrigues and Seychelles) confirmed the unclear pathogen role of *N. ceranae* with the absence of colony losses associated with this micriosporidia. However, pesticides were identified in Seychelles in honeybee wax especially

Figure 3: DWV Bayesian phylogenetic tree with 7 sequences (2 from Rodrigues, 3 from Mauritius and 2 from Seychelles). Numbers associated with nodes indicate the posterior probability for each node. The model chosen for building the tree was GTR+I+G



carbendazim (Fungicide) and Imidacloprid (neonicotinoid insecticide) (Muli *et al.*, 2018). Nevertheless, despite the presence of those insecticides residues, or *N. ceranae* presence, no colony mortalities have ever been reported from Seychelles. So, we can hypothesize that in these tropical islands context *N. ceranae* infestation seems to be asymptomatic on honeybee.

CBPV is a virus that can cause severe mortalities in colonies (Vidal-Naquet, 2015) and can affect individual honeybees or the whole colony (Ribiere *et al.*, 2010). The virus was highlighted only in Mauritius and in the Seychelles. The prevalence rate in Mauritius could be underestimated due to the fact that quantitative RT-PCR were only realized on 36 samples instead of 60 for other pathogens. The prevalances rates in both cases are lower than what was observed in 2013 in La Reunion Island (Esnault et al., submitted). The absence of major symptoms or mortalities recorded during the surveys could suggest an epidemiological enzootic viral situation.

BQCV is a prevalent and worldwide virus (Forgách *et al.*, 2008, Tapaszti *et al.*, 2009, Peng *et al.*, 2015) that can affect the queen cell (Vidal-Naquet, 2015). This virus is frequently found in multipathogen surveys (Ryba *et al.*, 2012, Ongus *et al.*, 2017, Shumkova *et al.*, 2018). Generally its infection is asymptomatic in workers, drones and queens but the brood can be affected (Siede and Büchler, 2003). In the area, BQCV was found in Africa in RSA or in Kenya (Ongus *et al.*, 2017)Madagascar (Esnault et al., in prep) and in La Reunion (Esnault et al., submitted) too. Prevalences recorded were different among the islands. The prevalence rate was higher in Seychelles than in Mauritius and very low in Rodrigues. The sequences from Seychelles and Mauritius constituted a close group different from the sequences chosen to build the trees. The closest sequence identified is a European one from Czech Republic. For Mauritius, the honeybee genetic background is known to be mixed between local *A. mellifera unicolor* and European lineage (Techer *et al.*, 2017b, Wragg *et al.*, 2018). Furthermore, BQCV sequences from The Republic of South Africa were distant from SWIO strains, the virus proximity with European strains can be the reflection of the European subspecies introduction in the region. The absence of constated symptoms and sanitary problems reported by beekeepers

DWV was found in the three territories with different prevalences. This virus is known to be transmitted by *V. destructor* (De Miranda *et al.*, 2012) but can also be found without the ectoparasite (Martin *et al.*, 2012, Mondet *et al.*, 2014). It was found in high prevalence in Seychelles, a territory without *V. destructor*. Comparable high prevalences of DWV have always been observed in *V. destructor* presence (Tentcheva et al., 2004, Berenyi et al., 2007) and never reported without *V. destructor* to that extent.. DWV is also known to be transmitted horizontally (Nordstrom, 2003, Lanzi *et al.*, 2006) especially through pollen or flowers (Singh *et al.*, 2010, Mazzei *et al.*, 2014). In a so small territory like the three main islands of Seychelles, the virus could be transmitted between honeybees when foraging.

Concerning the two colonies showing deformed wings clinical signs, only one sampling was DWV positive by molecular diagnostic. Honeybees sampling realized was focused on forager honeybees and not on symptomatic honeybees. The viral load induces deformities of wings (de Miranda and Genersch, 2010, Brettell *et al.*, 2017). The RT-PCR used for virus detection in this study is less sensible than a quantitative RT-PCR. The use of quantitative RT-PCR in Seychelles could answer the question of the viral load in Seychelles honeybees and maybe could explain the covert infection.

DWV sequences analyses reveals that the DWV strains from SWIO region form a separate genetic cluster. The proximity between all the DWV sequences can also reflect the past history of honeybee introductions between Mauritius, Rodrigues and Seychelles. From 1810, Mauritius was a British colonial possession and until 1903, Seychelles were included in the Mauritius colony like Rodrigues. Mauritius became independent in 1968 and Rodrigues Island is still a territory of the Republic of Mauritius. The relative proximity of the DWV sequences obtained could be explained by the former exchanges between Mauritius and Seychelles (Crane, 2013) and more recently between Mauritius and Rodrigues with introduction of queens from Mauritius in the early 80's (Belmin, 2010).

Furthermore the DWV sequences obtained were grouped in the same genetic cluster as European and Canadian isolates, , a similar hypothesis than the one from BQCV could be exposed. Indeed the

proximity with European isolates might most probably reflects past introduction of honeybees in the SWIO region from European origin. DWV is known to infect wild bees (Tehel *et al.*, 2016) and wild bees, especially the *Megachila* genus are well represented in the Seychelles (Vesey-Fitzgerald, 1950, Madl, 2006, Madl, 2013), in Mauritius and in Rodrigues (Parnaudeau and Madl, 2009). Contamination of wild bees can be hypothesized but also the reciprocal that wild bees could be a reservoir of DWV for *A. mellifera*. Future studies could be considered by comparing sequences or the full DWV viral genome from wild bees known to be sensible to DWV like *Megachila* genus or *Xylocopa* genus and to compare with sequences from honeybee infested or not by varroa.

Another group of sequences (one from Seychelles – Praslin) and two from Mauritius were grouped together and the closest sequence identified was a VdV1 strain from Israel. VdV-1 and DWV are close viruses and share 84% of identity within their nucleic acid sequence (Ongus *et al.*, 2004). The pathogenic role of VdV-1 is not clear and could affect both varroa mite and honeybee (Zioni *et al.*, 2011). The two viruses can also recombine (Dalmon *et al.*, 2017), however with such a small sequence we are not able to give a clear answer. The Mauritian sequences (MU_06 and MU_07) were obtained in *V. destructor* infested colonies. No sequences were usable from varroa free zone due to sequencing errors, but the proximity with the Seychelles strain presumes that this virus strain might not have been introduced by the recent mite invasion. The sampling was realized in Mauritius soon after the first detection of the mite on the island (Esnault *et al.*, 2018). Previous studies on varroa invasion and changes induced in the virus pathosphere showed that it can take 3 years to upside down the viral diversity landscape (Martin *et al.*, 2012, Mondet *et al.*, 2014).

DWV is supposed to be a major threat for honeybee colonies (Roberts *et al.*, 2017). The DWV sanitary situation described in Seychelles and in Rodrigues is not compatible with this theory. *A contrario*, severe mortalities occurred in 2014 in Mauritius and the DWV prevalence observed was lower than in Seychelles. In view of all these elements we postulate that DWV without varroa mite is not a severe sanitary threat for honeybee colonies and, due to the illustration of the case of these three territories,.

V. destructor remains the main sanitary threat for honeybees, even when pesticides are identified in the environment**.**

Acknowledgement: this study was supported by ePRPV. Many thanks to the Entomology services from Mauritius and from Rodrigues. Many thanks to Seychelles veternarians especially Maria Tirant and Jimmy Melanie

Scènes apicoles réunionnaises (© Olivier Esnault)

Chapitre 3

Etat sanitaire et diversité des agents pathogènes des colonies à La Réunion avant et après l'introduction de varroa

Ce chapitre est constitué de deux articles scientifiques.

Le premier s'intitule : Multipathogen sanitary survey and mortalities assessment on indigenous honeybee in a tropical infested Island in pre-varroa context et va être soumis à Apidologie une fois la relecture anglophone terminée.

Le second, rédigé sous forme de short note sera soumis à Journal of Invertebrate Pathology (Varroa destructor invasion within *Apis mellifera unicolor* population on La Réunion island and its mortality impacts one year after its first detection).

Le premier travail consacré à La Réunion avait pour objectif de décrire la diversité des agents pathogènes rencontrés ainsi que d'évaluer la santé des abeilles locales en s'intéressant notamment aux mortalités de colonies.

Pour cela deux enquêtes ont eu lieu. La première était l'enquête épidémiologique de terrain où 111 colonies ont été prélevées et analysées en 2013. Les colonies ont été décrites ainsi que les pratiques apicoles dans un objectif d'identifier des facteurs de risque. L'enquête a montré l'absence de varroa, de *P. larvae*, d'*A. tumida* parmi les menaces sanitaires sérieuses et réglementées en France. Le bilan sanitaire a montré la dominance de la microsporidie *N. ceranae* qui a été identifiée dans 100% des échantillons. *N. apis* a été identifiée dans un échantillon mais la colonie positive a été échantillonnée à nouveau quelques semaines après et le parasite ne fut pas remis en évidence. Parmi les 7 virus recherchés, seulement deux ont été mis en évidence : BQCV (89.3%) et CBPV (51.4%). DWV n'a pu être détecté durant cette enquête à La Réunion. *M. plutonius*, le bacille de la loque européenne a été identifié dans 22.5% des colonies. Enfin, un acarien du genre *Acarapis* fut mis en évidence mais sans confirmation (probablement *A. dorsalis*).Concernant l'analyse des facteurs de risque ,aucun lien statistique ne fut identifié lors de cette enquête. Néanmoins, les répartitions du BQVC et des acariens du genre *Acarapis* ne sont pas indépendantes, ce qui suggère une interaction entre le parasite et le virus.

L’analyse des huit séquences identifiées montre une grande variabilité de séquence sur l’île de La Réunion. Les séquences analysées proviennent de différentes zones éco-climatiques de l’île. La séquence la plus proche est une séquence qui a été identifiée en Europe (Allemagne).

L’année suivante, une grande enquête fut réalisée sur un panel d’apiculteurs adhérents au GDS et sélectionnés aléatoirement. La fréquence des évènements sanitaires remontés par les apiculteurs augmente pendant l’hiver austral avec un pic plus important en août aen plein hiver austral. Malgré tout, les taux de mortalité observés étaient très bas et s’élevaient à 0.2%/an.

Le second travail de ce chapitre s’intéresse à la dispersion du varroa sur l’île de La Réunion depuis sa détection le 04 mai 2017. Le parasite fut mis en évidence dans un rucher sentinelle du Nord de l’île. Différentes enquêtes de terrain ont montré qu’au 14 novembre 2017 le parasite était présent partout sur l’île. Malgré diverses mesures de police sanitaire et la topographie accidentée de l’île, le parasite s’est propagé très rapidement. Les premières mortalités importantes ont été enregistrées par le réseau d’épidémiosurveillance dans la deuxième moitié du mois de décembre. Une enquête de mortalité réalisée entre avril et juin 2018 a montré que le taux global de mortalité sur l’île de La Réunion était de 22% avec une hétérogénéité géographique (64% de mortalités dans l’Ouest de l’île vs. 12% dans le Sud).

Ces résultats de mortalités et la vitesse de dispersion sont discutés.

Multipathogen sanitary survey and mortalities assessment on indigenous honeybee in a tropical infested Island in pre-varroa context

Authors

Olivier Esnault [a, b], Eric Dubois [c], ANSES 2 [c], Marie-Pierre Chauzat [c], Jeremy Bouyer [d], Hélène Delatte[b]

[a] GDS Réunion, 1, rue du Père Hauck, 97418 La Plaine des Cafres, La Réunion, France.

[b]CIRAD, UMR PVBMT, 7, chemin de l'IRAT, 97410 Saint-Pierre, La Réunion, France

[c] ANSES Sophia Antipolis, Unité pathologie de l'abeille, Les Templiers, 105, route de Chappes, CS 20111, 06902 Sophia-Antipolis, France.

[d] CIRAD, UMR CIRAD-INRA ASTRE, Campus international de Baillarguet TA A-117/E, 34398 Montpellier Cedex 5, France

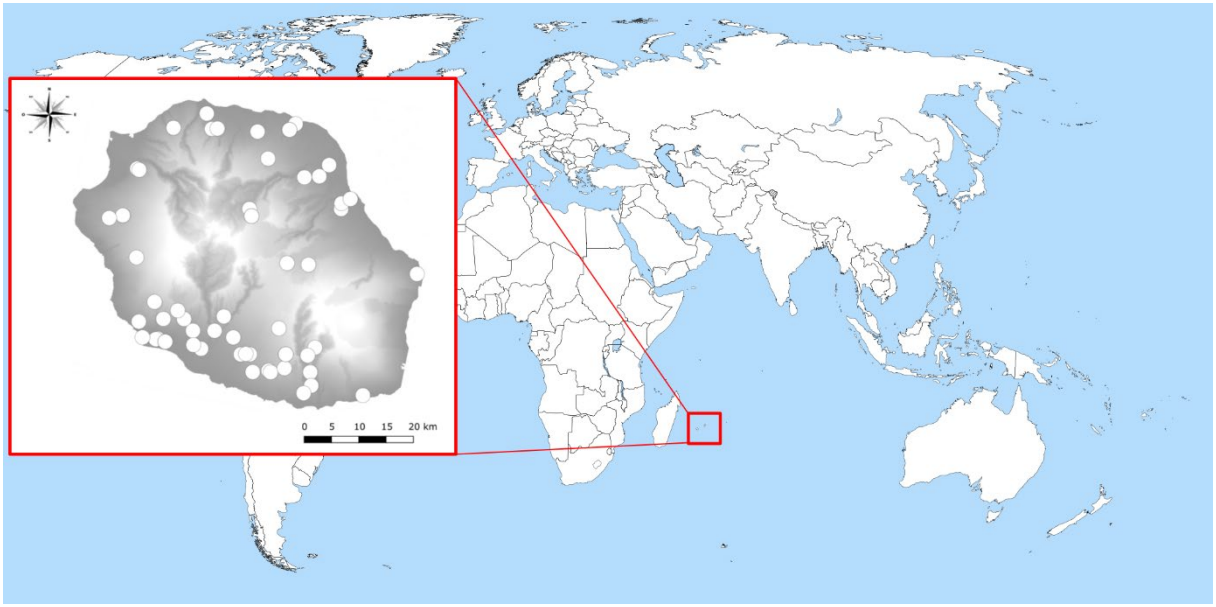
Corresponding author: Olivier Esnault, GDS Réunion, Pôle de Protection des Plantes, 7, chemin de l'IRAT, Ligne Paradis, 97410 Saint-Pierre ; +262692 95 76 27 ; Fax : +262 262 27 55 47; olivier.esnault@gds974.re

Abstract

Worldwide, honeybees are suffering from combination of several stressors that impact their health and contributes to their decline. Beekeping is very important on La Reunion in the South West Indian Ocean and no major health problem nor threats had been reported by beekeepers on the indigenous subspecies *A m unicolor* . We investigated in this context of no-mortalities the honeybee pathosphere (detection, prevalences and diversity of ectoparasites, major viruses, bacteria and microsporidia) through a sanitary survey conducted on 111 colonies randomly sampled. Two viruses among seven tested were detected (BQCV, CBPV). A low infection rate (23%) of European foolbrood, 100% of infection by *N. ceranae* and 15% of *Acarapis sp*. positive colonies, were detected. Nevertheless no CCD nor acute mortalities were recorded between 2011 and 2015. The absence of *V. destructor* could explain this absence of mortalities even though the colonies from La Reunion Island had multi-infections profiles.

.

Figure 1. Sampling sites on La Reunion Island



Introduction

Honeybees are one of the most valuable insects in agro and natural ecosystem and their value is estimated annually approximately to US$ 175 billion worldwide. They also play a major role for human well-being such as food safety or human health (Smith *et al.*, 2015) by different services for crops or natural ecosystems.

Since the last decade, colony losses increased mainly in Europe and North America. The drivers impacting honeybee health are numerous and can be split in both categories: abiotic and biotic factors (Steinhauer *et al.*, 2018). Climate warming, food decrease by limited flower resources, pesticides and honeybee colonies management, concern abiotic factors. Concerning the biotic factors, several types of pathogens can affect honeybee health: bacteria, fungi, virus and arthropods. Two major bacteria affect honeybee: *Paenibacillus larvae* and *Melissococcus plutonius,* causative agent of American and European foulbrood, respectively. The first one is a major sanitary threat for honeybee colonies (Genersch, 2010) and the second one is a bacterial brood disease with a worldwide distribution and variable sanitary impact (Takamatsu *et al.*, 2014). Two species of Microsporidia are affecting honeybees: *Nosema apis* and *N. ceranae*. *N. apis* is the causative agent of nosemosis that is affecting the digestive tract of honeybees (Webster *et al.*, 2004), *N. ceranae* is known to play a major role in the decline of the honeybee populations (Higes *et al.*, 2008). More than 16 viruses are known to infect honeybees. Among them, several viruses plays an important sanitary role: acute bee paralysis virus (ABPV, Family: *Dicistroviridae*, Genus: *Apavirus*), Kashmir bee virus (KBV, Family: *Dicistroviridae*, Genus: *Apavirus*), sacbrood virus (SBV, Family: *Iflaviridae*, Genus: *Iflavirus*), chronic bee paralysis virus (CBPV, unassigned, complex taxonomy), black queen cell virus (BQCV, Family: *Dicistroviridae*, Genus: *Cripavirus*) and deformed wing virus (DWV, Family: *Iflaviridae*, Genus: *Iflavirus*) that is supposed to play a major role in honeybee mortalities (Roberts *et al.*, 2017). DWV is transmitted by the mite *Varroa destructor* (de Miranda and Genersch, 2010), probably one of the main sanitary threat for honeybee colonies. The mite impacts the honeybee pathosphere ecosystem (Mondet *et al.*, 2014) and causes severe colony mortalities. Honeybee pathogens diversity are well documented in different parts of the world. Nevertheless, tropical honeybee health and their pathogen diversity is actually sparsely

Table 1. List of primers used for PCR detection #SuppData

Pathogen	Primers names	Primers	Size (pb)	Tm (°C)	Extension time (sec)	References
ABPV	ABPV-F3	5'-GGAACATGGAAGCATTATTG-3'	688	57	45	(Bailey and Ball, 1978)
	ABPV-R3	5'-AATGTCTTCTCGAACCATAG-3'				
	ABPV 3	5'-CATATTGGCGAGCCACTATG-3'	398	55	30	(Bakonyi *et al.*, 2002)
	ABPV 4	5'-CCACTTCCACACAACTATCG-3'				
BQCV	BQCV-F	5'-TGGTCAGCTCCCACTACCTTAAA-3'	700	62	45	(Benjeddou *et al.*, 2001)
	BQCV-R	5'-GCAACAAGAAGAAACGTAAACCAC-3'				
	BQCV 3	5'-GGTGCAAGTCTCTTCCTAG-3'	606	55	30	(Blanchard *et al.*, 2007)
	BQCV 4	5'-AATAACCTGAAAGGCCAAGAG-3'				
IAPV	IAPVIGR-F	5'-CGATGAACAACGGAAGGTTT-3'	767	51	60	(Cox-Foster *et al.*, 2007a)
	IAPVIGR-R	5'-ATCGGCTAAGGGGTTTGTTT-3'				
	IAPV 3	5'-CGATGAACAACGGAAGGTTT-3'	767	55	30	
	IAPV 4	5'-ATCGGCTAAGGGGTTTGTTT-3'				
KBV	KBV-F2	5'-GTTTCTATGCAAATCGCA-3'	270	53	30	(de Miranda *et al.*, 2010a)
	KBV-R2	5'6TCCAGGCACATTCTG-3'				

studied, even in a *V. destructor* free context, despite of the mite's global spread and recent countries infestation like in Madagascar (Rasolofoarivao *et al.*, 2013).

No colony mortalities were ever recorded on La Reunion island and varroa mite is supposed to be absent. Beekeeping is a major activity on this South West Indian Ocean tropical island. The honeybee subspecies found in La Reunion is *Apis mellifera unicolor* (Latreille, 1804), originates from Madagascar and belonging to the African A evolutionary lineage (Ruttner, 1988). Recent genetic analyses showed that current *A. mellifera unicolor* present in La Reunion are the result of an old isolation (before human settlement) of populations of *A. mellifera unicolor* and recent admixture with introduction of mainly European subspecies between 1875 and 1982 (Techer *et al.*, 2017b).

The aims of this study were to identify the different pathogens present within the honeybee colonies without *V. destructor* on a tropical island with an indigenous subspecies, then the honeybee population health status.

Material and method

Study area and sampling

La Reunion Island is a small (2512 km²) volcanic island located in the South West Indian Ocean, 700 km east of Madagascar, and belongs to the mascarene archipelago (Figure 1). La Reunion belongs to one of the five most important hotspot of biodiversity in the world (Mittermeier *et al.*, 2011).

Among the 13 000 honeybee colonies recorded on La Reunion Island (Veterinary Services, 2012), 111 colonies were randomly sampled from June to the end of October 2012 in 24 townships from La Reunion Island (Figure 1). For each colony, a minimum of 50 forager honeybees, 500 inner honeybees and 20 larvae were sampled. All samples were alive when collected and shipped to the laboratory in manila envelopes at -04°C and then stored at -20°C until processing. Every sample site was georeferenced and the number of colonies per apiary recorded. Maps and geographical information system were performed using QGIS V 2.14.1-Essen (QGIS Development Team, 2016).

SBV	SBV-F	5'-GCTGAGGTAGGATCTTTGCGT-3'	824	56	60	(Chen *et al.*, 2004b)
	SBV-R	5'-TCATCATCTTCACCATCCGA-3'				
	SBV 1	5'-ACCAACCGATTCCTCAGTAG-3'	469	55	30	(Grabensteiner *et al.*, 2001)
	SBV2	5'-CCTTGGAACTCTGCTGTGTA-3'				
DWV	DWV-F	5'-ATCAGCGCTTAGTGGAGGAA-3'	702	54	60	(Chen *et al.*, 2004b)
	DWV-R	5'-TCGACAATTTTCGGACATCA-3'				
	DWV3	5'-GGTCCGCGGCTAAGATTGTA-3'	420	55	30	(Blanchard *et al.*, 2007)
	DWV 4	5'-CGGCTGTTTGATGGAAGAAGTT-3'				
Nosema ceranae	MITOC-FOR	5'-CGGCGACGATGTGATATGAAAATATTAA-3'	218-219	62	30	(Martin-Hernandez *et al.*, 2007)
	MITOC-REV	5'-CCCGGTCATTCTCAAACAAAAAACCG-3'				
Nosema apis	APIS-FOR	5'-GGGGGCATGTCTTTGACGTACTATGTA-3'	321	62	30	(Martin-Hernandez *et al.*, 2007)
	APIS-REV	5'-GGGGGGCGTTTAAAATGTGAAACAACTATG-3'				
Melisococcus plutonius	EFB-1	5'-GAAGAGGAGTTAAAAGGCGC-3'	832	55	30	ANSES (internal method)
	EFB-2	5'-TTATCTCTAAGGCGTTCAAAGG-3'				

Pathogens screening and detection

The following pathogens were screened by several methods (visual observation or PCR), as described below: *V. destructor*, *Tropilaelaps sp.*, *Acarapis sp.* (including *woodi*), *N. apis*, *N. ceranae*, *M. plutonius* and *P. larvae*. Six major viruses affecting honeybee health were also screened: ABPV, BQCV, CBPV, DWV, KBV and SBV.

Mite detection:

The analyses were carried out on the inner honeybees in Jura departmental veterinary laboratory in France. The protocols for *Acarapis sp.*, *V. destructor* and *Tropilaelaps sp.* were following the OIE (World Organization for Animal Health) methods.

Microsporidia and bacteria detection

Microsporidia detection for *N. apis* and *N. ceranae* was carried out in the national reference laboratory for honeybee health (ANSES Sophia Antipolis). 10 positive honeybee (forager honeybees) samples seen by optic microscopy were crushed using tissue Lyser Qiagen® MM 301. DNA was extracted with High Pure PCR Template Preparation Kits (Roche Diagnostics®). Then, for microsporidia, the diagnostic PCR protocol used is as described by (Martin-Hernandez *et al.*, 2007).

Concerning bacteria detection (*P. larvae* and *M. plutonius*) 10 honeybee larvae were used. PCR diagnostic protocol used is also the same as described in Manual of diagnostic tests for terrestrial animals. Primers used for these PCR are summarized in Table 1.

Virus detection

Forager honeybees were analyzed at the national reference laboratory for honeybee health (ANSES Sophia Antipolis) and inner honeybees at CIRAD UMR PVBMT laboratory for viral detection.

Concerning analyses provided by ANSES, RNA extraction was realized with the High Pure Viral RNA Kit by Roche Diagnostics®. Viral RNAs were then synthetized into cDNA by using random primers pdN6 (Invitrogen®, Ref 48190-011) and SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen®, Ref 18064014).

Paenibacillus larvae	AFB-3	5'-CTTGTGTTTCTTTCGGGAGACGCCA-3'	1096	55	30	ANSES (internal method)
	AFB-4	5'-TCTTAGAGTGCCCACCTCTGCG-3'				
EF-1α	EF-1α-FOR	5′-TGCAAGAGGCTGTTCCTGGTGA-3′		55	30	(Kojima et al., 2011)
	EF-1α-REV	5′-CGAAACGCCCCAAAGGCGGA-3′				

PCR detections were realized according to the literature for ABPV (Bakonyi *et al.*, 2002), KBV (Carletto *et al.*, 2010), DWV (Blanchard *et al.*, 2007), SBV (Grabensteiner *et al.*, 2001) and BQCV (Blanchard *et al.*, 2007). For CBPV a Real Time PCR was realized (Blanchard *et al.*, 2007) on the cDNA. All the primers used for the viral detections are summarized in Table 1.

A different RNA extraction protocol was applied for inner honeybees in CIRAD. For RNA extraction, samples were homogenized in a PBS grinding buffer (Molecular Cloning by Sambrook, Fritsch and Maniatis, Apendix B.12) using a ratio of 350 mg of 10 honeybee tissue to 1 ml of PBS. RNA was extracted from 300 µl of tissue homogenized by adding 800 µl Trizol LS reagent (Invitrogen) and 200 µl of chlorophorm, following by an isopropanol precipitation and an ethanol washing. RNA was finally eluted in 20 µl of RNase-free water. A DNAse treatment with RQ1 RNase-Free DNase (Promega®) was made on 4 µl of the RNA eluted according to the manufacturer's protocol. RNA quality and quantity were estimated on 1% agarose gel before cDNA synthesis.

Honeybee EF-1α was used as a positive control to verify the quality of RNA extraction as well as reverse transcription, and also as an internal loading standard (Table 1).

Virus PCR detection were realized according to the same protocols as for ANSES except for BQCV with a different primer pair: BQCV-F and BQCV-R (Benjeddou *et al.*, 2001) available in Table 1.

Molecular phylogeny of honeybee viruses:

Manual editing and alignment of viral sequences were made with Clustal W (Thompson et al. 1994) in Mega 6.0 software (Kumar *et al.*, 2008) for sequences obtained. The optimal model of sequence evolution was defined by JModelTest (Posada, 2008) was used for phylogenetic reconstruction. The Bayesian trees were constructed with MrBayes (Ronquist and Huelsenbeck, 2003) for each viral groups. Trees, were then edited using Figtree 1.4 software (Rambaut and Drummond, 2006).

Sanitary survey

Two questionnaires were used in this survey by face to face interviews with beekeepers. The first one was used to describe hives and colonies (kind of hive, strength, humidity…). Strength of the colony was

measured by the number of brood and reserve combs inside the hive. The second questionnaire was used to investigate the beekeeper's practices such as transhumance, disinfection, etc.

For this survey, a Colony Collapse Disorder (CCD) case was defined in three points according to Vanengelsdorp et al. (2009):

(1) the rapid loss of adult worker honeybees from affected colonies as evidenced by weak or dead colonies with excess brood populations relative to adult honeybee populations

(2) a noticeable lack of dead worker honeybees both within and surrounding the affected hives

(3) the delayed invasion of hive pests (e.g., small hive beetles and wax moths) and kleptoparasitism from neighboring honeybee colonies

Acute mortalities case was defined when severe honeybee mortalities were observed in front of and within the hive associated with the death of the colony.

Survey for colony health evaluation and supposed causes of sanitary troubles

This survey was conducted by phone in August 2015. 95 beekeepers were randomly chosen among the 353 officially registered to the French Ministry of Agriculture in 2015. The aim of this survey was to characterize the sanitary events that occurred within the apiaries during the past year (between 2014 and 2015, following the pathogen survey) and to monitor colony mortalities. Several elements such as the number of colonies owned the year before and in 2015, or beekeeper's status (professional vs. amateurs) were asked. This survey is only based on declared sanitary events with supposed causes by beekeepers. The sanitary events were characterized by beekeepers according to a syndrome approach: trembling and/or crowling honeybees, massive honeybee mortalities in front of the hive (without colony mortality), diarrhea, irregular brood and colony mortalities. None of the described sanitary events that occurred was diagnosed, neither confirmed by a veterinarian nor a sanitary technician.

*Statistical analyses*Statistical analyses were carried out in R (Team, 2008). Generalized linear models (GLM), chi square test and checkerboard score (Stone and Roberts, 1990) used for pathogens distribution were calculated side by side for each pathogen detected according to the dataset.

For GLM calculation, measured data from the questionnaires and recorded observations were aggregated according to apiary description (number of hives, geographical area subdivided in four parts: North, South, West an East…), beekeeper practices, colony description (kind of hive, number of brood and reserve frames…) and sanitary practices. The two sanitary practices modalities were presence or absence. These modalities were estimated according to the effective hive materials and the effective beekeeper supplies disinfection such as hive tools. GLM calculations were carried out on a dataset obtained from the 111 surveyed and analysed colonies.

Venn diagram was built using InteractiVenn, an online tool (Heberle *et al.*, 2015).

Results

2012 Sanitary survey

The 111 sampled colonies belonged to 40 beekeepers. Among them, 14 were professionals, 20 semi-professional and 6 were amateurs. Professional status is defined according to the fact that the beekeeper's economic activity is generated only by beekeeping and that they own at least 60 colonies. One to seven colonies were surveyed per beekeeper. Every geographical part of the island was sampled in this study: 28 colonies in the East, 6 in the North, 60 in the South and 20 in the West (Figure 1). Sampled apiaries contained from one to 100 colonies (Table 2).

Transhumance and kind of hive

15 surveyed beekeepers (37.5%) were regularly moving their hives (50.88% of the sampled colonies) according to the different blooming periods that occur in different area of the island along the seasons.

The main kind of hive used on La Reunion Island is the traditional and local one called « bourbon » (90.35%). This bourbon hive is a smaller langstroth-like (only 20 cm high and ten frames). The second most popular kind of hive found on the island is the langstroth type (9.57%) also made with two chambers (Table 2).

Strength of the surveyed hive

In one body hives (n=34), an average of 5.8 brood frames was observed ($IC_{95\%}$ = 4.1-7.5) and 2.2 reserve frames ($IC_{95\%}$ = 0.8-3.6). For the two bodied hives (n=77), 6.1 brood frames ($IC_{95\%}$ = 5-7.2) were observed within the brood chamber, an average of 1 brood frame ($IC_{95\%}$ = 0.3-1.7). Reserve frames observed were respectively 2.1 ($IC_{95\%}$ = 1.2-3) and 2.5 ($IC_{95\%}$ = 1.5-3.5).

The majority of the colonies were in production (85.22%) when they were sampled, 22.61% of the colonies were artificially fed with sucrose syrup (made from local sugar cane) on a 1: 1 basis (Table 2).

Mortality assessment and good sanitation practices

The mortality survey showed no acute mortality occurrence within La Reunion's colonies and a CCD-free sanitary context for 2011 and 2012. According to beekeepers, colony mortalities are not a main and recurrent problem on the island.

Diverse clinical signs such as spotty brood, trembling honeybees, mortalities or diarrhea were not observed in any colonies during the 5 months of the survey.

42.5% of the beekeepers had good sanitation practices in their apiaries.

Pathogen analyses

As expected, neither *V. destructor* nor *Tropilaelaps sp.* were found on the samples. *Aethina tumida* was not found either such as *P. larvae*.

Concerning microsporidian pathogens, *N. ceranae* was found in every colony. Only one colony was positive with *N. apis*. This colony belonged to a 6-hives apiary in a specific isolated geographical area (Salazie's Cirque) in the East part of the island (Figure 2).

Table 3. Pathogen prevalence rates calculated

Pathogen	n	Colony prevalence (%)	$CI_{95\%}$ (%)	n	Apiary prevalence (%)	$CI_{95\%}$ (%)
Acarapis sp.[1]	111	**15.32**	8.62-22.02	60	25.00	14.04-35.96
Melissococcus plutonius[3]	111	**22.52**	14.75-30.29	60	36.67	24.47-48.86
CBPV[2]	111	**51.35**	42.05-60.65	60	56.67	44.13-69.21
BQCV[1]	111	**89.19**	83.41-94.97	60	90.00	82.41-97.60
BQCV[2]	111	**90.99**	85.66-96.32	60	96.67	92.13-100.00
BQCV[4]	111	**97.30**	94.3-100.00	60	96.67	92.13-100.00

[1] inner bees ; [2] foragers ; [3] larvae ; [4] total inner bees + foragers

Acarapis sp. mite was found in 17 colonies and *Melissococcus plutonius* in 25 colonies (n=111). The colony prevalences for the mite is 15.32% ($IC_{95\%}$ = 8.62-22.02%) and 22.52% ($IC_{95\%}$ = 14.75-30.29%) and respectively for the apiary prevalences 25.00% ($IC_{95\%}$ = 14.04-35.96) and 36.67% ($IC_{95\%}$ = 24.47-48.86%) (Table 3). The *M. plutonius* and *Acarapis* sp. positive hives were uniformly distributed all around the island (Figure 2).

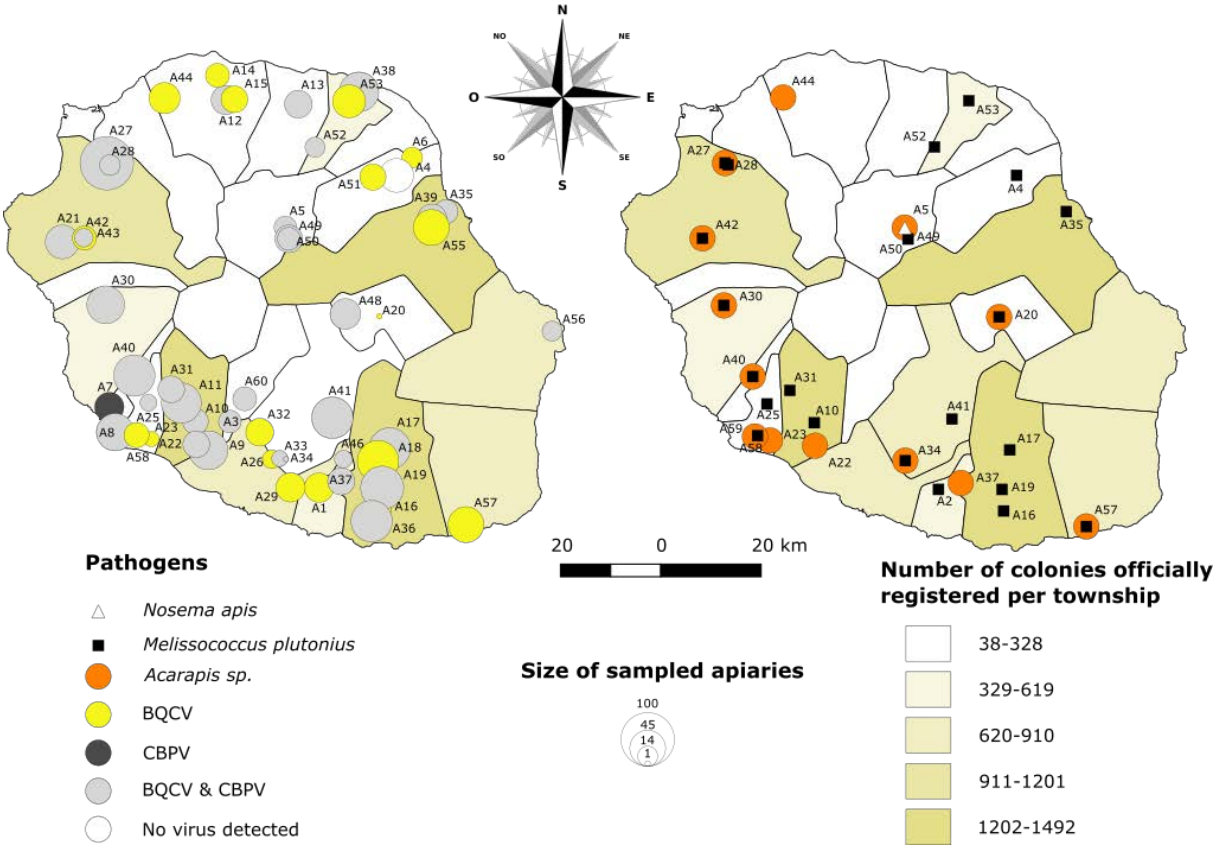
Only CBPV and BQCV were found among the 6 targeted viruses. Concerning BQCV the virus detection was carried out on foragers and inner honeybees. For forager honeybees (n=111), 101 sampled colonies were positive for BQCV (estimated prevalence 90.99 % - $IC_{95\%}$ = 85.66-96.32%) with 58 positive apiaries (n=60). Apiary prevalence was 96.67 % (IC95% = 92.13-100%). For inner honeybees, 99 colonies (n=111) were positive for BQCV (estimated prevalence 92.79% - $IC_{95\%}$ = 87.98-97.60%) with 58 positive apiaries (n=60) (estimated prevalence 96.67% - $IC_{95\%}$ = 92.31-100.00%). If the estimated prevalences between inner honeybees and foragers are combined, then the BQCV estimated prevalence for colonies is 97.30% ($IC_{95\%}$ = 94.3-100.00%) and for apiaries is 96.67% ($IC_{95\%}$ = 92.31-100.00%).

No significant differences between the inner and forager honeybees and infected and non-infected apiaries were found for BQCV (chi square test, P>0.05).

Concerning CBPV, 57 colonies (n=114) and 37 apiaries (n=60) were positive. Prevalences measured were respectively 50.89% ($IC_{95\%}$ = 41.63-60.15%) and 61.67% ($IC_{95\%}$ = 49.37-73.97%) (Table 2).

All colonies were detected positive for pathogens with diverse coinfections (Figure 3). For two pathogen coinfections (n=39), presence of *N. ceranae* and BQCV were recorded in 92.31% ($IC_{95\%}$ = 83.94-100.00%) within the two-pathogen class. For the three-pathogen class (n=51), coinfection with *N. ceranae*, BQCV and CBPV was the most represented: 72.55% ($IC_{95\%}$ = 60.30-84.80%). In the four pathogen class (n=17), the main coinfection observed was *N. ceranae*, CBPV and *M. plutonius* in 52.94% ($IC_{95\%}$ = 29.21-76.67%). Lastly for the last four honeybee colonies with five pathogens recorded, three were positive for *N. ceranae*, BQCV, *M. plutonius* and *Acarapis sp.*

Figure 2. Pathogen distribution on the island



BQCV phylogeny

Eight BQCV sequences from La Reunion were blasted in Genbank and the identity confirmed with 97% similarity with other BQCV isolates (AF521640 from Germany). Diverse sequences from the literature were used to build a phylogenetic tree including different strains of European and American BQCV and other BQCV strains affecting different honeybees from several part of the world (Africa, Europe, America and Asia) and from other hymenoptera such as *Bombus ternarius* and *Apis cerana*. The closest sequences were observed between (GDS050 – Saint-Joseph) and a sequence from Germany (accession number in GenBank: AF521640) (Figure 4). In the La Reunion group (n=8 sequences), 33 polymorphic sites were observed. Sequences of 616 nucleotides were used for phylogenetic trees construction for BQCV viruses, respectively.

Interactions between pathogens

The interactions between each pathogen were estimated and their "checkerboardedness" measured by using C-score (Stone and Roberts, 1990). Interactions were only found between *Acarapis sp.* and BQCV (BQCV found in forager, inner honeybees and both combinations). Each test was significant ($p<0.001$). So the null hypothesis that the both species (*Acarapis sp*. and BQCV) are randomly disseminated can be excluded.

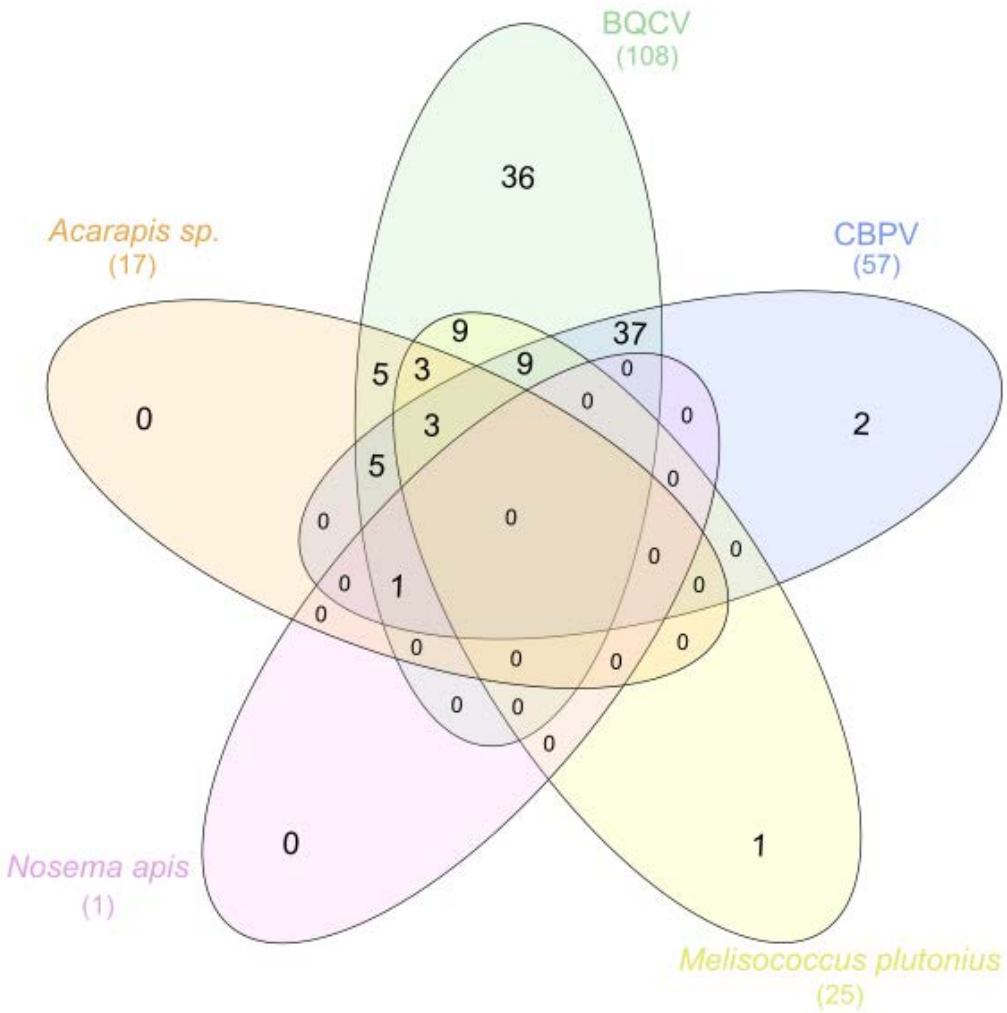
Risk factors characterization

No risk factors among the colony parameters were identified for each pathogen found. No temporal effects were characterized for each pathogen.

Sanitary events survey analysis for 2014

Among the 95 beekeepers surveyed, 25 were considered as professional (>60 colonies) and 70 as hobbyists. 14 professionals declared having sanitary problems within their colonies in 2014 and 29 hobbyists declared having honeybee colonies sanitary troubles.

Figure 3. Venn's diagram showing the coinfections occurring within La Reunion honeybee colonies


BQCV
(108)
36
Acarapis sp.
(17)
CBPV
(57)
0
2
9
37
5
3
9
0
0
3
0
5
0
0
0
0
0
1
0
0
0
0
0

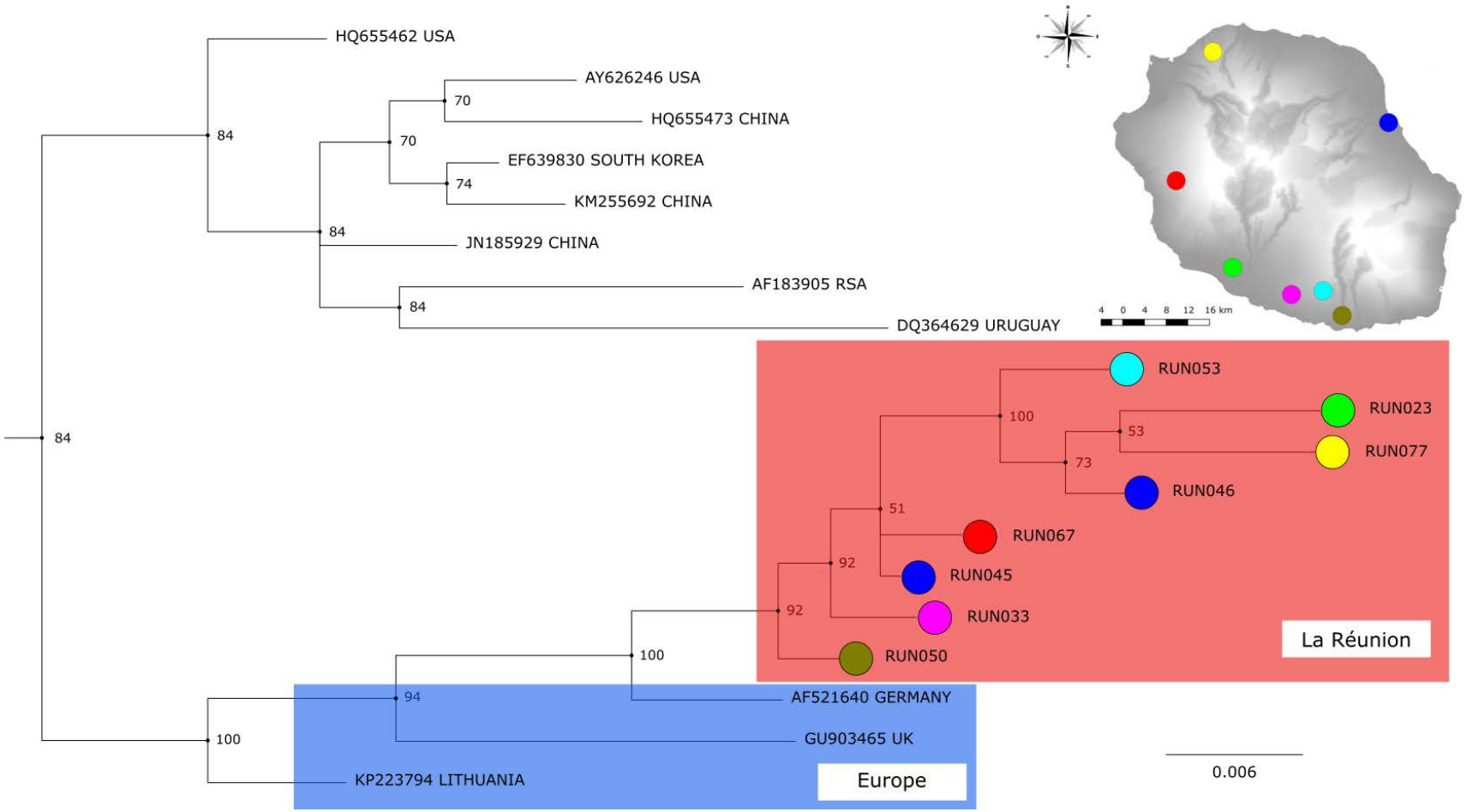
Analysis of the mortalities survey for 2014 showed a seasonal increase of honeybee sanitary troubles during the austral winter in July and August. In the beekeepers population with honeybee sanitary problems, more sanitary problems were occuring when the beekeepers were amateurs rather than professionnal ($p=0.02$) and in august ($p<0.05$) (Figure 5). Only 4 cases of colony mortalities on the were reported on the 1993 colonies owned by surveyed beekeepers . Mortalities prevalence for 2014 on La Reunion island can be estimated at 0.2% ($IC_{95\%}$ = 0.0-0.4%). That seems to confirm the previous hypothesis that colony mortalities were not a main and recurrent problem on the island during the surveyed years. 24 cases of honeybee mortalities in front of the hives were reported by beekeepers. These carpets of dead honeybees are observed all year long by beekeepers but cases were more important in May and August during the austral winter. One case of trembling honeybees was reported in December 2014.

Apis mellifera unicolor seems to have a tendance to swarming especially in March, April and during the two austral winter months of July and August, but the main cause of honeybee mortality reported by beekeepers seems to be starvation especially in winter. Intoxications and scavenging seems not to be main causes of mortality for beekeepers.

Discussion

This is the first multipathogens survey report from the indigenous *Apis mellifera unicolor* island population in a varroa-free context. This report showed that without *V. destructor* no acute mortalities affect colonies, despite the high prevalences of several major pathogens such as *N. ceranae* (100%) and *M. plutonius* (22.81%). Lethal effects of varroa mite are well known and described in various infested areas and is a major contributor to colony losses. In the Republic of South Africa (Allsopp, 2007), acute colony mortalities were observed directly after varroa mite introduction. The absence of acute mortalities on La Reunion is most probably directly related to the absence of varroa mite.

Figure 4. BQCV Bayesian phylogenic tree with 8 sequences coming from 7 sites of La Réunion Island, and 11 sequences publicly available. The dark blue dot is for sampling done in Saint-Benoît, yellow dot from Saint-Denis, red dot from Saint-Leu, light green dot from Etang-Salé, pink dot from Saint-Pierre, light blue dot from Petite-Île and dark green dot from Saint-Joseph. Numbers associated with nodes indicate the posterior probability for each node.

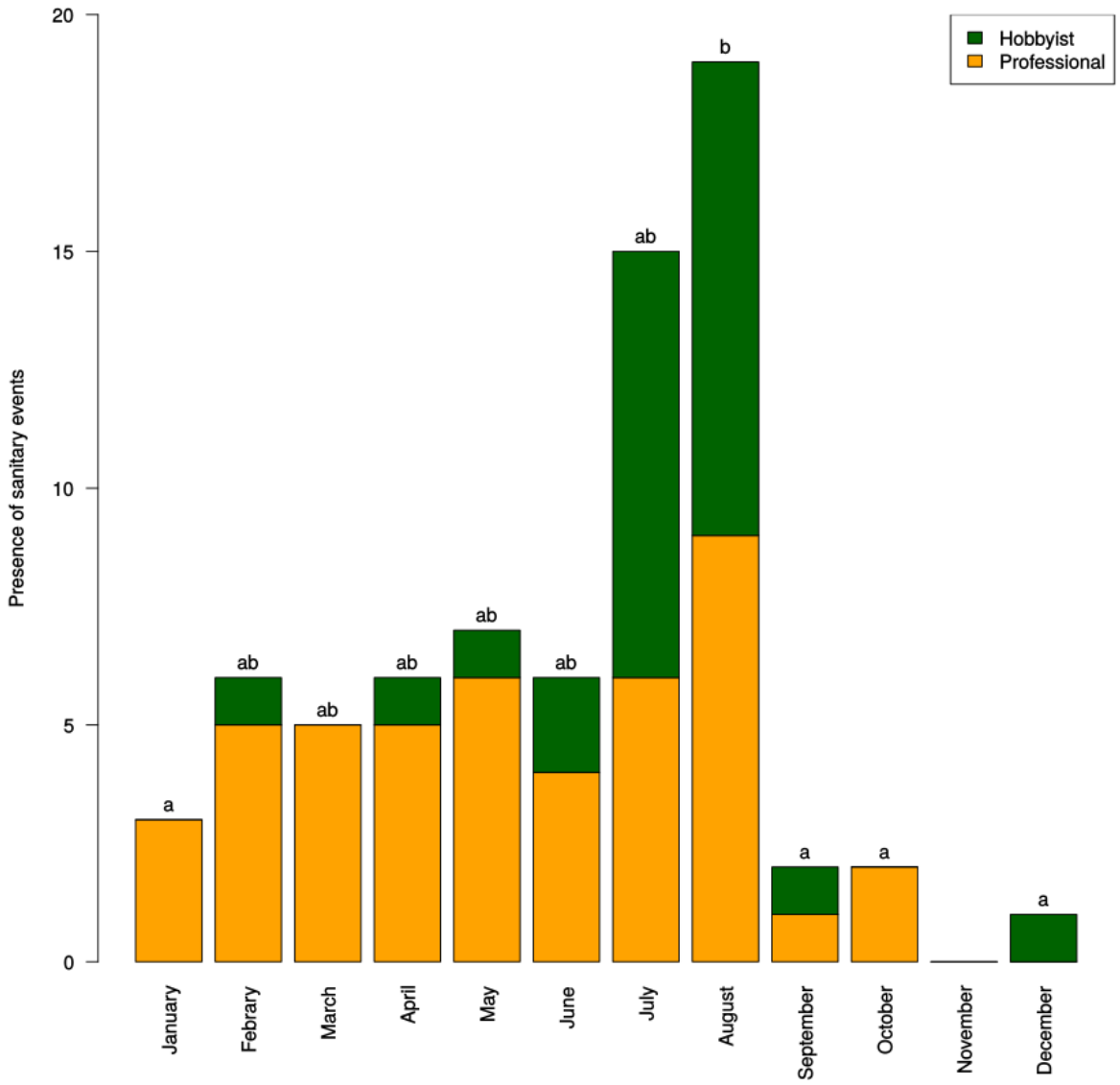


P. larvae is another major lethal agent for honeybee colonies. The absence of detection by bacteriology culture and PCR seems to confirm its absence on the island. Due to its high survival capacities by sporulation, importation restriction of apicultural used material (Genersch, 2010) is an important measure, already in use, to keep this the island free of this pathogen. Notwithstanding, *P. larvae* spores may survive in honey (Genersch, 2010). No honey importation restriction is existing on La Reunion Island and every year between 200 and 300 tons of honey are imported from abroad (Europe, Asia) (source : French Ministry of Finance). The main risk is for La Reunion honeybee colonies to be fed with imported honey from uncertain sanitary status.

N. ceranae was found in every sampled colony during the survey, such high rates of infestation are scarcely found. Different prevalence known in different countries showed various pathogen incidence: 4-15% in the USA (Cavigli *et al.*, 2016), 57% in Hungary (Csaki *et al.*, 2015). In East Africa, *N. ceranae* has been observed in Egypt, Kenya, Tanzania and Ethiopia (Hussein, 2000). Similar high rates prevalence were only observed in Hawaii (89-95%) (Martin *et al.*, 2013). The *N. ceranae* prevalences observed within the colonies seems to be really different between continental and island context. *N. ceranae* has been described to cause severe mortalities in honeybee populations in other European countries (Higes *et al.*, 2008). Interactions with different pesticides are known to potentiate the lethal effects of *N. ceranae* on individual honeybee (Aufauvre *et al.*, 2014). Environmental quality was tested on La Reunion in 2011 and no major polluants were identified in two different areas of the Island: an urban anthropized site and a rural site (Badiou-Beneteau *et al.*, 2013). In 2005-2006, a massive chikungunya epidemic occurred on La Reunion Island (Renault *et al.*, 2007). The adult vector (*Aedes albopictus*) control was made by the use of nebulized deltamethrin (Delatte *et al.*, 2008) and is still used according to the mosquito population dynamics. In 2017, a worldwide honey survey showed neonicotinoids presence in La Reunion honey samples (Mitchell *et al.*, 2017). Inspite of these elements and *N. ceranae* presence in every sampled colony, no acute mortalities were recorded on La Reunion Island during the 2011-2014 period.

N. ceranae is native from Asia and was first described in Europe in 2006 (Higes *et al.*, 2006). The last queen importations referenced from mainland France on La Réunion island are in the early 80’s,

Figure5: Honeybee colonies sanitary troubles declared for 2014 year per beekeeper. In August, there are more colonies with sanitary troubles than in January and in September to December. The height of the bars of the graphs shows the number of beekeepers having one sanitary trouble within their colonies. Months with (a) are statistically different from those with (b), and those with (ab) are not different from the others (Tukey's test).



suggesting a later introduction of the parasite via imported infested honeybees or a more recent introduction. That's why the microsporidia may have been introduced by previous queen importations. Sequencing *N. ceranae* DNA could permit to identify the route of this microsporidia's introduction.

N. apis was observed once in one colony together with *N. ceranae*. Similar results were observed in Uruguay with a single *N. apis* case registered in *N. ceranae* major pathogen context (Antúnez *et al.*, 2015). This parasite is well known in temperate cooler climates (Fries, 2010b) with diarrhea symptoms instead of *N. ceranae* infestation that is known as symptomless in honeybee colonies. The decrease of *N. apis* together with the increase of *N. ceranae* in many temperate countries had been hypothesized as a result of competition events between the two *Nosema* species (Chen *et al.*, 2008). *N. ceranae* was described as a better competitor than *N. apis* in temperate climate on European lineage of *A. mellifera*, whereas *N. apis* seems to be still found in East and South Africa (African honeybee lineage): Republic of South Africa (RSA) (Strauss *et al.*, 2013) and Kenya (Muli *et al.*, 2014). In the tropical context of La Reunion Island, *N. ceranae* seems to have overcome *N. apis* due to a previous invasion during the 70's and 80's. One year after the sampling, in the apiary found *N. apis* positive the parasite was never highlighted.

No clinical signs of European foulbrood were observed during the survey despite a prevalence of *M. plutonius* of 22.81% in the apiaries. This prevalence was lower than what could be observed in Switzerland (80% in Switzerland) (Forsgren *et al.*, 2005) but higher than those observed in Spain in 2006-2007 (0-0.5%) (Garrido-Bailon *et al.*, 2013). Similar results were observed in Mongolia with the absence of detection of the causative agent of European foulbrood (Tsevegmid *et al.*, 2016). In South and East Africa, *M. plutonius* is known from Tanzania (Hussein, 2000) and RSA (Davison *et al.*, 1999). These different presence data show that the bacteria has a worldwide distribution with different sanitary impacts. *M. plutonius* seems to have always been reported on La Reunion Island and is very well known by beekeepers. When an episode of European foulbrood occurs, La Reunion beekeepers move their colonies to areas where important blooming places in indigenous forest are available. Concerning viruses, only two viruses were observed with high prevalence rates (BQCV and CBPV). BQCV prevalence rates are very high in La Reunion honeybee population. In spite of the BQCV detection PCR

were not realized with the same primers, no significant differences were observed between inner honeybees and forager honeybees. For field sanitary technicians or veterinarians it's easier to sample 50 foragers per colonies than inside the hives to have the same results. BQCV is a worldwide virus and it

is found worldwide (Tentcheva *et al.*, 2004) even in Africa (Kajobe *et al.*, 2010). BQCV has been found in collapsing colonies (Cornman *et al.*, 2012) and its sanitary effects could be potentiated by insecticides (Doublet *et al.*, 2015) while it seems to have a limited effect on both worker and drone health (Retschnig *et al.*, 2014b). However, African honeybee seems not to be more resistant to BQCV than European lineage honeybee (Hamiduzzaman *et al.*, 2015). In La Reunion Island, BQCV seems not to have any important sanitary effects on honeybee colonies.

The closest strain of BQCV (blasted in GenBank) from La Réunion was a strain recorded from Germany (AF521640). Regular but non-massive European queen importations from the end of the 19th century until the past decades could explain this situation. On the other hand, the lack of information about BQCV diversity in the South West Indian Ocean or on A lineages in closest African countries does not allow to go further. In a different context, similar results were observed in Mongolia with a close relationship between Mongolia BQCV strains and European strains, maybe due to European honeybee importations via Russia (Tsevegmid *et al.*, 2016). In the same way, in the 70's BQCV symptoms were observed. In 1976 a case was diagnosed in colonies of a queen breeder in the West part of the Island. The European virus could have been imported during this period and could have generated symptoms.

This proximity of La Reunion BQCV with the European BQCV lineage seems to be a reflect of the mixed honeybee population: A lineage crossed with European lineage (Techer *et al.*, 2017b).

CBPV is another virus distributed worldwide that could affect seriously colony health, it is characterized by trembling, sightlessness and hairless-black individuals crawling at the hive entrance (Ribiere *et al.*, 2010). This virus is present on every continent (Chen *et al.*, 2011). The prevalence rates observed (50.89%) at the colony level in our study are different from rates observed in several countries. For example, in Canada, CBPV was found in only 6.2% of healthy colonies (Desai *et al.*, 2016). This virus seems to be absent in Africa (Mumoki *et al.*, 2014). Nevertheless the genetic diversity of CBPV has to

be studied in more details in the SWIO area to understand the diversity between the islands and to exclude/or acknowledge the hypothesis, like for BQCV, of a supposed European introduction. In spite of *V. destructor* absence, DWV was identified in several places before mite introduction like in Hawaii (Martin *et al.*, 2012) or New-Zealand (Mondet *et al.*, 2014). Nevertheless, this virus was not identified during the survey in La Reunion Island. Similar results were observed in Australia with *V. destructor* and mortalities absence (Roberts *et al.*, 2017).

Acarapis sp. prevalence rates in the present sanitary survey were almost similar to prevalence rates observed in Spain in 2006-2007 (13-15.5%) (Garrido-Bailon *et al.*, 2012). The complete identification of *A. woodi* was possible in only one sample. Clinical signs caused by *A. woodi* are not really specific. At the colony level, the infestation could be asymptomatic. At the individual honeybee level, mortalities, crawling honeybees or paralyzed honeybees with dislocated wings (known as K-wings) could be seen but these symptoms were never recorded during the survey. The other suspected species is *Acarapis dorsalis* that is an external parasitic mite with an unknown pathogen role (Delfinado-Baker and Baker, 1982). These *Acarapis sp*. prevalence rates could be explained by the absence of acaricide treatments usually used for *V. destructor* on La Reunion Island. *Acarapis woodi* is known to be a vector of APV, CBPV and KBV and to facilitate CBPV transmission (Fernández, 1999). The high correlation (checkerboard test) between BQCV and *Acarapis sp.* presence might suggest that the involved species of *Acarapis* is susceptible to be a potential vector of BQCV.

Mortality assessment and the major role of the beekeeper

Between 2011 and 2014, no acute mortalities of colonies were recorded on La Reunion Island and a mortality rate of 0.2% was measured for 2014. One of these reasons might probably due to the absence shown in this study of the two main sanitary hazards: *V. destructor* and *P. larvae*.

The island context confers a high risk level of exotic main pathogen introduction for La Reunion honeybee colonies. Varroa mite presence was highlighted in 2010 in Madagascar (Rasolofoarivao *et al.*, 2013) and in Mauritius since 2014 (Esnault *et al.*, 2018). Because honeybee trade is an important worldwide activity, efficient sanitary preservation measures have to be established to preserve the *A.*

mellifera unicolor unique population of La Reunion Island. These measures include epidemiology surveillance network, ban of exotic honeybee importation or reinforcement of information about the main sanitary threats for indigenous honeybee and beekeeping.

The few cases of honeybee mortalities were registered by beekeepers especially during austral winter. Lack of resources during the austral winter months of July and August usually lead to colony feeding by beekeepers. The two main honey harvests are occurring in March/April for *Schinus terebenthifolius* and at the end of August/September for *Litchi sinensis*. During these periods of starvation, the role of the beekeeper is essential for maintaining and reinforcing honeybee health (Dolezal and Toth, 2018).

The role played by *Galleria melonella* is majored by beekeepers. The greater wax moth is a scavenger of the colony well represented in the tropical countries, especially in the African Region (Kwadha *et al.*, 2017). The most effective management of the *G. melonella* is by maintaining good sanitation, including: keeping the colony strong and with adequate food resources. Like starvation, the negative impact of greater wax moth should be restricted by good beekeeping practices.

The overrepresentation of amateurs beekeepers suffering from honeybee sanitary problems has been also observed in Europe (Jacques *et al.*, 2017). In the La Reunion Island apiculture context, professionnal beekeepers seem to be more conscientious with their colonies management. For the main part of the amateur beekeepers, the colonies are staying in the backyard and the hives are visited twice a year just for honey harvesting.

The 4th may 2017, *V. destructor* was early detected in a sentinel hive from the Epidemiological Network of Honeybee Diseases. The 22th of May, it was notified to the OIE (http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Reviewreport/Review?reportid=23778).

This unique sanitary situation on La Réunion Island with a few pathogens recorded (BQCV, CBPV, *M. plutonius* and *N. ceranae*), no CCD recorded and a context with a few pesticides will end in the following months. The sanitary situation must be monitored to assess the spread of varroa mite within local honeybee population, its sanitary impact and associated mortalities and its impact on virus diversity.

Acknowledgments

This work would not have been possible without the precious help provided by La Reunion beekeepers, Henri Bègue (Chambre d'Agriculture), and professional partners (ADA, SAR…). This work was supported by the European Union: European regional development fund (ERDF) and European Agricultural Funds for Rural development (EAFRD), by the Conseil Régional and Conseil Départemental de La Réunion by the Goupement de Défense Sanitaire (GDS) and by the Centre de Coopération internationale en Recherche agronomique pour le Développement (CIRAD).

Varroa destructor invasion within _Apis mellifera unicolor_ (Latreille, 1804) population on La Réunion island and its mortality impacts one year after its first detection

Authors

Olivier Esnault [a,b], Bernard Xavier[a], Angélique Dupuy[a], Nicolas Cazanove[a], Abalhassani Said[a], Marie-Pierre Chauzat [c], Hélène Delatte [b]

[a]: GDS Réunion

[b]: CIRAD UMR PVBMT

[c]: ANSES Sophia Antipolis, unite pathologie de l'abeille

Corresponding author: Olivier Esnault

Journal of Invertebrate pathology.

Abstract

La Reunion Island indigenous honeybee (*Apis mellifera unicolor*, African lineage) population was until recently free of *Varroa destructor*. Early detection the mite was made on the 4th of May 2017 thanks to an epidemiological network using sentinel apiaries. Since its first detection the K-strain varroa mite spread all over the island in seven months. One year after its first detection the mortality rates induced by varroa were estimated at 22.1% (survey conducted with 212 beekeepers) with heterogeneity between apiaries.

Introduction

Honeybees play a major role in cultural crop pollination (Gallai *et al.*, 2009) and in natural ecosystems in their endemic area (Biesmeijer *et al.*, 2006). The honeybee *Apis mellifera unicolor* belongs to the A lineage, is endemic to Madagascar (Rasolofoarivao *et al.*, 2015a) and indigenous to the islands of the South West Indian Ocean (Techer *et al.*, 2017a, Techer *et al.*, 2017b).

La Reunion Island is a small volcanic island located 850km East from Madagascar and 171 km west south west from Mauritius. Beekeeping is a major socio-economic activity and the territory was until recently varroa-free (Esnault et al. submitted). Honeybees are under several threats and among them, *Varroa destructor* is the main biological hazard concerning *Apis mellifera* (Le Conte *et al.*, 2010, Wegener *et al.*, 2016).

In this particular context, an epidemiological network (« SEA » network; french acronym for Epidemiological survey of honeybee diseases) was built to early detect exotic and invasive pathogens such as *V. destructor Aethina tumida* or *Paenibacillus larvae* by using a sentinel apiary network.

The aims of this study was to (i) identify the varroa strain detected in La Reunion Island, (ii) to assess the ectoparasite spread within the island from its first detection and during 7 months and (iii) to measure the mortality impact one year after its detection.

Material and methods

Sentinel apiaries of the SEA network

The sentinel apiary network consists in 7 sentinel apiaries containing 2 to 60 colonies and that were checked monthly for pathogens. Varroa mite presence check was assessed with icing sugar method. For this varroa mite detection, more than 400 young and inner bees found on an open brood frame were used.

Dispersion surveys

This first *V. destructor* invasion dynamic survey was conducted between May and June 2017. The aim of this survey was to follow the dynamic of varroa mite spread on the island and to identify varroa mite free zones in order to protect them. A second dispersion survey occurred from June to November 2017 to monitor varroa spread. During these two surveys, the maximum of "known" apiary was investigated. A "known" apiary could be defined by an apiary owned by an officially registered beekeeper for current surveyed year or a beekeeper that appeared in the national registration list for the previous years. For these two surveys, the same protocol of varroa mite detection was used as for the sentinel colonies. An apiary was defined as "positive" when at least one varroa mite was found within the apiary. A maximum of 8 colonies were investigated per apiary according to protocols described in Lee et al. (Lee *et al.*, 2010). Otherwise the apiary was defined as "negative".

Varroa mite strain identification

The analyses of a partial sequence of cytochrome oxidase 1 (COI) of the mitochondrial DNA were used to characterize the *V. destructor* strain found in La Reunion. Fourteen samples of *V. destructor* from different parts of the island were used for strain identification. For this, the final PCR mix was as follow. For 15 µl of final mix (i) 7.5 µl of type-it 2X buffer (Qiagen®), (ii) 3 µl per primer (at 20 pmol/ µl) and (iii) 1.5 µl of extracted DNA. Primers used were COXF and COXR (Anderson and Fuchs, 1998). The mix was first denaturated at 94°C for 5 minutes, and 35 cycles of denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 40°C for 80s and a final elongation step at 72°C for 2 min. The extension step was realized at 72°C for 10 min. Sequencing amplified DNA was realized by Macrogen©.

The DNA sequences obtained were read and manually edited and aligned with Clustal W (Thompson et al. 1994) in Mega 6.0 software (Kumar *et al.*, 2008). The DNA sequences obtained were blasted in Genbank.

GIS and statistical analysis

Statistical analysis were performed by using R (R Development Core Team, 2013) and GIS was performed by QGIS v. 3.0.3. (QGIS Development Team, 2016).

Results & discussion

Varroa strain identification

Fourteen sequences of varroa mites from different apiaries were sequenced to determine the mite strain. Two haplotypes were observed on La Reunion Island on sequences of 355 nucleotides were obtained (Accession numbers) then blasted. . One was major haplotype was found (93%) in most of the sampled apiaries. The second haplotype differs from the major one by one mutation. The major haplotype from La Reunion was exactly the same as the one described from Madagascar (Rasolofoarivao *et al.*, 2013) and among the two sequences known from Mauritius (Esnault *et al.*, 2018) that belongs to the Korean haplotype.. The K strain is the most common strain of varroa mite worldwide (Anderson and Trueman, 2000, Solignac *et al.*, 2005, Mumoki *et al.*, 2014, Strauss *et al.*, 2015b, Maggi *et al.*, 2016, Pirk *et al.*, 2016). Concerning a sourcing of possible introduction pathway, no hypothesis can be excluded, including an accidental introduction from the close islands of the region (Madagascar or Mauritius).

V. destructor first detection and spread

V. destructor was detected the 3rd May 2017 in Saint-Denis (Figure 1). Until the 8th of May varroa tracking was only realized in the Saint-Denis area. The 9th of May, varroa was discovered 56 km away from the primary site in the South of the island (La Rivière Saint-Louis). At the end of June 2017, only 5 zones could be defined as varroa free: the three cirques (Cilaos, Mafate and Salazie) classified as UNESCO world heritage, Bébour-Bélouve Forest in the central part of the island and in Grand Bassin, an isolated place that can be reached only by foot. At mid-November not a single area was considered varroa free (Figure 1). In La Reunion Island the spread was worsen by beekeepers transhumance. At

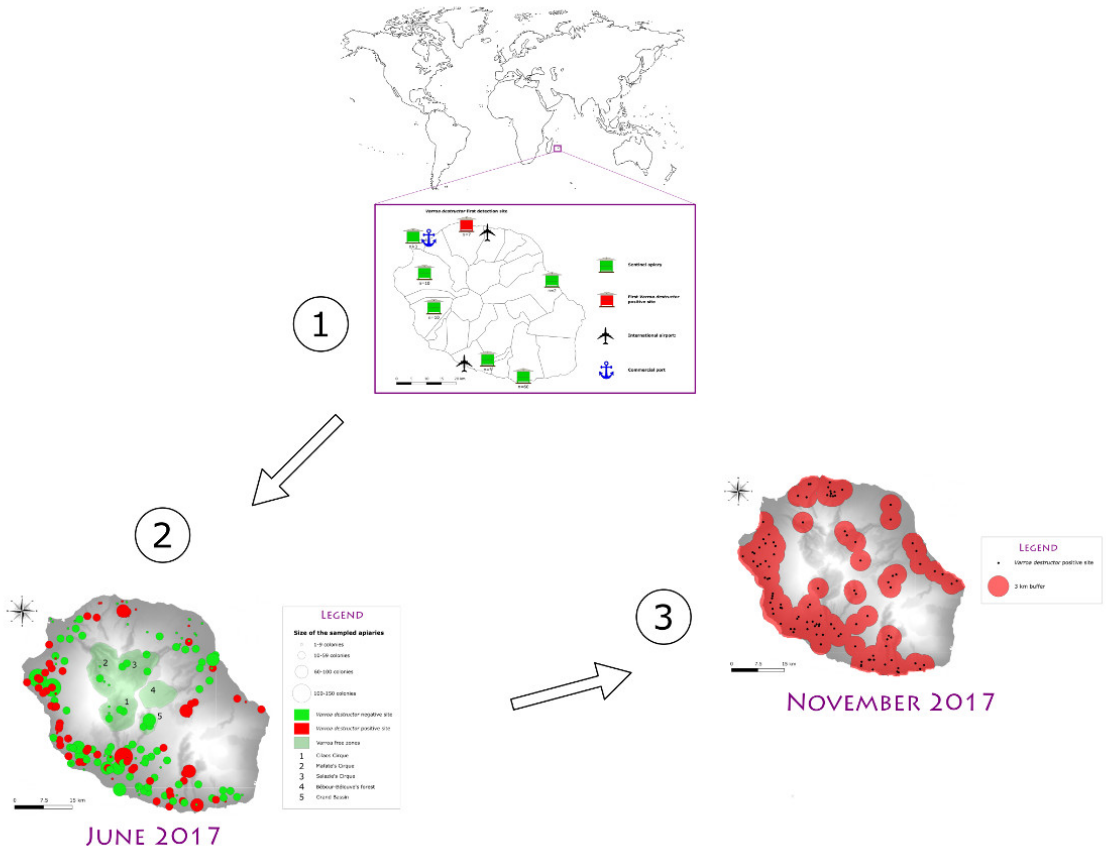


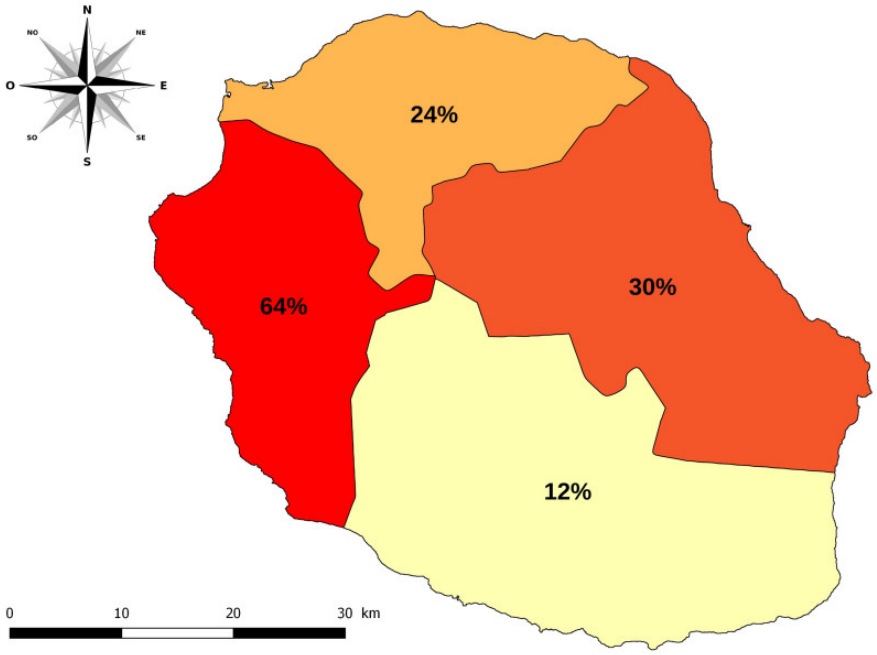
Figure 1: Localisation of La Réunion Island, the location of the first apiary where varroa mite was detected and the two maps show the spread of varroa between june an d November 2017

the end of July 2017, beekeepers were allowed to move their colonies into the East part of the island for *Litchi sinensis* honey harvest. Concerning the foot reached regions, varroa spread could be inputted to male congregations during the swarming period in October and November in La Reunion Island (Mortensen *et al.*, 2018)The transhumance practice is a major issue in La Reunion Island (Esnault *et al.*, 2014) unlike in Mauritius or Madagascar and contributes to the spread of infested colonies. Nevertheless, the spread speed (60 km/mois?) was higher to what was observed in Madagascar (Rasolofoarivao *et al.*, 2013) or in Mauritius in 2014 (Esnault *et al.*, 2018).

Mortalities

The first major mortalities were recorded by the SEA network in the west part of the island at the end of year 2017 (19th December). In this case, the beekeeper declared 80%of (n=25 colonies). The survey conducted between April and June 2018, one year after the early detection of varroa mite showed a higher mortality rate in the west part of the island (64%, SD95% = 4%) and the lowest mortalities were recorded in the South part of the island (12%, SD95% =1%) (Figure 2). No statistical differences (Pearson's chi square test) were observed between professional and hobbyist beekeepers. The global mortality rate observed in 2018 (22.1%) shows the important role played by varroa in the honeybee colony collapse. The mortality rates measured in La Reunion honeybee population before mite introduction were annually less than 1% (Esnault et al., submitted).

The global mortality rate reported here is probably underestimated for several reasons. First, the sampling size is small comparing to the number of La Reunion beekeepers (122 of 552 declared beekeepers for 2018). Second, the mortalities didn't stop after the survey is still occuring. Nevertheless this observed rate is similar to what was observed in Mauritius in 2015 (Esnault *et al.*, 2018), in Madagascar (Rasolofoarivao *et al.*, 2013) or in Republic of South Africa (Allsopp, 2007). Mortalities due to *V. destructor* are very little known in tropical countries compared to temperate countries (Matheson, 1994). In La Reunion Island, a tropical island, mortalities appeared 7 months after the early detection and the mortality rates observed were similar to what was observed in Madagascar (Esnault



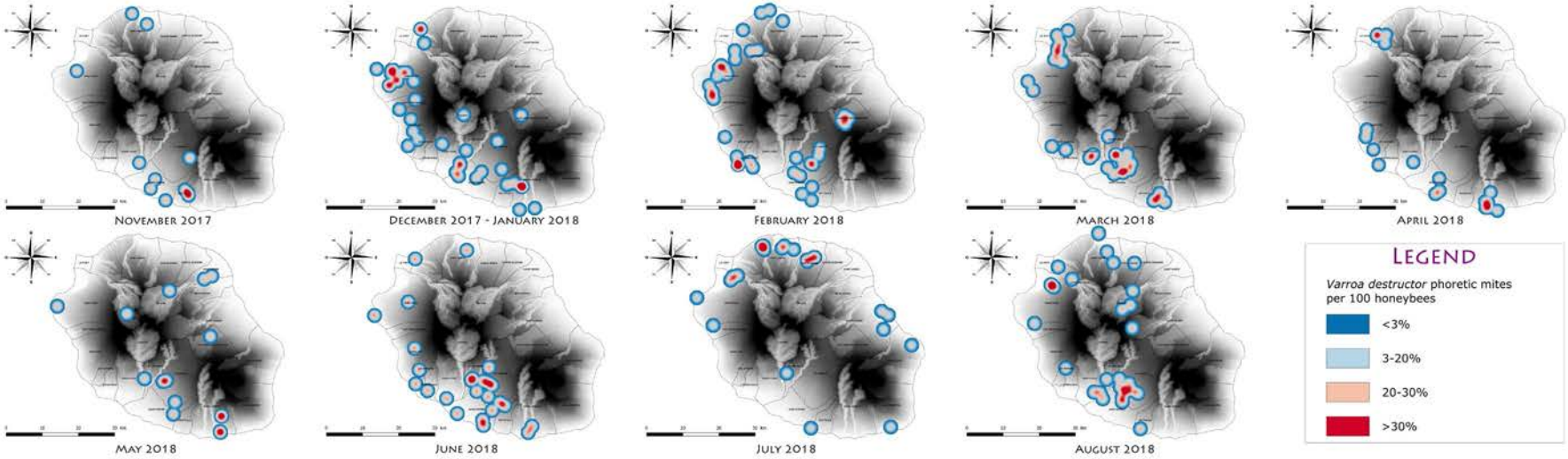
Geographical area	Total colonies	Dead colonies	Mortality rate (%)	$SD_{95\%}$ (%)
East	557	165	29.6	3.8
West	582	373	64.1	3.9
South	2595	303	11.7	1.2
North	445	108	24.3	3.9
Total	**4179**	**949**	**22.7**	**1.3**

Figure 2: Geographic repartition of colony mortalities on La Réunion island one year after varroa detection (n=57 surveyedbeekeepers)

et al., in. prep.) or Mauritius (Esnault *et al.*, 2018)*V. destructor* was early detected (before varroosis or mortality symptoms). In a tropical context, the sanitary impacts seem to develop more rapidly than in temperate countries where it takes three years after introduction to kill colonies (Ritter, 1981).

This varroa mite invasion will continue to be studied at different levels: mortalities and mite infestation of the colonies within the island, impact on the local pathosphere, adaptive response to the indigenous subspecies and social impact on beekeepers and changes induced in beekeeping in La Reunion Island.

Acknowledgement: All these studies were financialy supported by French ministry of agriculture and Conseil Départemental de La Réunion. Thanks to the La Reunion Island beekeepers for their kindness durin these trouble times.



Supp figure 3 : Monthly incidence of reported cases of varroa mites infested apiaries. The heatmap shows the infestation rate of varroa phoretic mites

Chapitre 4

Interactions pathogène/pathogène ou comment la présence nouvelle de varroa à Maurice impacte la prévalence intra colonie de *Braula pretoriensis*

Cet article a été publié avec les références suivantes :

Esnault, O., Meenowa, D., Sookar, P., Chauzat, M.-P., & Delatte, H. (2018). Spread and strain determination of Varroa destructor following its introduction to Mauritius and interactions with the bee louse Braula pretoriensis in honey bee colonies. Journal of Apicultural Research, 1-9. doi: 10.1080/00218839.2018.1517987

Deux enquêtes ont été réalisées : la première à Maurice pendant la détection de varroa en septembre 2014 et la seconde à Rodrigues en novembre de la même année.

Si le rôle pathogène et la biologie de varroa sont bien connus, la biologie de *B. pretoriensis* est plus mystérieuse. Les insectes diptères du genre Braula sont qualifiés de « poux de l'abeille ». Parmi les espèces du genre *Braula*, *B. coeca* a la répartition la plus cosmopolite et son rôle de kleptoparasite est mieux connu.

La situation apicole sur Maurice ainsi que la dispersion du varroa a été décrite. Les pratiques apicoles observées à Rodrigues ont également été détaillées. La souche de varroa identifiée appartient à la souche K sur les bases de séquences d'ADN mitochondrial.

Les taux de varroas phorétiques ainsi que les taux de *B. pretoriensis* pour 100 abeilles ont été mesurés. Les taux de *B. pretoriensis* mesurés à Maurice en l'absence de varroa sont similaires à ceux observés à Rodrigues sans varroa. Par contre le taux d'infestation de *B. pretoriensis* augmente de manière significative en présence de l'acarien.

Ces résultats sont discutés dans l'article.

Journal of Apicultural Research

ISSN: 0021-8839 (Print) 2078-6913 (Online) Journal homepage: http://www.tandfonline.com/loi/tjar20

Spread and strain determination of *Varroa destructor* following its introduction to Mauritius and interactions with the bee louse *Braula pretoriensis* in honey bee colonies

Olivier Esnault, Deodass Meenowa, Preaduth Sookar, Marie-Pierre Chauzat & Hélène Delatte

To cite this article: Olivier Esnault, Deodass Meenowa, Preaduth Sookar, Marie-Pierre Chauzat & Hélène Delatte (2018): Spread and strain determination of *Varroa destructor* following its introduction to Mauritius and interactions with the bee louse *Braula pretoriensis* in honey bee colonies, Journal of Apicultural Research, DOI: 10.1080/00218839.2018.1517987

To link to this article: https://doi.org/10.1080/00218839.2018.1517987

Published online: 10 Oct 2018.

Submit your article to this journal

Article views: 10

View Crossmark data

Full Terms & Conditions of access and use can be found at
http://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=tjar20

Journal of Apicultural Research, 2018
https://doi.org/10.1080/00218839.2018.1517987

Check for updates

ORIGINAL RESEARCH ARTICLE

Spread and strain determination of *Varroa destructor* following its introduction to Mauritius and interactions with the bee louse *Braula pretoriensis* in honey bee colonies

Olivier Esnault[a,b,c]*, Deodass Meenowa[d], Preaduth Sookar[e], Marie-Pierre Chauzat[f] and Hélène Delatte[b]**

[a]*GDS Réunion, La Plaine des Cafres;* [b]*CIRAD, UMR PVBMT, Pôle de Protection des Plantes, 7Saint-Pierre, Réunion, France;* [c]*Université de la Réunion, UMR PVBMT, Saint-Denis, Saint-Denis, Italy;* [d]*Ministry of Agro-Industry & Fisheries, P.V.O, Division of Veterinary Services, Réduit, Mauritius;* [e]*Ministry of Agro Industry & Fisheries, Entomology Division, Agricultural Services, Reduit, Mauritius;* [f]*ANSES, Unit of coordination and support to surveillance, ANSES, Scientific Affairs Department for Laboratories, Maisons-Alfort, France. Unit of Honeybee Pathology, ANSES, European Union and National Reference Laboratory for honeybee health, Sophia Antipolis, France*

(Received 17 October 2017; accepted 26 July 2018)

Honey bees are facing many serious threats, and *Varroa destructor* is of major worldwide concern. *V. destructor* was first observed in 2010 in the south–west Inidan Ocean island of Madagascar. *Varroa* spp. was first suspected in Mauritius in late July 2014. Two surveys were conducted in September and November 2014 in Mauritius and Rodrigues. The aims of these surveys were to confirm the presence of *Varroa* on Mauritius, determine the species and strain and to study its spread and interactions with the bee louse *Braula pretoriensis*. Honey bees were sampled from different sites. *V. destructor* and the bee louse *Braula pretoriensis* infestation rates were measured for each colony and apiary. *V. destructor* presence was confirmed and observed in the Central and Northern part of Mauritius, but was not detected in Rodrigues. *B. pretoriensis* was observed on both islands. *V. destructor* partial mitochondrial region of the CO1 showed that the Mauritius K strain found was different from the one from Madagascar. In Mauritius, *B. pretoriensis* numbers were significantly higher in colonies infested by *V. destructor*; however, bee louse infestation rates were similar in both islands in sites without the varroa mite. Although bee louse population regulation by honey bees is unknown, individual and social behaviors regulating *V. destructor* populations within colonies are not sufficient to maintain low levels of both *B. pretoriensis* and *V. destructor*. Sanitary measures were proposed, some of which are currently being applied to limit the spread of *V. destructor* across the island.

Keywords: *Braula pretoriensis*; *Varroa destructor* first record; co-infestation; Mauritius

Introduction

Worldwide honey bee populations are facing numerous threats and colony mortality. Many factors are involved in honey bee mortalities including pesticides alone or acting in combination with pathogens and ectoparasites. *V. destructor* (Arachnida: Acari:Varroidae) is the main sanitary threat facing honey bees (Boecking & Genersch, 2008). *V. destructor* infestation causes high honey bee mortality in colonies. *V. destructor* is native to South–East Asia and was originally a parasite of *Apis cerana*. It switched host at the beginning of the twentieth century and spread all over the world through honey bee trade (Roberts, Anderson, & Tay, 2015). *V. destructor* is found on all continents where honey bees occur, except Australia. Although absent from other islands of the South West Indian Ocean (Mayotte, Comoros, Seychelles, Reunion), the mite is a major threat for bee keepers and was observed in Madagascar in 2010, where it had a severe sanitary impact on colonies (Rasolofoarivao et al., 2013).

Known as "bee lice," *Braula* spp. (Insecta: Diptera: Braulidae) is mainly found in Europe (*B. coeca*) and is a minor pest affecting *A. mellifera* colonies. Bee lice are kleptoparasites (Grimaldi & Underwood, 1986) which induce regurgitation from the honey bee by stroking the upper edge of the labium until the honey bee extends its tongue. The female of this apteran Diptera lays eggs in different parts of the hive. After 2 to 7.4 days, *B. coeca* larvae construct a tunnel under the cell capping (Dobson, 1998). Although the biology of *B. coeca* is well understood, the tropical bee lice remain has not yet been studied in detail. This is particularly true for *B. pretoriensis*, a tropical lice and relative of *B. coeca* described in South Africa, Tanzania and ex-Congo (Örösi-Pál, 1938). *B. pretoriensis* is only present on Mauritius and Rodrigues (Rehm, 1988); the other islands in the South West Indian Ocean are thus far free from *B. pretoriensis* (personal communication). It is not known how it was introduced to these two islands; it is probably from a previous introduction of honey bees from infested areas in Africa.

On these islands, apiculture is socially important and a major commercial activity, especially for Madagascar and the Mascarene islands. Except for honey bees from

*Corresponding authors. *Email: olivier.esnault@gds974.re; **Email: helene.delatte@cirad.fr

© 2018 International Bee Research Association

Madagascar, where *V. destructor* was reported in 2010 (Rasolofoarivao et al., 2013), no severe sanitary problems in honey bee colonies have been previously recorded in the area (personal communication). For this reason, no particular sanitary practices are used by bee keepers. Local bee keeping is extensive bee keeping focused on honey harvesting.

Different honey bee subspecies are found in Rodrigues and Mauritius: There is a European lineage in Rodrigues (*Apis mellifera ligustica* and *A. m. carnica*) and a mix of African and European lineages in Mauritius (*A. m. unicolor*, *A. m. ligustica* and *A. m. carnica*) (Techer et al., 2017).

The first case of *V. destructor* infestation was reported in Mauritius in 2014, consequently a sanitary survey was performed in Mauritius and Rodrigues. The aims of this study were to determine the *Varroa* species and strain, its distribution on the island and the possible interactions with the local ectoparasite *B. pretoriensis*.

Materials and methods

Sites

The South West Indian Ocean area consists of several tropical oceanic archipelagos in the Malagasy periphery, with the Comoros archipelago (3 islands) and Mayotte at the entrance of the Mozambique Channel, the Seychelles archipelago (115 islands), and the Mascarene archipelago consisting of Réunion, Mauritius and Rodrigues. The sample sites were located in Mauritius (2040 km^2), located 900 km to the east of Madagascar and the small (108 km^2) coral island of Rodrigues (which belongs to the Republic of Mauritius) located 560 km to the north east of Mauritius.

Sanitary survey

In Mauritius in September 2014, 60 honey bee colonies from 18 apiaries and 13 bee keepers were sampled from different parts of the island (Figure 1). The colonies were sampled according to the time available in each apiary and the capacity to sample honey bees (nest architecture within the hives was sometimes too complex to allow brood examination and bee sampling).

In Rodrigues, 49 colonies from 16 apiaries and 14 bee keepers were sampled in November 2014; these were distributed all over the main island and on the islet of Ile aux Crabes (Figure 1). In each apiary, colonies were randomly sampled whenever possible.

In each island, each apiary was georeferenced and the number of hives per apiary recorded. The strength of the colony was evaluated in the field by counting the number of brood combs (i.e., containing eggs, open and capped brood), the number of frames with stocks and the presence of a super. The frame with stocks was defined by the absence of brood and the presence of nectar, capped honey or bee bread or any combination of those three items. Any clinical signs of varroosis such as acute mortality, cannibalism, damaged brood, deformed wings on honey bees (Rosenkranz, Aumeier, & Ziegelmann, 2010), the presence of potential scavengers (the greater wax moth *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) and the small hive beetle *Aethina tumida* (Coleoptera: Nitidulidae), *B. pretoriensis* and *V. destructor* were recorded. For *V. destructor* detection, at least 300 inner bees were collected in each colony. Mite counting was adapted from OIE methods using ethanol. All honey bees and ectoparasites sampled were subsequently stored in 90% ethanol at –20 °C.

Statistical analysis

Average comparisons among colonies were performed by a Mann–Whitney–Wilcoxon test on R software.

Varroa destructor strain determination

Varroa destructor strain determination was performed by partial sequencing of the cytochrome oxidase I (COI) gene. Primers COXF (GGRGGWGAYATTYAWTATCAAC) and COXR (GGWGACCTGTWAATAGCAAATAC) developed by Anderson and Fuchs (Anderson & Fuchs, 1998) were used to amplify the extracted DNA. The final mix of 15 µl contained 7.5 µl of type-it 2X buffer (Qiagen), 3 µl per primer (at 20 pmol/µl) and 1.5 µl of extracted DNA. PCR cycling conditions were the following: initial denaturation for 5 min at 94 °C followed by 35 cycles of denaturation at 94 °C for 1 min, annealing at 40 °C for 80s and a final elongation step at 72 °C for 2 min and 10 min extension at 72 °C. Amplified fragments were sent to Macrogen© for sequencing. Sequences were read and aligned using MEGA package v4. Phylogenetic reconstruction was based on the neighbor-joining methods as implemented in FastTree. Worldwide sequences of different mitochondrial haplotypes of *V. destructor* were inserted in the phylogeny from Genbank.

Results

Mauritius sanitary survey

In Mauritius, all sampled hives were wooden Langstroth 12 frames. The size of sampled apiaries ranged from 2 to 40 colonies. During the survey in the north-western and central part of the island, *Litchi sinensis* and *Haematoxylum campechianum* were blooming leading to high nectar flow. There was no honey harvest in 8 colonies out of the 60 surveyed (no super present on the colonies; Table 1) due to the lack of nectar flow in the areas.

In the central and north-western part of Mauritius, an average of 5.5 brood frames [1–8] was measured in the colonies and 5.8 frames of reserves [1–17] (Table 1). All of the sampled colonies were located within the *V. destructor*-infested area. In the eastern and southern part of the island, there was no blooming of

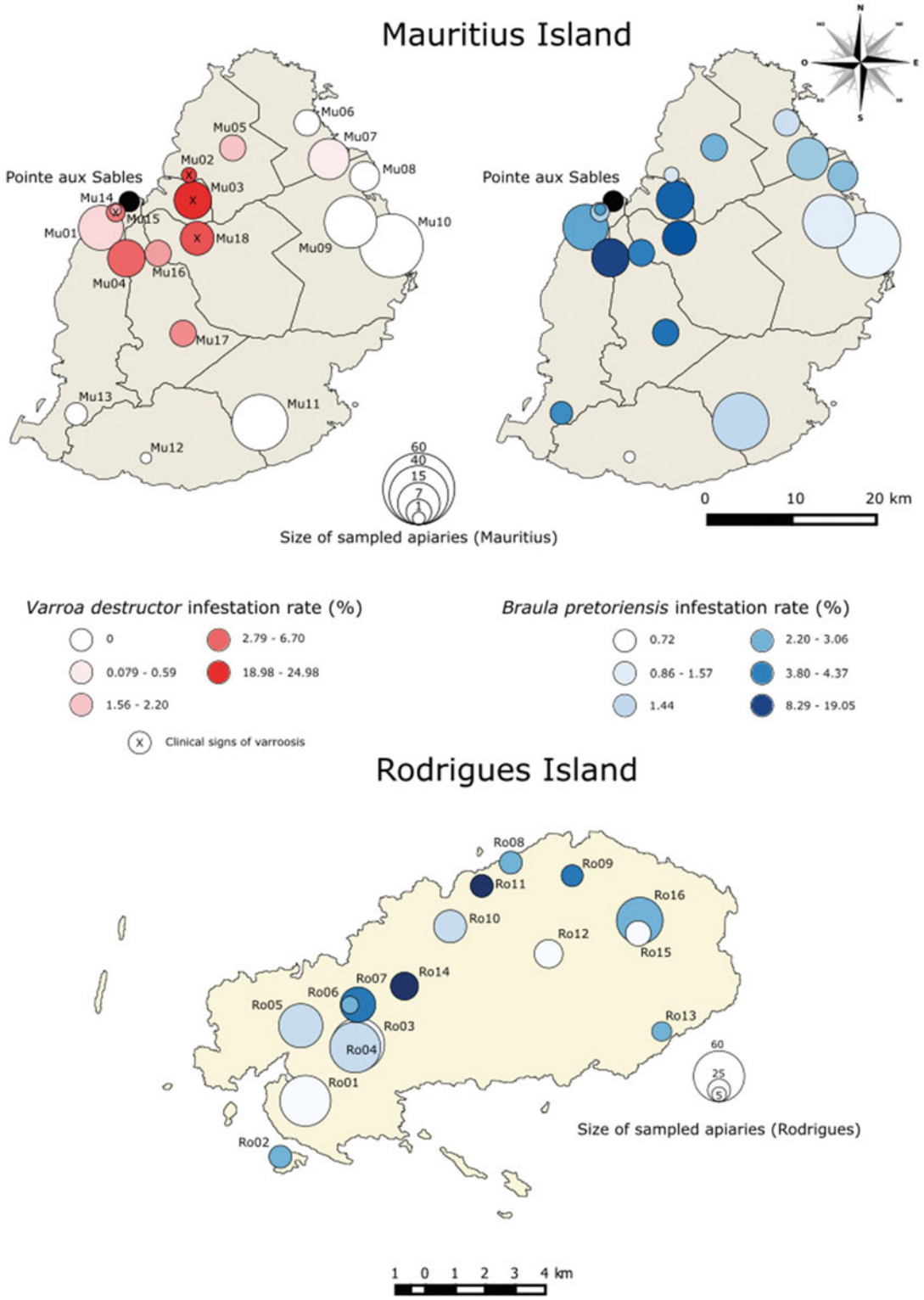


Figure 1. *V. destructor* and *B. pretoriensis* infestation rate in the sampled apiaries in Mauritius Island in 2014 and in Rodrigues in 2015. The first report of *V. destructor* was in Pointe aux Sables (black point in Mauritius Island). The X shows the location of varroosis clinical signs observed in the colonies (left map).

any trees during the survey. Consequently the colonies were weaker with an average of 4.4 brood frames per hive [2–7] and 1.3 frames of reserves [0–5]. In the south-western part of the island (from Black River National Park to Albion), no colonies were found. On the Black River National Park bee keeping site, all hives ($n = 5$) had undergone absconding.

Bee keepers did not practice any migratory bee keeping to follow the different blooming seasons. All bee keepers in the survey collected wild

Table 1. Descriptive data of the sampled colonies in Mauritius and Rodrigues Island.

Date of sampling (2014)	Site name	ID apiary	Nbr hives	Frames nbr	Brood frames nbr	Reserve frames nbr	Supers nbr	Reserve frames nbr (super)	Queen management	Sanitary troubles (2014)	Kind of troubles	Honey harvesting	Supply age (y)	Bee nbr sampled	*V. destructor* nbr	*B. pretoriensis* nbr	*V. destructor* direct observation
1-Sept.	Bellevue	Mu1	16	11	6	5	1	12	Queen breeding	No	No	Yes	4	673	3	10	No
				12	8	4	1	12		No	No	Yes	4	820	1	3	No
				12	8	4	0			No	No	Yes	4	516	3	2	No
				12	6	5	1	12		No	No	Yes	4	676	3	4	No
				12	6	6	0			No	No	Yes	4	620	6	12	No
1-Sept.	Terre Rouge	Mu2	2	12	4	6	0		Queen breeding	Yes	*V. destructor*	Yes	1	718	175	0	Yes
1-Sept.	Vallée de Prêtre	Mu3	13	12	6	5	1	0	Natural renewal	Yes	*V. destructor*	Yes	NA	751	141	67	Yes
				12	7	4	0			Yes	*V. destructor*	Yes	NA	1261	149	15	Yes
				8	3	5	0			Yes	*V. destructor*	Yes	NA	452	335	43	Yes
				9	2	7	0			Yes	*V. destructor*	Yes	NA	759	155	8	Yes
1-Sept.	Roches Brunes	Mu4	13	11	4	7	2	10+0	Natural renewal	Yes	population diminution	Yes	5	628	28	9	Yes
				12	6	6	2	0+0		Yes	population diminution	Yes	5	568	231	109	Yes
2-Sept.	Pamplemousse	Mu5	8	12	8	4	1	10	Queen breeding	No	No	Yes	2	709	25	0	Yes
				8	3	0	0			No	No	Yes	2	1122	7	3	No
				10	6	4	0			No	No	Yes	2	676	9	18	No
2-Sept.	Poudre d'Or	Mu6	8	12	6	6	1	0	Queen breeding	No	No	No	1	600	0	0	No
				12	6	1	0			No	No	No	1	535	0	2	No
2-Sept.	Rivière du Rempart	Mu7	15	12	7	0	1	0	Natural renewal	No*	No	No	4	976	0	10	No
				12	4	0	0			No	No	No	4	706	0	5	No
				7	3	0	0			No	No	No	4	623	0	0	No
2-Sept.	Bras d'Eau	Mu8	9	12	2	2	0		Queen breeding	No	No	No	2	524	0	6	No
				12	3	1	0			No	No	No	2	739	0	1	No
				12	2	0	0			No	No	No	2	309	0	4	No
2-Sept.	Flacq	Mu9	25	12	7	3	2	11+0	Queen breeding	No	No	Yes	25	464	0	1	No
				12	4	3	0			No	No	Yes	25	993	0	1	No
				12	6	4	2	4+0		No	No	Yes	25	444	0	1	No
				12	5	2	2	1+0		No	No	Yes	25	596	0	0	No
2-Sept.	Trou d'eau douce	Mu10	40	12	4	8	0		Natural renewal	No	No	Yes	2	527	0	0	No
				12	4	8	1	0		No	No	Yes	2	532	0	5	No
				5	3	2	0			No	No	Yes	2	728	0	0	No
				11	5	0	0			No	No	Yes	2	671	0	3	No
3-Sept.	Gros Bois	Mu11	38	12	5	5	0		Buying	No	No	Yes	2	738	0	6	No
				12	5	7	1	0		No	No	Yes	2	656	0	3	No
				12	4	8	0			No	No	Yes	2	817	0	2	No
				12	3	2	0			No	No	Yes	2	464	0	0	No
				12	6	2	0			No	No	Yes	2	741	0	0	No
3-Sept.	Chamouny	Mu12	1	12	6	4	1	0	Buying	No	No	Yes	3	557	0	0	No
3-Sept.	Chamarel	Mu13	4	12	4	7	0		Natural renewal	No	No	Yes	3	1003	0	3	No
				12	4	0	0			No	No	Yes	3	250	0	0	No
				12	4	7	0			No	No	Yes	3	513	0	9	No
				12	7	5	0			No	No	Yes	3	932	0	17	No
3-Sept.		Mu14°	1	NA	NA	NA	NA			NA	NA	NA	NA	106	2	3	No
	Pointe aux Sables	Mu15	3	12	7	5	1	0	Natural renewal	No	No	Yes	3	317	28	1	Yes
				12	5	7	1	0		No	No	Yes	3	395	17	0	Yes
4-Sept.	Réduit	Mu16	8	12	6	0	0		Queen breeding	No	No	Yes	2	644	14	9	No
				12	4	0	0			No	No	Yes	2	1037	15	18	No

(*Continued*)

Table 1. (Continued).

Date of sampling (2014)	Site name	ID apiary	Nbr hives	Frames nbr	Brood frames nbr	Reserve frames nbr	Supers nbr	Reserve frames nbr (super)	Queen management	Sanitary troubles (2014)	Kind of troubles	Honey harvesting	Supply age (y)	Bee nbr sampled	*V. destructor* nbr	*B. pretoriensis* nbr	*V. destructor* direct observation
				12	6	6	0			No	No	Yes	2	549	10	2	No
				12	4	0	0			No	No	Yes	2	1016	39	10	Yes
				12	6	0	1	0		No	No	Yes	2	529	13	4	No
				12	8	0	1	0		No	No	Yes	2	839	18	3	No
4-Sept.	Curepipe	Mu17	8	12	6	2	0		Natural renewal	No	No	NA	NA	728	4	5	No
				4	2	0	0			No	No	NA	NA	600	0	3	No
				6	1	5	0			No	No	NA	NA	691	9	2	No
				7	6	0	0			No	No	NA	NA	1020	39	10	No
				4	2	1	0			No	No	NA	NA	464	0	1	No
				10	6	0	0			No	No	NA	NA	1119	1	18	No
				4	3	0	0			No	No	NA	NA	872	6	4	No
4-Sept.	Saint Pierre	Mu18	12	10	5	0	0		Natural renewal	No	No	Yes	3	591	99	36	Yes
				12	8	4	0			No	No	Yes	3	771	131	9	Yes
				12	3	0	0			No	No	Yes	3	690	282	44	Yes
				12	8	4	0			No	No	Yes	3	1118	49	65	Yes
17-Nov.	Anse Quitor	Ro1	60	12	4	8	1	0	Old queen killing	No	No	0	7	240	0	0	No
				12	10	2	1	0		No	No	0	7	250	0	0	No
				12	8	0	1	0		No	No	0	7	195	0	0	No
				12	9	3	1	0		No	No	0	7	423	0	0	No
				12	11	1	0			No	No	0	7	412	0	1	No
18-Nov.	Île aux crabes	Ro2	12	12	3	0	0		Queen breeding	No	No	0	5	354	0	5	No
				12	5	3	0			No	No	0	5	418	0	0	No
				12	4	4	0			No	No	0	5	419	0	6	No
18-Nov.	Grand La Fouche Corail	Ro3	65	12	8	2	1	4	Natural renewal	No	No	0	13	382	0	3	No
				12	9	2	1	1		No	No	0	13	237	0	1	No
				12	9	2	0			No	No	0	13	316	0	1	No
				12	5	2	0			No	No	0	13	420	0	2	No
				12	5	2	0			No	No	0	13	403	0	1	No
18-Nov.	Grand La Fouche Corail	Ro4	60	12	11	0	1	8	Natural renewal	No	No	0	6	552	0	1	No
				12	9	4	1	0		No	No	0	6	206	0	4	No
				12	11	0	1	4		No	No	0	6	387	0	3	No
				12	5	4	0			No	No	0	6	NA	NA	NA	No
18-Nov.	Baie Topaze	Ro5	45	12	4	6	0		Natural renewal	No	No	1	nsp	345	0	0	No
				12	10	0	1	0		No	No	1	nsp	513	0	3	No
				12	7	3	1	10		No	No	1	nsp	261	0	0	No
				12	9	1	1	10		No	No	1	nsp	379	0	4	No
18-Nov.	La Ferme	Ro6	7+9	12	7	3	1	0	Natural renewal	No	No	0	5	429	0	6	No
				12	5	1	0			No	No	0	5	383	0	2	No
18-Nov.	La Ferme	Ro7	29	12	8	2	1	6	Natural renewal	No	No	0	2	584	0	9	No
				12	8	2	1	8		No	No	0	2	369	0	6	No
				12	2	4	0			No	No	0	2	359	0	3	No
19-Nov.	Pointe Vénus	Ro8	12	12	3	0	0		Natural renewal	No	No	0	2	273	0	3	No
				12	3	0	0			No	No	0	2	298	0	2	No
19-Nov.	Grand Baie	Ro9	11	12	6	0	0		Natural renewal	No	No	0	5	376	0	5	No
				12	6	0	0			No	No	0	5	310	0	2	No
				12	6	2	0			No	No	0	5	389	0	9	No
19-Nov.	Baie aux huitres	Ro10	25	12	5	7	1	0	Queen breeding	No	No	0	7	323	0	2	No
				12	7	1	1	4		No	No	0	7	390	0	4	No

(*Continued*)

Table 1. (Continued).

Date of sampling (2014)	Site name	ID apiary	Nbr hives	Frames nbr	Brood frames nbr	Reserve frames nbr	Supers nbr	Reserve frames nbr (super)	Queen management	Sanitary troubles (2014)	Kind of troubles	Honey harvesting	Supply age (y)	Bee nbr sampled	*V. destructor* nbr	*B. pretoriensis* nbr	*V. destructor* direct observation
				12	6	2	1	7		No	No	0	7	316	0	0	No
19-Nov.	Port Mathurin	Ro11	12	12	6	4	1	7	Natural renewal	No	No	0	30	202	0	0	No
				12	9	1	2	0 + 0		No	No	0	30	438	0	4	No
				12	4	4	0			No	No	0	30	326	0	16	No
19-Nov.	Mont Lubin	Ro12	19	12	6	2	0		Natural renewal	No	No	0	5	317	0	1	No
				12	7	0				No	No	0	5	118	0	1	No
19-Nov.	Graviers	Ro13	5	12	6	2	1	0	Natural renewal	No	No	0	3	195	0	6	No
				12	5	4	1	6		No	No	0	3	390	0	0	No
20-Nov.	Montagne du sable	Ro14	18	12	7	3	1	1	Natural renewal	No*	No	0	10	313	0	6	No
20-Nov.	Trèfles	Ro15	15	12	7	2	1	0	Queen breeding	No	No	0	5	268	0	0	No
				12	6	2	0			No	No	0	5	263	0	1	No
				12	5	2	0			No	No	0	5	316	0	0	No
20-Nov.	Trèfles	Ro16	50	12	9	1	1	2	Natural renewal	No	No	0	10	198	0	3	No
				12	5	2	0			No	No	0	10	234	0	2	No
				12	8	2	1	3		No	No	0	10	348	0	9	No
				12	7	0	0			No	No	0	10	322	0	0	No
				12	9	0	1	0		No	No	0	10	226	0	0	No

*Sanitary troubles recorded in 2013: wax moth for the Mauritian colony; bee mortality for the Rodrigues colony (intoxication or lack of resources suspected); ° wild colony in a tree hole.

honey bee swarms to increase the number of colonies.

On Mauritius Island, 33 colonies out of 60 contained *V. destructor*, 49 colonies contained *B. pretoriensis* and 30 colonies tested positive for both pests (Table 1). The *V. destructor* infestation rates decreased with increasing distance from the location where mites were first detected (Figure 2). The farthest infested apiary was located 28 km from the location where the first case of *V. destructor* was described. The highest infestation rates in apiaries (19.0%–25.0%) were observed in apiaries located 7.9 and 10.5 km, respectively, from the location of presumed mite introduction. The most frequent clinical signs were honey bee mortality in front of the hives, irregular brood pattern and dead larvae. The clinical signs of varroosis [adult honey bees with deformities, especially wing and abdomen deformities, crawling adult bees, scattered and reduced brood, presence of phoretic mites (Rosenkranz et al., 2010)) were only observed above 4.46% of mite infestation rate per colony. Deformed wings were observed in only four colonies. Within the infested apiaries, empty hives were observed but we were unable to determine if the cause was death of the colony or desertion, despite discussions with bee keepers. No *Aethina tumida* were observed in the colonies at any time.

Every apiary contained *B. pretoriensis*. The colony prevalence was 81.7% $IC_{95\%}$ [71.9%–91.5%].

In the 33 infested colonies, significantly more *B. pretoriensis* were measured ($p < 0.05$) than in non-infested colonies (Figure 3). At the apiary level (7 apiaries free of *V. destructor* and 10 infested apiaries), the same results were observed ($p < 0.05$). Two different sequences were obtained from varroa mites collected in Mauritius (GenBank accession numbers: KU696312-13). DNA sequences of *V. destructor* CO I blasted in GenBank showed with 100% query cover similarities with *V. destructor* sequences known from Saudi Arabia (KJ507741), China (Xishuan: GQ379060, Hunan: GQ379059), India (Rajasthan: HM242413, Gurdaspur: HM242399) and Korea (GQ379056). The analysis of the two sequences from Mauritius showed two synonymous mutations and one non-synonymous mutation with the sequence from Madagascar (Rasolofoarivao et al., 2013).

In August 2014, the OIE was notified of the outbreak of varroosis (http://www.oie.int/).

Rodrigues sanitary survey

In Rodrigues, all the sampled hives were 12 frames Dadant-like. Apiaries sampled ranged from 12 to 60 colonies. An average of 6.5 brood frames [1–11 frames] was measured in the brood chamber (Table 1).

In Rodrigues, no *V. destructor* was recorded during the survey in any of the colonies. *B. pretoriensis* was found in every apiary. The colony prevalence was 71.4% $IC_{95\%}$[58.8%–84.1%] and the species was found to be distributed all over the island (Figure 1). The *B.*

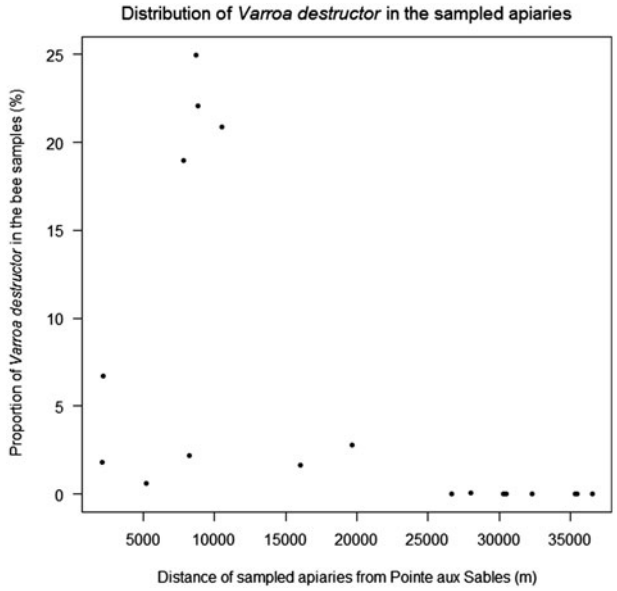


Figure 2. Phoretic *V. destructor* density per honey bee (%) depending on the distance (m) from the first detection site in Pointe aux Sables.

pretoriensis infestation rate at apiary level was the similar in Rodrigues and Mauritius in apiaries free of *V. destructor* (Figure 3). No specific clinical sign (irregular brood, acute mortalities, etc.) were observed in colonies free of mites (Table 1).

As on Mauritius, no *A. tumida* was observed in Rodrigues; however the greater wax moth *G. mellonella* was observed in all surveyed apiaries.

Discussion

V. destructor infestation rates observed in colonies in Mauritius ranged from low infestation (0.1%) to relatively high (25.0%) (Table 1). This was similar to observations made in South Africa in 1998 and 1999, soon after *V. destructor* was first described (Allsopp, 2007).

Varroosis symptoms (irregular brood pattern, deformed wings, weak colony) were also similar to the ones described after the introduction of *V. destructor* to South Africa (Allsopp, 2007) or to Madagascar (Rasolofoarivao et al., 2013), which was the first country to be contaminated by *V. destructor* in the South West Indian Ocean. Honey bee mortalities were recorded in infested apiaries, showing the acute deleterious effects of the mite on naïve honey bee populations. In spite of this, a higher number of brood combs was recorded in infested colonies. Colonies harvesting honey are strong; this may have masked varroosis symptoms and mortalities. Some authors reported that *V. destructor* infestation had no clinical impacts on honey bee populations during the three first years after introduction (Ritter, 1981). Symptoms only began to be recorded during the fourth year in a European ecosystem with a winter diapause (Ritter, 1981). However, these observations were performed more than 40 years ago and strains might not be identical. Due to the tropical context with a year-round brood presence in colonies, it has been suggested that *V. destructor* might have been introduced to Mauritius not long before the first reported observations of the mite in the colonies. In Madagascar, colony mortality as high as 60% was observed two years after the first detection in surveyed apiaries (Rasolofoarivao et al., 2013).

The mite was found within a 28 km radius of the first recorded detection in Mauritius (Figures 1 and 3). In New Zealand, the local spread of *V. destructor* was estimated at 12 km/year (Stevenson, Benard, Bolger, & Morris, 2005). Due to the climate difference between the two countries (tropical vs. temperate climate), it is to be feared that the spread of the mite will spread more quickly over the island. The tropical context with the year-round brood presence within the colonies is a major risk factor for parasite dissemination. Other risk factors such as trade of early infested colonies will worsen the sanitary situation.

B. pretoriensis rates in *V. destructor*-free apiaries (average of 1.69%) were similar to what was observed in South Africa with *B. coeca* (Strauss, Pirk, Dietemann, Crewe, & Human, 2014) but was lower to that observed in Ethiopia (3%–6%) (Gidey, Mulugeta, & Fromsa, 2012). Conversely, the average of *B. pretoriensis* infestation rates within mite-infested apiaries was higher than rates observed in both African countries (0.25% ± 0.25% – 0.43% ± 0.60% in Benin; 1.2% ± 1.5% in South Africa).

This co-occurrence of *V. destructor* and high rates of *B. pretoriensis* has never been observed before. Two hypotheses could explain the significantly higher infestation of *B. pretoriensis* in *V. destructor-infested* colonies.

The first hypothesis is the high mite parasitical pressure within the colonies. Allo- and auto-grooming, such as hygienic behaviors are efficient strategies used by honey bees to control ectoparasites, especially *V. destructor* (Spivak & Gilliam, 1998). Mechanisms of *Braula* spp. population regulation by honey bees are unknown but similar behaviors could have been involved in controlling bee louse population within the colonies. The high mite prevalence within colonies could knock down these colony strategies.

The second hypothesis is that colony weakness is due to direct and indirect *V. destructor* sanitary effects and that this weakness induces a synergistic effect between mite and bee louse population, giving rise to an increase in population of the 'lagging' species. Indeed, *V. destructor* is a vector of several honey bee viruses including deformed wing virus (DWV) or acute honey bee paralysis virus (ABPV), viruses known to damage individual immune systems and the social immune system of the colony (de Miranda, Cordoni, & Budge, 2010; de Miranda & Genersch, 2010; Wegener et al., 2016). These two hypotheses are not mutually exclusive, both may act at the same time.

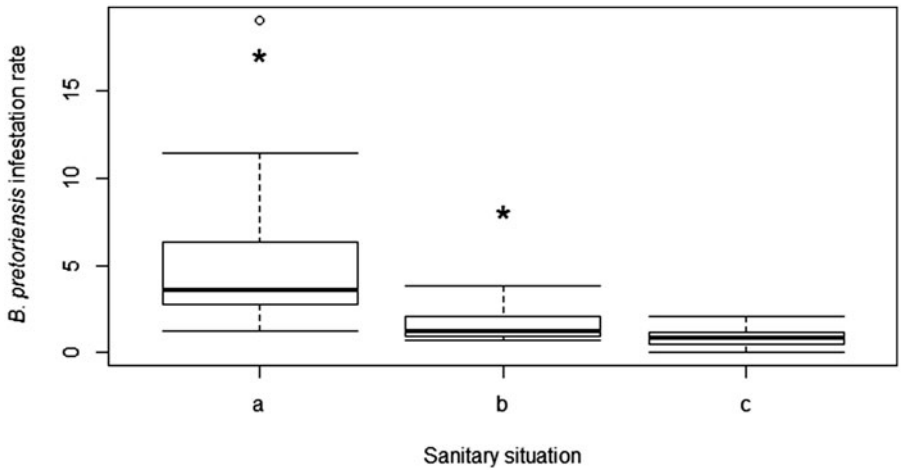


Figure 3. The infestation rate of *B. pretoriensis* according to the different sanitary situations: Mauritius-1, apiaries with *V. destructor*; Mauritius-2, apiaries without any *V. destructor* and Rodrigues apiaries (without any *V. destructor*). Significant differences are shown by use of Mann-Whitney-Wilcoxon test between (a)-(b)* (p-value = 0.01).

Despite these hypotheses, a mid- and long-term survey of Mauritian colonies should take place to follow the evolution and risk factors of this co-occurrence, including a complete analyses on the viruses affecting the colonies.

Sequence analysis showed that mites were from *V. destructor* individuals from the K strain with 100% nucleotide identity, with *V. destructor* mites from infested countries in Asia. To date, only two almost clonal types of *V. destructor* from Korea and Japan have been detected in colonies worldwide (Beaurepaire, Krieger, & Moritz, 2017; Roberts et al., 2015). Sequence analyses also showed that *V. destructor* populations from Madagascar and Mauritius were very different, implying two different sources of introduction. This is somewhat surprising given their geographical proximity. There is still a high risk of introduction of the mite to the other islands in the area. The relative short distance between Mauritius and Rodrigues and the level of trade between the two islands are important risk factors for the mite introduction to Rodrigues and for bee keeping there. Commercial trade between bee keepers worldwide involving material, queens or packaged honey bees represents major threats for honey bee health (Mutinelli, 2011).

The Mauritian government used to import European subspecies of *A. mellifera* from Australia, which is *V. destructor*-free, but with a specific procedure: imported queens, upon arrival, were introduced into locally produced swarms by the Entomology Services in specific apiaries. Colonies were then multiplied and sold on to Mauritian bee keepers.

It is almost impossible to limit the spread of *V. destructor* when introduced to naïve areas; however, an attempt was made to control this epizootic outbreak in Mauritius. Sanitary measures were established including the destruction of all colonies in every *V. destructor*-positive apiaries, and the destruction of any wild/feral colonies in the infested area. It was recommendations that every apiary on the island receive a visit by the Entomology and Veterinary Services to diagnose their sanitary status. To prevent the spread of *V. destructor*, a buffer zone was created by applying Amitraz treatments to all colonies in the area, including healthy apiaries. This eradication program appeared feasible due to the island context. Mauritius has already successfully attempted eradication programs for animal or vegetal pathogens such as the African Swine Fever Virus in 2007 or the eradication of the exotic fruit fly *Bactrocera dorsalis* in 1997.

This plan failed to contain the mite population, mainly due to the presence of wild colonies in difficult terrain in certain parts of the island. *V. destructor* eradication will not be possible and the honey bees and bee keepers will have to integrate this sanitary hazard into their bee keeping practices. This long-term fight will require cooperative management and a strategic action plan for honey bee health. Due to the failure to control varroa mites at the island level, we can speculate that the preadaptation to *B. pretoriensis* will help Mauritian honey bees to resist varroa mites in the future.

In Rodrigues, due to the high level of trade with Mauritius, sanitary measures must be enforced at the maritime port to detect accidental introduction of feral infested swarms from Mauritius. An active surveillance program should be implemented on the island to enable bee keepers to easily and early detect varroa mites via infested queens or swarms.

The recent introduction of varroa mites to Mauritius shows how difficult it is for countries to control legal or illegal importations given the global economic context. Mauritius, and other islands in the region are particularly vulnerable to pest introduction, especially *V. destructor* and *A. tumida*.

Acknowledgements

Thanks to Michel Martinez for *B. pretoriensis* identification. Special thanks for the technical support in the field (G.

Jhumun & M. Jamalkhan in Mauritius; Jérôme Félicité in Rodrigues). Many thanks to B. Xavier and J. Hascoat (GDS Réunion) for technical help in the laboratory. The authors thank the Plant Protection Platform (3P, IBISA) where molecular analyses were conducted. The authors greatly thank the reviewers for their comments which greatly improved the manuscript and a special thank for Andrew Hobson for proofreading the manuscript.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

Funding

European Union: European Regional Development Fund (ERDF); European Agricultural Agricultural for Rural Development (EAFRD), by the Conseil Régional de la Réunion and Conseil Départemental de la Réunion, by CIRAD, GDS Réunion.

References

Allsopp, M. H. (2007). Analysis of Varroa destructor infestation of southern African honeybee populations. Pretoria, South Africa: Master of Science, University of Pretoria.

Anderson, D. L., & Fuchs, S. (1998). Two genetically distinct populations of Varroa jacobsoni with contrasting reproductive abilities on Apis mellifera. *Journal of Apicultural Research*, *37*(2), 69–78.

Beaurepaire, A. L., Krieger, K. J., & Moritz, R. F. A. (2017). Seasonal cycle of inbreeding and recombination of the parasitic mite Varroa destructor in honeybee colonies and its implications for the selection of acaricide resistance. *Infection Genetics and Evolution*, *50*, 49–54. doi:10.1016/j.meegid.2017.02.011

Boecking, O., & Genersch, E. (2008). Varroosis—The ongoing crisis in bee keeping. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, *3*(2), 221–228. doi:10.1007/s00003-008-0331-y

de Miranda, J. R., Cordoni, G., & Budge, G. (2010). The Acute bee paralysis virus-Kashmir bee virus-Israeli acute paralysis virus complex. *Journal of Invertebrate Pathology*, *103* Suppl 1, S30–S47. doi:10.1016/j.jip.2009.06.014

de Miranda, J. R., & Genersch, E. (2010). Deformed wing virus. *Journal of Invertebrate Pathology*, *103* Suppl 1, S48–S61. doi:10.1016/j.jip.2009.06.012

Dobson, J. (1998). A'bee-louse'Braula schmitzi Orosi-pal (Diptera: Braulidae) new to the British Isles, and the status of *Braula* spp. in England and Wales. *British Journal of Entomology and Natural History (United Kingdom)*, *11*, 139–148.

Gidey, A., Mulugeta, S., & Fromsa, A. (2012). Prevalence of bee lice Braula coeca (Diptera: Braulidae) and other perceived constraints to honey bee production in Wukro Woreda, Tigray Region Ethiopia. *Global Veterinaria*, *8*(6), 631–635.

Grimaldi, D., & Underwood, B. A. (1986). Megabraula, a new genus for two new species of Braulidae (Diptera), and a discussion of braulid evolution. *Systematic Entomology*, *11*(4), 427–438.

Mutinelli, F. (2011). The spread of pathogens through trade in honey bees and their products (including queen bees and semen): Overview and recent developments. *Revue Scientifique et Technique*, *30*(1), 257–271.

Örösi-Pál, Z. (1938). Studien über die Bienenlaus (Braula coeca Nitzsch, Diptera). *Z Parasitenkd*, *10*(2), 221–238. doi:10.1007/BF02124949

Rasolofoarivao, H., Clemencet, J., Ravaomanarivo, L. H., Razafindrazaka, D., Reynaud, B., & Delatte, H. (2013). Spread and strain determination of Varroa destructor (Acari: Varroidae) in Madagascar since its first report in 2010. *Experimental and Applied Acarology*, *60*(4), 521–530. doi:10.1007/s10493-013-9658-x

Rehm, S. M. (1988). *Report of the consultancy on bee diseases (Mauritius and Rodrigues)*. New York City, NY: United Nations Development Programme. 77 pp.

Ritter, W. (1981). Varroa Disease of the Honeybee Apis Mellifera. *Bee World*, *62*(4), 141–153. doi:10.1080/0005772X.1981.11097838

Roberts, J. M., Anderson, D. L., & Tay, W. T. (2015). Multiple host shifts by the emerging honeybee parasite, Varroa jacobsoni. *Molecular Ecology*, *24*(10), 2379–2391. doi:10.1111/mec.13185

Rosenkranz, P., Aumeier, P., & Ziegelmann, B. (2010). Biology and control of Varroa destructor. *Journal of Invertebrate Pathology*, *103* Suppl 1, S96–S119. doi:10.1016/j.jip.2009.07.016

Spivak, M., & Gilliam, M. (1998). Hygienic behaviour of honey bees and its application for control of brood diseases and varroa. *Bee World*, *79*(3), 124–134.

Stevenson, M. A., Benard, H., Bolger, P., & Morris, R. S. (2005). Spatial epidemiology of the Asian honey bee mite (Varroa destructor) in the North Island of New Zealand. *Preventive Veterinary Medicine*, *71*(3–4), 241–252. doi:10.1016/j.prevetmed.2005.07.007

Strauss, U., Pirk, C. W., Dietemann, V., Crewe, R. M., & Human, H. (2014). Infestation rates of Varroa destructor and Braula coeca in the savannah honey bee (Apis mellifera scutellata). *Journal of Apicultural Research*, *53*(4), 475–477.

Techer, M. A., Clémencet, J., Simiand, C., Preeaduth, S., Azali, H. A., Reynaud, B., & Hélène, D. (2017). Large-scale mitochondrial DNA analysis of native honey bee Apis mellifera populations reveals a new African subgroup private to the South West Indian Ocean islands. *BMC Genetics*, *18*(1), 53. doi:10.1186/s12863-017-0520-8

Wegener, J., Ruhnke, H., Scheller, K., Mispagel, S., Knollmann, U., Kamp, G., & Bienefeld, K. (2016). Pathogenesis of varroosis at the level of the honey bee (Apis mellifera) colony. *Journal of Insect Physiology*, *91–92*, 1–9. doi:10.1016/j.jinsphys.2016.06.004

Discussion générale

Ce travail de thèse est le premier réalisé dans la région SOOI et qui s'intéresse à la diversité des agents pathogènes affectant l'abeille domestique, et induisant des mortalités. Nous avons ainsi décrit diverses situations épidémiologiques, selon les îles de la zone. Ces îles, ont pu être de véritables laboratoires d'étude, permettant de mettre en avant le facteur de risque majeur qu'est *V destructor* pour l'abeille.

1. Enquêtes épidémiologiques descriptives

La liste des agents pathogènes composant la pathosphère de l'abeille mellifère s'affine de plus en plus grâce aux nombreuses recherches menées sur le sujet. Youtefois pour les travaux réalisés au cours de cette thèse, le choix d'agents pathogènes recherchés et étudiés s'est porté sur les principaux. Pour cela nous nous sommes intéressés aux six virus les plus étudiés, à savoir le CBPV, le SBV, le BQCV, le DWV et deux virus du complexe AKI : ABPV et KBV, aux deux bactéries principales affectant le couvain de l'abeille (*M. plutonius* et *P. larvae*), aux deux principales espèces de microsporidies (*N. apis* et *N. ceranae*) et aux arthropodes parasitant l'abeille (*V. destructor* et *B. pretoriensis*). Enfin, et seulement pour la Réunion, les acariens du genre *Acarapis sp.* ont été recherchés.

1.1. Echantillonnage et précision relative des résultats

Une des principales difficultés rencontrées lors de ces travaux était pour chacune des îles étudiées, d'obtenir des données exhaustives (voire même parcellaires parfois) relatives au nombre d'apiculteurs et de colonies existants pour un territoire donné. De la même façon peu de données sanitaires étaient disponibles au moment de construire les échantillonnages. L'intérêt de ces données sanitaires *a priori* est de pouvoir construire un échantillonnage le plus précis et représentatif de la population étudiée afin de permettre de fournir des données fiables avec une précision relative la plus faible possible (Toma *et al.*, 2001).

L'échantillonnage le plus conséquent a été fourni pour l'île de La Réunion avec 111 colonies échantillonnées et le plus petit échantillonnage a été réalisé à Madagascar et aux Seychelles avec 43 colonies échantillonnées. D'un point de vue épidémiologique et statistique, quand moins de 10% de la population étudiée est échantillonnée, celle-ci peut être considérée comme étant de taille « infinie ». Dans ce contexte, avec une prévalence observée d'environ 30% de BQCV à Maurice avec 60 colonies échantillonnées, la précision relative s'élève à 40% (Toma *et al.*, 2001). De manière générale, plus les

Tableau 5 : Présence et/ou prévalence observée des agents pathogènes étudiés. La précision relative est inscrite entre parenthèses sous les prévalences observées.

		Madagascar	Maurice	Rodrigues	Seychelles	La Réunion
ARTHROPODES.	*V. Destructor*	Présence	Présence	Absence	Absence	Présence
	Acarapis sp.	Non recherché	Non recherché	Non recherché	Non recherché	15,3% (44.7%)
	Aethina tumida	Présence	Présence	Absence	Absence	Absence
	Braula pretoriensis	Absence	Présence	Présence	Absence	Absence
BACTERIES	*Paenibacillus larvae*	Absence	Absence	Absence	Absence	Absence
	Melissococcus plutonius	Absence	Absence	Absence	Absence	22,5% (35.2%)
VIRUS	ABPV	Absence	Absence	Absence	Absence	Absence
	BQCV	45,2% (33.6%)	33,3% (36.5%)	4,1%	51,2% (29.8%)	89,2% (6.6%)
	CBPV	2,4%	5,6%	Absence	14,0% (75.6%)	51,4% (18.5%)
	DWV	40,0% (37.4%)	36,7% (33.9%)	4,1%	39,5% (37.7%)	Absence
	KBV	Absence	Absence	Absence	Absence	Absence
	SBV	Absence	Absence	Absence	Absence	Absence
MICROSPORIDIES.	*Nosema apis*	Absence	Absence	2,0%	Absence	0,9%
	Nosema ceranae	9,5% (94.1%)	91,7% (7.8%)	79,6% (14.5%)	86,1% (12.3%)	100,0% (0.0%)
	n=	**43**	**60**	**49**	**43**	**111**

prévalences observées sont faibles, plus la précision relative est grande et donc moins les résultats de prévalence obtenus sont précis. Par contre, afin d'être le plus exact possible, tous les échantillonnages ont été construits de manière aléatoire (avec les données disponibles fournies par nos partenaires) en stratifiant les colonies à échantillonner par zone géographique afin d'éviter d'obtenir des zones « blanches » au sein des territoires étudiés. Pour Madagascar, compte tenu de la taille importante de l'île et du temps disponible pour réaliser les prélèvements sur le terrain, la totalité de l'île n'a pas pu être couverte. Un transect allant de la côte Est (Toamasina) (via certains Parcs Nationaux de la côte Est (Ranomafana, Andasibe), les Hauts Plateaux) à la côte Ouest (Mahajanga) a été réalisé dans le cadre de cette étude.

Malgré ce manque de précision, ces enquêtes épidémiologiques ont permis de mettre en évidence un certain nombre d'agents pathogènes au sein des populations d'abeilles mellifères du SOOI et ainsi de commencer à décrire la pathosphère locale (Tableau 5).

1.2. Diversité des maladies notifiables à l'OIE dans la zone SOOI

→ **Parmi les bactéries responsables de loque, seule *M. plutonius* est présente à La Réunion**

Au vu des enquêtes réalisées, la zone étudiée semble indemne de *P. larvae*, agent causal de la loque américaine ainsi que les deux virus ciblés du complexe AKI. Pour les autres agents pathogènes étudiés, chacun a été identifié au moins une fois sur un territoire donné.

P. larvae est un agent pathogène majeur de l'abeille mellifère et est responsable d'une maladie grave du couvain (Genersch, 2008, Genersch, 2010). Le contexte d'invasion de *V. destructor* dans la région rappelle la fragilité des populations des îles du SOOI vis-à-vis de l'introduction d'agents pathogènes exotiques. Une veille épidémiologique ciblée sur cet agent pathogène pourrait être mise en place pour chaque pays et notamment pour l'île Maurice qui importe régulièrement des reines d'Australie, territoire où *P. larvae* est présent (Hornitzky, 1998).

La présence de *M. plutonius* à La Réunion est avérée depuis de nombreuses années et ne semble pas être une préoccupation majeure pour les apiculteurs puisqu'un seul signalement de maladie clinique a été réalisé auprès du réseau de Suivi Epidémiologique des maladies des Abeilles (SEA) à La Réunion en novembre 2017. La maladie est généralement initiée suite à une carence alimentaire en protéines (Forsgren, 2010). D'un point de vue épidémiologique et malgré une prévalence observée relativement importante (portage à hauteur de 22.5% des colonies), la maladie semble être en stabilité enzootique et les cas sporadiques peuvent survenir à la faveur d'épisodes climatiques particuliers (pluviométrie

importante) ou d'un manque de ressources alimentaires liées à un décalage de floraisons. La Réunion est la seule île de toute la zone échantillonnée du SOOI où cette bactérie a été détectée. Malgré sa relative innocuité, il faudrait prendre en compte ce risque pour toutes les îles de la zone en l'intégrant dans la surveillance zonale puisque cette maladie est notifiable à L'OIE et par exemple réglementée à Madagascar.

→ **La souche de *V. destructor* présente dans le SOOI est la souche K**

V. destructor a été mis en évidence à Maurice en 2014 (Esnault *et al.*, 2018) et à La Réunion en 2017 (Esnault et al., in prep). Sa présence était déjà connue à Madagascar depuis 2010 (Rasolofoarivao *et al.*, 2013). Les analyses du gène de la cytochome-oxydase 1 ont montré que les souches retrouvées à Maurice et à La Réunion appartiennent à la même souche, l'haplotype K. Cette souche de varroa se retrouve sur tous les continents et est la souche majoritaire infectant les populations d'abeilles mellifères (Solignac *et al.*, 2005, Fazier *et al.*, 2010, Maggi *et al.*, 2012). Les deux séquences obtenues de Maurice montraient plus de diversité que les 14 séquences analysées de La Réunion (des premiers foyers de détection de l'acarien). Sur les 14 séquences disponibles, 13 étaient clonales et une présentait une mutation analogue. On peut supposer que la population de varroa introduite sur Maurice présentait plus de diversité et que la population introduite pourrait être supérieure en taille à celle introduite à La Réunion. Mais il faut rester prudent, en raison du faible nombre de séquences analysées. Si l'analyse des séquences de nucléotides ne peut pas renseigner précisément sur l'origine géographique du varroa sur les deux îles, une introduction à partir de la zone SOOI (Madagascar pour Maurice et Madagascar ou Maurice pour La Réunion) ne peut pas être exclue. Les transports maritimes entre les îles et notamment les navires de croisière peuvent jouer un rôle dans la dissémination d'essaims et du cortège de parasites associés avec le développement du tourisme depuis 4 ans. A titre d'exemple, un témoignage fiable d'un essaim se fixant sur un navire faisant la liaison Toamasina (Madagascar) – Le Port (La Réunion) a été rapporté aux autorités sanitaires réunionnaises (O. Esnault, Com. Pers.). Cette voie d'introduction doit désormais être intégrée dans les dispositifs de surveillance pour les années à venir.

→ ***Aethina tumida* est présent à Madagascar et a été récemment introduit à Maurice**

L'observation d'*A. tumida* pendant l'enquête épidémiologique de 2015 à Madagascar vient confirmer les précédentes observations réalisées lors de la description de l'invasion de *V. destructor* suite à sa détection en 2010 (Rasolofoarivao *et al.*, 2013). *A. tumida* est d'origine africaine et particulièrement d'Afrique sub-saharienne (Neumann *et al.*, 2016) mais son statut écologique est indéterminé à

Madagascar (indigène ou exotique). C'est un équarrisseur de la colonie et au même titre que *Galleria mellonella*, il n'aura un impact sur les colonies que quand celles-ci s'affaiblissent (manque de ressources, parasitisme, etc.) (Neumann and Elzen, 2004). Dans sa zone d'endémie, il ne semble pas avoir d'impact majeur sur les colonies (Pirk and Yusuf, 2015). C'est pourquoi à Madagascar une hypothèse d'indigénat concernant son statut peut être posée. Par contre, quand il envahit un nouveau territoire, il peut générer des mortalités de colonies. Deux ans après sa première détection aux USA (1996 en Floride) son impact économique était évalué à 3 millions d'USD (Ellis *et al.*, 2002). L'année suivant l'introduction de varroa à Maurice il été mis en évidence (H Rasamoelina, pers. comm.). Compte tenu de son activité d'équarrisseur et des mortalités potentielles qu'il peut générer quand il est introduit dans un nouvel écosystème, l'action conjointe de varroa et d'*A. tumida* risque d'aggraver la situation sanitaire des colonies déjà très affectées.

→ **Parmi les microsporidies identifiées dans le SOOI, *N. ceranae* est présente sur toutes les îles et *N. apis* tend à disparaitre**

N. apis n'a été retrouvée que dans 3 échantillons (2 à Rodrigues et 1 à La Réunion) et dans le cas de La Réunion, n'a pas été remise en évidence dans la colonie positive quelques semaines après. Cette microsporidie affectant les abeilles est connue depuis plus d'un siècle (Zander, 1909). A la fin des années 1990, une nouvelle espèce de microsporidie fut mise en évidence chez l'abeille asiatique *A. cerana* (Fries *et al.*, 1996a). *N. ceranae* fut ensuite retrouvée dans des populations d'*A. mellifera* en Europe et en Asie (Higes *et al.*, 2006, Huang *et al.*, 2007). *N. ceranae* aurait donc effectué un changement d'hôte en passant d'*A. cerana* à *A. mellifera* (Botias *et al.*, 2012a). Néanmoins, ce saut d'espèce serait plus ancien puisque des échantillons d'abeilles originaires d'Amérique du Sud ont permis la mise en évidence de la présence du parasite dès les années 1990 en Uruguay ou au Brésil (Invernizzi *et al.*, 2009, Teixeira *et al.*, 2013). Le commerce d'abeilles à l'échelle mondiale pourrait avoir facilité la dispersion de *N. ceranae* (Botias *et al.*, 2012a). Le comportement invasif de *N. ceranae* conduirait au remplacement de *N. apis*, cantonnant celle-ci aux zones « froides » septentrionales (Chen *et al.*, 2009, Chen *et al.*, 2012b, Martin-Hernandez *et al.*, 2012, Martinez *et al.*, 2012). Les taux de prévalence observés avec *N. ceranae* sont supérieurs à ceux observés avec *N. apis* et le portage semble également être plus long au sein de la colonie (Botias *et al.*, 2012c, Csaki *et al.*, 2015, Rangel *et al.*, 2018). Malgré cela, la présence de *N. apis* a été confirmée en Afrique de l'Est (Muli *et al.*, 2014). Les fortes prévalences de *N. ceranae* observées dans la région semblent donc être liées à l'introduction ancienne ou récente d'abeilles porteuses de *N. ceranae* depuis des zones infestées. La diversité génétique des abeilles de la région montre l'existence récente ou ancienne d'introductions d'abeilles

En effet, les reines peuvent disséminer le parasite dans les colonies (Munoz *et al.*, 2014). La faible prévalence de *N. apis* dans la région suggèrerait également un remplacement de *N. apis* par *N. ceranae*. Les analyses concernant les microsporidies ont été réalisées en utilisant des outils moléculaires sur des mélanges de 25 à 50 abeilles. Les taux de prévalences ont donc été calculés à l'échelle de la colonie. Au niveau individuel, ces analyses n'ont pas été réalisées et auraient pu apporter un éclairage plus fin concernant les niveaux de portages individuels au sein des colonies. Par ailleurs, les prévalences mesurées sur les « petites îles » (i.e. La Réunion, Maurice, Rodrigues et Seychelles) sont largement supérieurs à la prévalence mesurée à Madagascar. Dans d'autres « petites îles » (Hawaii et La Dominique), les taux de *N. ceranae* mesurés étaient similaires aux taux des « petites îles » de l'Océan Indien (>90%) (Martin *et al.*, 2013, Rangel *et al.*, 2018). Ces îles sont situées en zone tropicale (tout comme les îles de l'Océan Indien) avec un climat favorable à *N. ceranae*. La dissémination des spores et la contamination des jeunes abeilles se fait par voie horizontale de type féco-orale puisque les spores sont disséminés via les fèces d'abeilles (Higes *et al.*, 2010b). Les aires de butinage étant plus restreintes sur les petites îles, la présence de spores pourrait être concentrée localement en fonction des miellées et ainsi les butineuses se contamineraient plus facilement et infesteraient ainsi les jeunes abeilles à leur retour à la ruche. A La Réunion, où les aires de butinage sont bien marquées géographiquement, les apiculteurs ont l'habitude de transhumer leurs colonies dans l'ouest et le sud de l'île pour la miellée de « baies roses » (*Schinus terebenthifolius*) au mois de mars et en août de transhumer les colonies vers l'Est de l'île pour bénéficier de la miellée de letchis (*Litchi sinensis*) (Aymé, 2014). Les hypothèses quant aux différences de prévalences au sein des cheptels apiaires sont difficiles à formuler. Les fonds génétiques des abeilles sont différents. En effet les abeilles de La Dominique appartiennent majoritairement à la lignée M4 (donc européennes) (Rangel *et al.*, 2018) alors que les abeilles du SSOI appartiennent pour la quasi-totalité à la lignée A avec des taux de métissage différentiels selon les îles (majoritairement avec des lignées C) (Techer *et al.*, 2017a, Techer *et al.*, 2017b), pour un maximum de métissage à Rodrigues où c'est la lignée C qui prédomine (Techer *et al.*, 2015) mais toutefois avec des traces de fond génétique de lignées A détectées par analyse génomique (Wragg *et al.*, 2018).

En 2017, une nouvelle espèce, *Nosema neumanni* a été décrite en Angola (Chemurot *et al.*, 2017). Parmi les îles étudiées, les Seychelles et Madagascar sont d'origine continentale. C'est-à-dire que ce groupe d'îles faisait partie avec l'Afrique du super continent Gondwana et, à la faveur des mouvements tectoniques se sont séparées progressivement il y a plusieurs millions d'années (Coffin and Rabinowitz, 1987, Storey *et al.*, 1995). La biodiversité de ces îles continentales a évolué en isolation depuis pour créer ces écosystèmes insulaires exceptionnellement riches en biodiversité. La sous-espèce endémique *A. m. unicolor* retrouvée à Madagascar, appartient à la lignée évolutive africaine (A), celle-

ci s'est isolée sur cette île continentale et a évolué en isolation puis divergé. La différenciation entre les sous-espèces d'abeilles a été estimée en moyenne à environ 1,25 MA sur ADN mitochondrial par Garnery et al. (1992) et 0,67 MA (ND2) par Arias and Sheppard (1996). Toutefois, l'étude génomique de Wallberg et al. (2014) suppose une divergence plus récente des lignées évolutives (il y a 300 000 ans) et des sous-espèces (13-38 000 ans), plaçant cette divergence avant la colonisation des îles de l'Océan Indien par l'Homme. La zone SOOI fait partie au même titre que l'Afrique subsaharienne de l'écozone afrotropicale et est également soumise à de grandes influences de l'Afrique de l'Est notamment via des échanges. A ce titre, *N. neumanni* aurait pu être introduite dans la zone. Enfin, le fonds génétique africain des abeilles du SOOI est très proche des lignées africaines. Or, *N. neumanni* est un parasite des abeilles africaines et comme pour tout parasite, il y a eu une coévolution entre les deux. Dès lors et particulièrement à Madagascar, la recherche de *N. neumanni a priori* africaine permettrait de savoir si elle est présente et de s'intéresser à son histoire évolutive notamment en s'intéressant aux traits de coévolutions entre la microsporidie et les abeilles de la lignée A de la zone SOOI.

1.3. Diversité des virus pathogènes dans la zone SOOI

1.3.1. BQCV et CBPV

Le virus de la cellule de la reine noire (BQCV) est un des virus les plus répandus à l'échelle mondiale et est régulièrement mis en évidence lors d'enquêtes multi-pathogènes (Tentcheva *et al.*, 2004, Chen *et al.*, 2005, Cavigli *et al.*, 2016, Muz and Muz, 2018). Le virus est retrouvé en quantité importante à La Réunion (89%) et très faible à Rodrigues (4%). Sur les autres îles, sa prévalence est comprise entre 33 et 51%. Ces taux sont similaires à ceux retrouvés dans d'autres enquêtes multi-pathogènes. Quant à sa faible prévalence sur l'île Rodrigues, peut-être que le peuplement d'abeilles différents des autres îles (Techer *et al.*, 2015) ou l'écosystème de l'île n'ont pas créé de conditions épidémiologiques favorables à son développement. Aucun signe clinique d'infection à BQCV n'a été observé pendant toutes les enquêtes épidémiologiques sur les différentes îles. Le rôle pathogène du BQCV est discuté. Des épisodes cliniques ont été recensés sur l'île de La Réunion en 1976 chez un éleveur de reines (B. Giraudet, Com Pers.) mais généralement l'infection de la colonie par BQCV est asymptomatique (Vidal-Naquet, 2015).

Les amorces utilisées pour la RT-PCR de détection du BQCV sont BQCV3 et BQCV4 (Blanchard *et al.*, 2007). La séquence obtenue est située dans le premier cadre de lecture (ORF1) et code pour des protéines non structurales. La position de la séquence obtenue est située dans une région conservée du génome codant pour la protéine ARN polymérase RNA dépendante (RdRp) permettant ainsi une étude de taxonomie fiable (Leat *et al.*, 2000).

Quatre séquences de Madagascar ont été obtenues, 3 des Seychelles et 2 de Maurice. Les séquences de La Réunion n'ont pas pu être comparées ici puisque le set d'amorce utilisé était différent. Un arbre phylogénétique bayésien a été construit avec les séquences obtenues pour la zone SOOI et les séquences les plus proches trouvées dans la littérature en utilisant l'algorithme « blast » de Genbank. L'arbre phylogénétique nous permet de mettre en évidence un cluster génétique bien distinct comprenant tous les haplotypes de la zone SOOI. La séquence obtenue la plus proche (99% d'identité) est une séquence d'origine australienne (KY465684 (Roberts et al., 2017). Les haplotypes du groupe SOOI sont bien différenciés des haplotypes retrouvés de la zone la plus proche géographiquement (Afrique du Sud (AF183905)) (Figure 45). Les séquences seychelloises sont proches les unes des autres, tout comme celles de Maurice. Concernant la situation à Madagascar, la disposition des séquences semble être le reflet de la situation géographique avec un groupe « côte Est », un groupe « Hauts Plateaux » et un groupe « côte Ouest ». Cette structuration géographique peut s'expliquer par les distances importantes entre les sites échantillonnés et la diversité des écosystèmes rencontrés. Un autre facteur à prendre en compte est la présence de varroa sur les zones de la « côte Est » et des « Hauts Plateaux ». L'hypothèse d'une transmission de BQCV par varroa a été soulevée en Nouvelle-Zélande (Mondet et al., 2014) ce qui pourrait aussi contribuer à l'explication de la diversité rencontrée sur Madagascar. La proximité des souches mauriciennes avec les souches australiennes pourrait s'expliquer quant à elle par l'import régulier de souches australiennes par la Division of Entomology du ministère de l'Agro Industry de Maurice. L'ajout de séquences de Rodrigues aurait fourni des informations complémentaires intéressantes, mais pour cela un nouvel échantillonnage plus important devrait être réalisé à la vue de la faible prévalence de ce virus dans les ruchers de l'île. Les séquences utilisées pour construire l'arbre phylogénétique sont de taille relativement réduites et ces résultats doivent être interprétés avec prudence. Des séquençages complets de ce virus permettraient de mieux comprendre la diversité intraspécifique de BQCV au sein de la région SOOI et de pouvoir proposer des hypothèses quant à son introduction.

Le virus de la paralysie chronique ainsi que le virus des ailes déformées sont également très fréquemment mis en évidence lors d'enquêtes multi-pathogènes et particulièrement lors d'enquêtes de recherche de facteurs de risque de mortalités (Antúnez *et al.*, 2005, Berthoud *et al.*, 2010). Concernant le CBPV, il semble absent de l'île Rodrigues et c'est à La Réunion où sa prévalence au niveau des colonies est la plus élevée (51%). Pourtant, aucun signe clinique lié à la présence du virus n'a été observé comme des abeilles à l'abdomen luisant ou encore des signes d'abeilles tremblantes. En Nouvelle-Zélande, les prévalences observées avant/après l'arrivée de varroa montraient des taux de prévalences similaires à ceux observés dans le SOOI (Mondet *et al.*, 2014). Lors des enquêtes de terrain, aucun signe clinique d'infection à CBPV n'a été observé dans le SOOI.

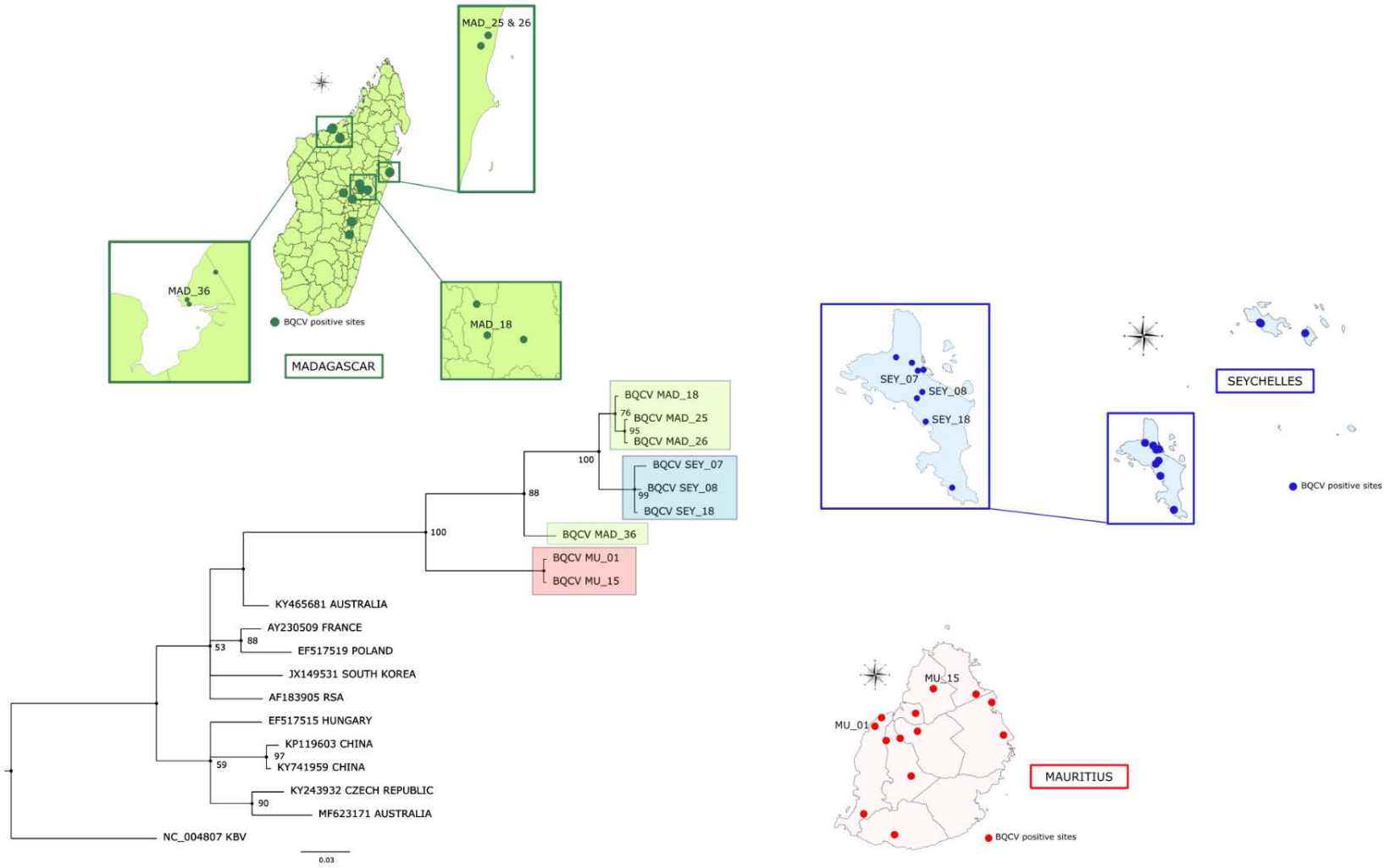


Figure 46 : Arbre bayésien de diversité des séquences obtenues du virus BQCV pour la zone SOOI avec les probabilités affichées sur chaque nœud pour chaque séquence a posteriori d'appartenir à chaque nœud. Le modèle choisi est GTR+I+G.

La mise en évidence du CBPV a été réalisée par RT-PCR quantitative et l'étude de la diversité intraspécifique n'est pas possible avec ce type de technologie moléculaire. La recherche de séquences voire de séquençages complets des deux brins d'ARN constituant le génome du virus (Ribiere *et al.*, 2010) pourrait donner des informations complémentaires sur la diversité des souches virales dans le SOOI.

1.3.2. Le DWV

Le virus des ailes déformées a été mis en évidence sur toutes les îles du SOOI à l'exception de La Réunion. Il est transmis par le parasite *V. destructor* mais on peut le retrouver en faibles quantités en l'absence du parasite (Martin *et al.*, 2012, Mondet *et al.*, 2014). Dans la région SOOI, le virus a aussi bien été retrouvé en présence du parasite (à Maurice et Madagascar) qu'en son absence (à Rodrigues et aux Seychelles). Contrairement à Madagascar, Maurice et à La Réunion, aucune abeille aux ailes déformées n'a été observée aux Seychelles ni à Rodrigues. Si les résultats obtenus à Rodrigues confirment les observations réalisées à Hawaii et en Nouvelle-Zélande avant l'arrivée de varroa, le taux très élevé de DWV aux Seychelles interpelle. Ainsi, ce taux est beaucoup plus élevé qu'observé à Hawaii dans les populations d'*A. mellifera* sur les îles sans varroa (Santamaria *et al.*, 2018). Pour autant, aucun signe clinique d'ailes déformées n'ont été observés tant aux Seychelles, qu'à Rodrigues ou à Madagascar dans la zone sans varroa. L'expression clinique du DWV est corrélée à la charge virale dans les abeilles (Gauthier *et al.*, 2007, Ryabov *et al.*, 2014). Les techniques de RT-PCR utilisées n'ont pas permis la quantification du virus. Or, les charges virales sont déterminantes quant aux statuts sanitaires des colonies (Amiri *et al.*, 2015). La dispersion du virus du DWV est parfois considérée comme épizootique, voire pandémique, car liée au processus d'invasion de *V. destructor* (Wilfert *et al.*, 2016). Or, les processus épidémiologiques en cours dans l'Océan Indien en l'absence de varroa (Seychelles, Rodrigues, Madagascar sans varroa) et corrélé à l'absence de signes cliniques observés pendant les enquêtes, il semblerait que le virus DWV soit enzootique dans le SOOI en l'absence de varroa. Pour mieux comprendre ces processus épidémiologiques et pour pouvoir les comparer, les données concernant la présence de DWV sans varroa sont malheureusement trop rares à l'échelle mondiale compte tenu de l'invasion du parasite dans les populations d'abeilles mellifères.

Les amorces utilisées pour la RT-PCR de détection du DWV sont DWV3 et DWV4 (Blanchard *et al.*, 2007). La séquence obtenue est située dans la partie du génome du DWV qui code pour la protéine VP2 entre les bases 4266 et 4685 du génome complet de DWV (MG831204 dans GenBank) et compte 332 nucléotides. Les séquences obtenues avec ces amorces sont situées sur des régions de hotspot de recombinaison ne permettant pas de distinguer DWV de formes « recombinées » (Dalmon *et al.*, 2017).

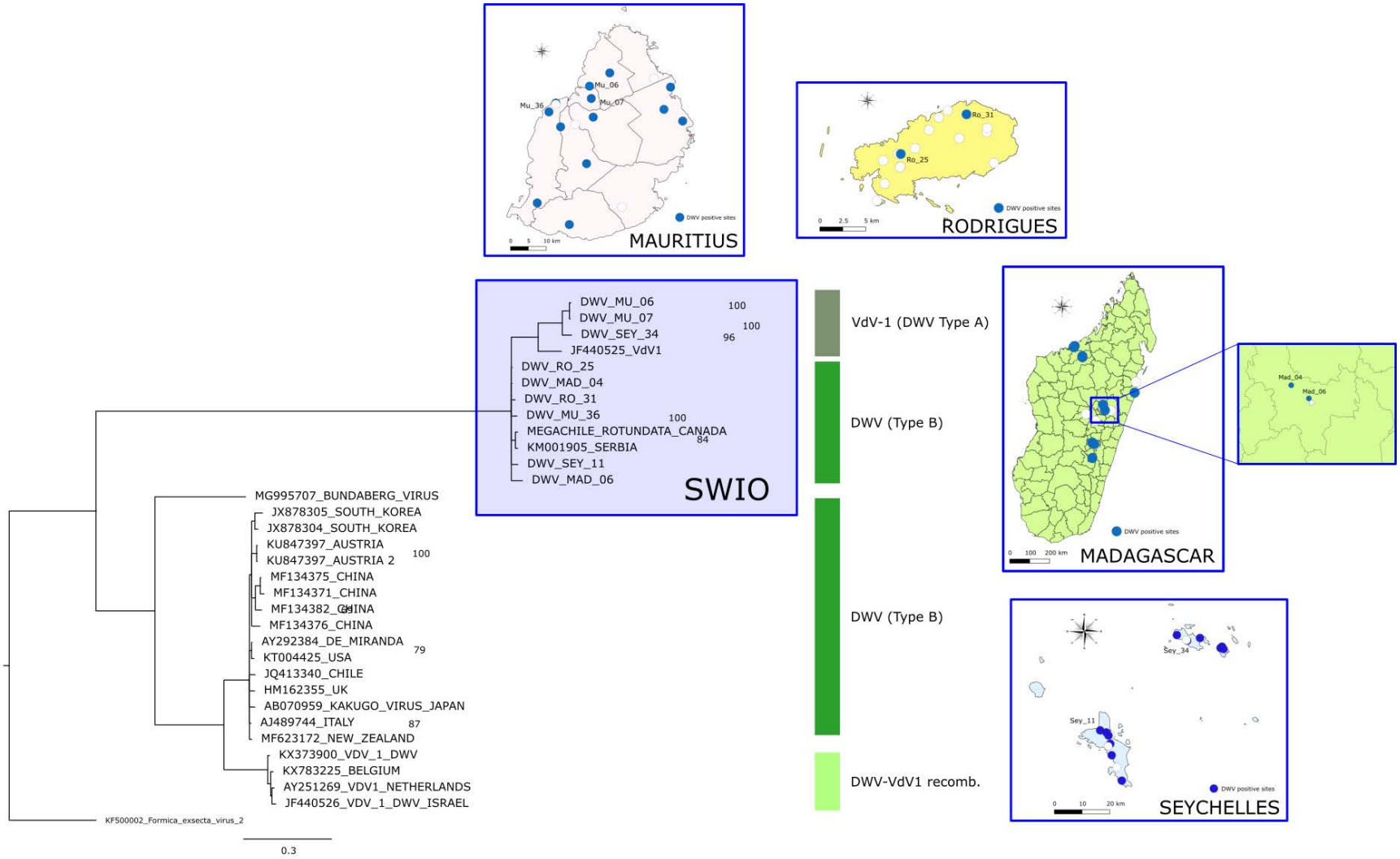


Figure 47 : Arbre bayésien de diversité des séquences de DWV obtenues dans le SOOI. L'arbre est construit avec 9 séquences (2 de Madagascar, 3 de Maurice, 2 de Rodrigues et 2 des Seychelles). Les nombres placés sur les nœuds indiquent la probabilité a posteriori d'appartenir à tel nœud. Le modèle choisi pour construire l'arbre est le modèle suivant : GTR+I+G.

Les séquences utilisées pour la construction de l'arbre phylogénétique bayésien se retrouvent au sein d'un cluster génétique distinct (Figure 46) au sein duquel se retrouvent une séquence de VdV-1 (JF440525), deux séquences de DWV, une originaire de Serbie (KM001905) et une isolée sur une abeille solitaire originaire du Canada (KX302283). A noter, que le virus VdV-1 peut également être appelé DWV type A et le virus « historique » DWV est appelé DWV type B (Mordecai *et al.*, 2016). Les séquences de Maurice et des Seychelles présentent de la diversité sur les séquences obtenues. Deux séquences mauriciennes (MU_06 et MU_07) et une séquence seychelloise (SEY_34) sont situées dans un clade commun sur lequel apparaît une séquence de VdV-1 (JF440525). Les séquences rodriguaises, malgaches ainsi qu'une séquence mauricienne (MU_36) et seychelloise (SEY_11) appartiennent au même clade, sur lequel sont présentes les séquences de DWV originaire de Serbie et la séquence isolée sur *Megachile rotundata*.

De récents travaux ont mis en évidence des recombinaisons entre le DWV type B et le type A dans la région ciblée par les amorces utilisées (Dalmon *et al.*, 2017) ce qui pourrait expliquer cette sous-structuration du groupe des séquences du SSOI avec des souches « DWV » (RO_25, MAD-04, RO_31, MU_36, SEY_11 et MAD_06) et des souches proches d'une séquence VdV-1. Pour autant, compte tenu de la faible taille des séquences utilisées pour construire l'arbre phylogénétique (332 pb), il est difficile de statuer quant à une hypothèse d'espèce pour les séquences MU_06, MU_07 et SEY_34. Il peut soit s'agir du virus recombinant DWV-VdV-1 soit d'un virus VdV-1. Par exemple au Kenya, lors d'une enquête réalisée en 2013, le virus VdV-1 avait la prévalence la plus élevée (Ongus *et al.*, 2017) mais avait été mis en évidence par des amorces spécifiques de VdV-1 (Ongus *et al.*, 2006).

La proximité de la plupart des souches de « DWV » du SOOI avec une séquence isolée à partir d'une abeille solitaire rappelle que le DWV est un virus qui peut infecter un nombre important de butineurs sauvages comme les *Bombus* ou d'autres Apidae sauvages. Si le genre *Bombus* n'est pas représenté dans le SOOI, de très nombreuses abeilles solitaires sont présentes dans la zone.

A La Réunion il existe au moins 9 espèces d'Apidae sauvages non sociaux : *Xylocopa fenestrata* (Fabricius, 1798), *Ceratina tabescens* (Cockerell, 1912), *Braunsapis* sp. nr *hewitti*, *Lasioglossum* (*Ipomalictus*) *bourboni* (espèce non-décrite), *Seladonia orientalis* (Lepeletier, 1841), *Lasioglossum* (*Ctenomia*) *mahense* (Cameron 1908), *Megachile* sp. 1, *M. disjuncta* (Fabricius, 1804), *M. lanata* (Fabricius, 1775).

Parmi les autres hyménoptères d'intérêt à La Réunion, la guêpe poliste (*Polistes olivaceus*) est très prisée par les réunionnais qui consomment les larves frites.

Parmi tous les genres d'abeilles solitaires présents à La Réunion, leurs sensibilités spécifiques aux agents pathogènes de l'abeille mellifère n'ont pas toutes été étudiées. Ainsi peu de données sont

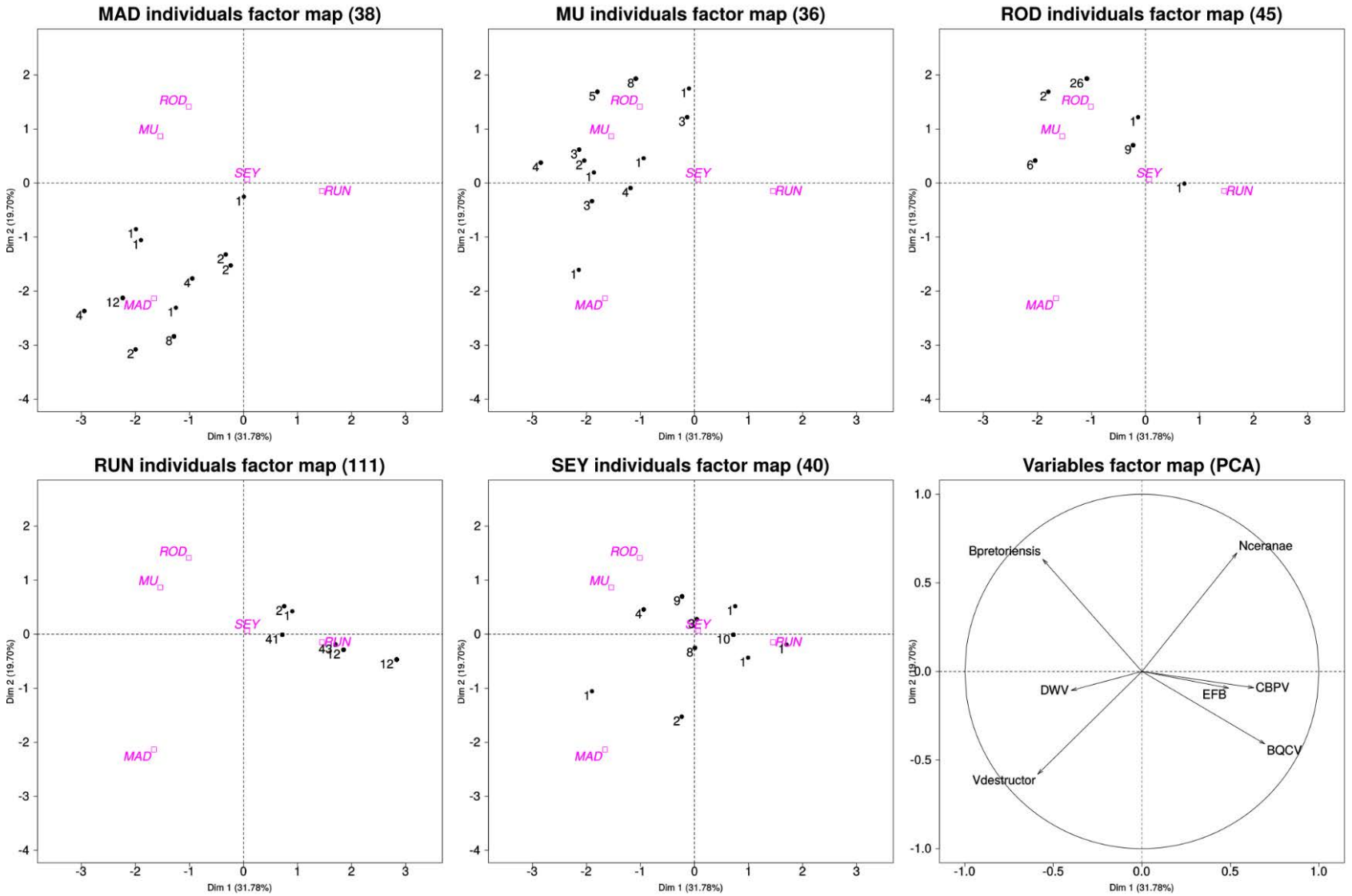


Figure 48 : Projection en deux dimensions des données sanitaires pour chaque territoire suite à une analyse en composantes principales (ACP)

disponibles concernant les abeilles du genre *Megachile*. Par contre, le genre *Osmia* qui lui est très proche phylogénétiquement, a été beaucoup plus étudié et a montré des sensibilités à de nombreux virus (BQCV, DWV…) ainsi qu'à *Nosema ceranae* (Ravoet *et al.*, 2014, Radzevičiūtė *et al.*, 2017).

D'après la littérature, et particulièrement avec DWV et sa symptomatologie typique, les études citées précédemment n'ont pas montré de gravité clinique importante pour les abeilles solitaires exposées aux virus étudiés. Sachant que ces virus à ARN ont la possibilité de se transmettre de manière indirecte via le pollen, il est possible que ces virus, isolés soit sur abeilles soit sur le pain d'abeille stocké pour leurs larves, ne soient que le reflet d'une contamination globale de l'environnement floral par surcharge écologique de l'abeille mellifère sur les aires de butinage (Singh *et al.*, 2010, Radzevičiūtė *et al.*, 2017).

Ainsi, la menace du DWV qui peut être transmis par le varroa pourra être à risque pour les populations de butineurs sauvages (Graystock *et al.*, 2013a, Graystock *et al.*, 2013b, Iwasaki *et al.*, 2015, Graystock *et al.*, 2016, Tehel *et al.*, 2016). *A contrario*, l'hypothèse d'un réservoir sauvage au sein des populations d'abeilles solitaires n'est pas à exclure non plus puisque ce virus se transmet de manière très efficace via les fleurs et le pollen (Mazzei *et al.*, 2014).

Pour conclure sur la diversité des agents pathogènes, les patterns d'agents pathogènes observés dans la région SOOI sont au final assez homogènes en termes de présence de virus (BQCV, CBPV et DWV) mais diffèrent par la présence d'autres agents pathogènes comme *M. plutonius*, *V. destructor* ou bien encore *B. pretoriensis*. Une projection des colonies en fonction des profils d'agents pathogènes identifiés montre une structuration de ces groupes en fonction de ces derniers (Figure 48). Les enquêtes épidémiologiques réalisées n'ont montré la situation qu'à un instant donné (au moment des enquêtes). Or, les agents pathogènes peuvent suivre des dynamiques temporelles (Antúnez *et al.*, 2015) et ainsi être plus abondants à certaines périodes de l'année en fonction de divers facteurs comme des évènements climatiques ou de la disponibilité en ressources alimentaires (Cavigli *et al.*, 2016, Palmer-Young *et al.*, 2017).

Enfin, afin d'être plus exhaustif dans la description de la pathosphère de l'abeille mellifère dans le SOOI, d'autres agents pathogènes pourront être recherchés comme les mycoses du couvain, des protozoaires ou bien encore d'autres virus ciblés comme pouvant avoir un rôle important dans le déclin des colonies (Carreck *et al.*, 2010a, Amakpe *et al.*, 2016, Parmentier *et al.*, 2016).

2. Interactions entre agents pathogènes, hôtes-pathogènes et dynamique d'invasion

2.1. Interactions

La seule interaction observée lors de ces différentes études entre agents pathogènes concerne une corrélation entre *Acarapis sp.* et BQCV sur l'île de La Réunion. Les acariens identifiés dans les ruchers réunionnais ne sont pas des acariens de l'espèce *A. woodi* mais pourraient être *A. dorsalis* qui lui ne parasite pas les trachées thoraciques de l'abeille. Malheureusement, aucune identification n'a pu être réalisée par un acarologue empêchant ainsiun diagnostic avec certitude. Le rôle pathogène d'*A. dorsalis* est discuté (Delfinado-Baker and Baker, 1982) même s'il semble se nourrir de l'hémolymphe de l'abeille (Delfinado-Baker and Baker, 1982). *A. woodi* est suspecté de jouer un rôle dans la transmission de plusieurs virus dont le CBPV et le KBV (Fernández, 1999). Au vu de ces éléments, un possible rôle de vecteur biologique de la part d'*Acarapis sp.* ou de vecteur mécanique, peut être raisonnablement envisagé. La présence de cet ectoparasite sur d'autres îles du SOOI mériterait d'être approfondie et si sa présence est avérée de lui rechercher un éventuel rôle de vecteur.

Varroa peut disséminer un certain nombre d'agents pathogènes. Son rôle vecteur le plus connu concerne la vection du DWV (Bowen-Walker *et al.*, 1999, Shen *et al.*, 2005) mais il peut également transmettre d'autres virus comme le KBV, SBV ou encore ABPV et IAPV (Chen *et al.*, 2004a, de Miranda *et al.*, 2010a). Les historiques d'invasions des îles du SOOI par varroa sont différents. Le parasite a été détecté à Madagascar en 2010 (Rasolofoarivao *et al.*, 2013), à Maurice en 2014 et à La Réunion en 2017. Les enquêtes sanitaires ont été menées 5 ans après la première détection à Madagascar, mais pendant l'invasion pour Maurice et avant l'invasion pour La Réunion. A Hawaii et en Nouvelle-Zélande, il a été montré que l'introduction de varroa dans une population d'abeilles modifiait la structure de la pathosphère virale initiale en augmentant la prévalence des virus transmis par varroa et en modifiant le cortège de souches de virustransmises, particulièrement pour le DWV (Martin *et al.*, 2012, Mondet *et al.*, 2014) le SBV et le KBV (Mondet *et al.*, 2014). Dans le cas particulier du DWV, à Hawaii, 3 ans après la détection initiale de varroa, la souche majoritaire identifiée était une souche qui se retrouvait en Europe mais aussi en Amérique du Nord, suggérant ainsi une introduction de DWV via varroa (Martin *et al.*, 2012). Or à Madagascar, ni le KBV, ni l'ABPV ni le SBV parmi les virus recherchés n'ont été identifiés. Les deux haplotypes de DWV identifiés au sein de la zone « historique » de présence du varroa font partie du groupe du SOOI. Cela pourrait suggérer que varroa agisse en tant que « multiplicateur » des virus endémiques et ainsi privilégie certains isolats ou souches, qui pourraient être mieux adaptés à une vection par cet acarien et ainsi êtres favorisés lors des interactions varroa-abeilles. Certains virus peuvent s'adapter à de nouveaux vecteurs comme ce fut le cas avec le virus du Chikungunya (Togaviridae, virus à ARN), qui, lors de l'épidémie qui a eu lieu en 2005-2006 dans l'Océan

Indien et grâce à une mutation, a changé de vecteur en passant de *Aedes aegypti* à *A. albopictus* en devenant plus compétent et assurant ainsi des taux de transmission très élevés (Schuffenecker *et al.*, 2006). On pourrait ainsi présupposer que, soit les souches de DWV présentes dans le SOOI sont adaptées à la vection par varroa, soit qu'une souche compétente du groupe SOOI ait été sélectionnée parmi la diversité initiale du DWV présent à Madagascar. C'est pourquoi, en se basant sur cette hypothèse, les séquences de DWV identifiées à Madagascar sont proches de toutes celles de l'Océan Indien puisque 5 ans après la détection initiale du parasite, la situation enzootique DWV/varroa devrait être stabilisée.

Enfin, lors des différentes enquêtes réalisées à Madagascar ou à Maurice, il n'y a pas eu de corrélations ou d'associations statistiques entre la présence du DWV et celle de varroa, même en cumulant les effectifs malgaches et mauriciens afin d'obtenir plus de puissance statistique sur ces petits échantillonnages.

2.2.L'invasion du SOOI par varroa est en cours

Désormais trois territoires sont infestés par *V. destructor*. Le premier pays de la zone à avoir déclaré la présence du parasite est Madagascar. L'étude d'impact du parasite sur les mortalités a montré des taux de mortalité très importants sur l'île (entre 48 et 100% avec un taux de mortalité moyen mesuré de 60%) (Rasolofoarivao *et al.*, 2013). Le parasite s'est diffusé relativement rapidement à Madagascar avec une vitesse de dispersion comprise entre 10 et 40 km/an (Rasolofoarivao *et al.*, 2013) même si très peu d'apiculteurs malgaches pratiquent la transhumance (Rasolofoarivao *et al.*, 2013) favorisant la dispersion du parasite. L'infestation progresse régulièrement et à terme, toute l'île devrait être infestée. A Maurice, la vitesse de dispersion annuelle estimée a été de 28 km/an ce qui correspond à la distance maximale à vol d'oiseau mesurée entre le foyer initial et le foyer le plus distant constaté lors de l'enquête de terrain (Esnault *et al.*, 2018). L'homme a joué un rôle dans la dissémination du parasite sur place puisque lors des enquêtes de terrain, et après la confirmation du premier cas, nous avons constaté que certains apiculteurs ont vendu leurs ruches avant que la nouvelle soit officiellement annoncée. Si la vitesse de dispersion à Maurice est similaire à celle observée à Madagascar elle est largement supérieure à celle observée en Nouvelle-Zélande (12 km/an) (Stevenson *et al.*, 2005). Enfin, il est à noter qu'à Madagascar et à Maurice, la confirmation de l'infestation s'est faite sur cas cliniques (mortalités et signes cliniques de varroose). La présence du parasite sur ces deux îles était donc bien antérieure à sa mise en évidence.

A la différence de Madagascar et Maurice, à La Réunion le parasite a été mis en évidence de manière précoce, c'est-à-dire bien avant l'apparition des premiers signes cliniques. Différentes études d'analyse

de risque réalisées entre 2011 et 2012 avaient classé le risque d'introduction du parasite comme étant « très élevé » pour l'île (ANNEXE 3). A cet effet, un réseau de ruchers sentinelles avait été construit au sein d'un dispositif d'épidémiosurveillance (réseau de Suivi Epidémiologique des maladies des Abeilles – réseau SEA). Le 04 mai 2017, le parasite fut mis en évidence dans un rucher sentinelle basé à Saint-Denis (au Nord de l'île). Dans la foulée un arrêté préfectoral bloquant les transhumances a été adopté et fut levé à la fin du mois de juillet pour permettre aux apiculteurs de transhumer pour la miellée de letchis dans l'Est de l'île, malgré l'identification de 5 zones indemnes. Le 15 novembre, tous les secteurs de l'île étaient touchés et les premières mortalités de colonies ont commencé courant décembre 2017. La dispersion sur cette île à la topographie particulière (avec un relief accidenté) a été fulgurante. Les 80 km qui séparent les extrémités de l'île ont été franchis en moins d'un an.

Sur toutes les îles et à des échelles différentes, des mesures de lutte ont été entreprises comme la destruction des foyers initiaux à Maurice et à La Réunion ou bien encore la mise à disposition de produits de traitements contre le varroa pour les apiculteurs. Toutes ces mesures de lutte se sont révélées illusoires et sans effets. Parmi les freins rencontrés, dans le cas de La Réunion, certains apiculteurs ont été réticents à la mise en place de moyens de lutte chimiques pour limiter les effets de varroa. Les ressorts de ces barrières « psychologiques » de rétivité au changement pourraient être étudiés dans le cadre d'études sociologiques. Or, un programme collectif de lutte ne peut pas se déployer sans l'adhésion des apiculteurs. Certaines îles, comme la Nouvelle-Calédonie, qui sont encore indemnes du parasite, doivent anticiper ces freins dans le cas d'une anticipation d'un plan de lutte efficace en cas d'introduction du parasite.

Si les apiculteurs peuvent jouer un rôle dans la dissémination des maladies et particulièrement du varroa (Owen, 2017), d'autres facteurs liés à la biologie de l'abeille et du parasite peuvent avoir leur influence. Varroa peut infester les colonies de proche en proche par les phénomènes de dérive (Nazzi and Le Conte, 2016), mais aussi lors de la fécondation de la reine par les congrégations de mâles (Mortensen *et al.*, 2018). Le pic d'essaimage à La Réunion a lieu en septembre/octobre au sortir de l'hiver austral. La conjonction des essaimages et la reprise de la transhumance ont ainsi largement contribué à la diffusion du parasite. Enfin, varroa a la capacité à survivre sur les fleurs (Smirnov et Gromyko d'après (Peck *et al.*, 2016)) et peut ainsi réinfester les abeilles butinant ces fleurs portant le parasite (Peck *et al.*, 2016).

3. Les mortalités de colonies dans le SOOI sont liées à l'introduction de varroa

A la différence de l'Europe ou de l'Amérique du Nord (Vanengelsdorp *et al.*, 2009a, Dainat *et al.*, 2012b), jusqu'au début des années 2010, la région du SOOI aura été épargnée par les mortalités aiguës de colonies.

Un an après sa détection à La Réunion, le taux de mortalité mesuré s'élevait à 22%, taux que l'on opposera à un taux de mortalité naturel évalué à 0.2% en 2014 avant l'arrivée de varroa. Dans les pays tempérés, les premières mortalités de colonies liées à varroa ont été estimées entre 1 et 3 ans (Ritter, 1981), laps de temps qui pourrait permettre au parasite de transmettre le virus du DWV (Todd *et al.*, 2007). Dans la région SOOI, les reines n'observent pas d'arrêt de ponte et le parasite trouve ainsi un terrain favorable à sa multiplication tout au long de l'année. Les mortalités observées à Maurice et à La Réunion ne sont pas le fait d'une synergie varroa et DWV. En effet, les prévalences de DWV mesurées à Maurice sont moins élevées que les prévalences qui ont pu être mesurées à Hawaii trois ans après l'introduction du parasite (Martin *et al.*, 2012), même si la charge virale conditionne l'expression clinique du DWV (Bradford *et al.*, 2017). Si l'estimation de l'introduction du parasite à Maurice est difficile (peut-être un an ou deux maximum avant les premiers symptômes), la vitesse de dissémination et la rapidité d'apparition des symptômes à La Réunion montre que sur sa phase d'invasion, les colonies peuvent mourir en moins d'un an. En effet, dans certains secteurs du Sud de l'île, les premiers varroas ont été observés courant septembre et les premières mortalités constatées en février (5 mois).

Parmi les agents stresseurs de l'abeille mellifère pouvant générer des mortalités de colonies, on distinguera les facteurs abiotiques et les facteurs biotiques (McMenamin *et al.*, 2016). Parmi les facteurs abiotiques, les pesticides et particulièrement les néonicotinoïdes peuvent affecter la santé de l'abeille à l'échelle individuelle ou de la colonie (Brandt *et al.*, 2016, Sanchez-Bayo *et al.*, 2016, Boyle and Sheppard, 2017, Tsvetkov *et al.*, 2017) mais aussi d'autres pesticides comme les fongicides (Yoder *et al.*, 2013, Degrandi-Hoffman *et al.*, 2015). Parmi les autres facteurs abiotiques, la diminution des ressources florales ou bien encore une alimentation pauvre en ressources alimentaires variées fragilise l'immunité et la santé de l'abeille (Di Pasquale *et al.*, 2013, Di Pasquale *et al.*, 2016, Dolezal and Toth, 2018). L'apiculteur à travers certaines pratiques contribue également à fragiliser (paradoxalement) ses colonies Concernant les facteurs biotiques, on citera *N. ceranae* qui a été estimée responsable de mortalités de colonies en Espagne particulièrement (Higes *et al.*, 2008, Antunez *et al.*, 2009, Higes *et al.*, 2009, Borneck *et al.*, 2010, Garcia-Palencia *et al.*, 2010, Higes *et al.*, 2010b). Des virus peuvent causer des mortalités individuelles comme entre autres le CBPV (Cox-Foster *et al.*, 2007a, Ribiere *et*

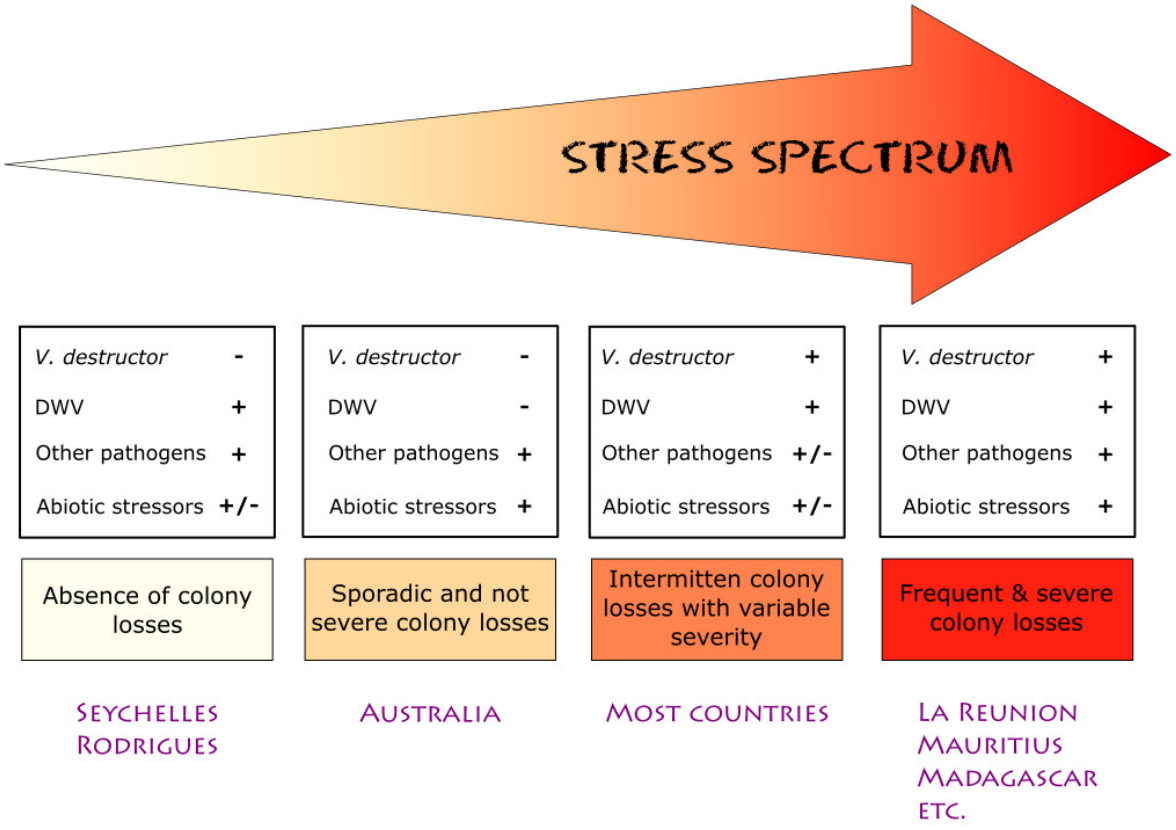


Figure 49 : Représentations du spectre du stress des abeilles mellifères mis à jour en ajoutant la situation dans le SOOI. Inspiré de Roberts etal., 2017.

al., 2010, Williams *et al.*, 2010, McMenamin and Genersch, 2015b) et l'ABPV (Dainat *et al.*, 2012a, Dainat *et al.*, 2012b) ou encore le DWV qui serait un des principaux suspects des causes d'effondrement des colonies (Schroeder and Martin, 2012).

Mais c'est surtout la conjonction de l'ensemble de ces facteurs de stress biotiques et abiotiques qui serait responsable de l'effondrement des populations d'abeilles (DeGrandi-Hoffman and Chen, 2015, Goulson *et al.*, 2015, Nazzi and Pennacchio, 2018). C'est notamment le cas des synergies à l'échelle individuelle des abeilles entre *N. ceranae* et les néonicotinoïdes (Vidau *et al.*, 2011, Aufauvre *et al.*, 2012, Aufauvre *et al.*, 2014) ou bien néonicotinoïdes et varroa (Abbo *et al.*, 2017). Il existe aussi des synergies d'agents pathogènes notamment l'association DWV – *V. destructor* (Wilfert *et al.*, 2016, Roberts *et al.*, 2017).

Or, quasiment tous ces facteurs de risque sont présents dans la zone SOOI. Si les données sont souvent lacunaires, des résidus de néonicotinoïdes ont été mis en évidence dans des miels originaire de La Réunion (Mitchell *et al.*, 2017) ou encore dans des cires aux Seychelles (Muli *et al.*, 2018). Le manque de disponibilité alimentaire peut se faire sentir durant l'hiver austral à La Réunion avec des occurrences de famines signalées par les apiculteurs (Chapitre 3). *N. ceranae* est présente sur les îles du SOOI avec une prévalence très forte sauf à Madagascar et deux virus impactant particulièrement la santé de l'abeille mellifère sont présents dans la région (DWV et CBPV). Malgré ce contexte, les apiculteurs n'ont signalé aucune mortalité lors de l'année de l'enquête sanitaire ni auparavant. Ceci est particulièrement vrai aux Seychelles, à Rodrigues. La situation à Madagascar, Maurice ou encore La Réunion était similaire avant la détection de l'ectoparasite *V. destructor*. Les seuls territoires exposés à des mortalités aiguës sont les territoires où varroa a été introduit. C'est pourquoi dans la zone SOOI et constatée, la principale menace sanitaire est le varroa qui est responsable de mortalités très dans un contexte épidémiologique principalement endémique avec une absence de symptomatologie importantes. Les autres agents stresseurs, sans nier leur existence bien au contraire, viennent surajouter des fragilités concernant la santé des abeilles favorisant ainsi le terrain à varroa. La gradation du spectre des agents stresseurs proposée par Roberts et al, 2017 est remise à jour en ajoutant les situations du SOOI (Figure 49).

Scènes apicoles rodriguaises (© Olivier Esnault)

Conclusion et perspectives

L'invasion de *V. destructor* au vu des taux de mortalité générés à Madagascar, Maurice ou La Réunion constitue une menace grave et réelle pour les populations d'abeilles encore indemnes du SOOI (Mayotte, Comores, Rodrigues, Seychelles).

L'abeille mellifère est un pollinisateur majeur qui fournit des services écosystémiques à la fois pour l'agriculture mais aussi au sein des écosystèmes indigènes et endémiques. Dans la zone SOOI, *A. m. unicolor* a un statut endémique à Madagascar et indigène à La Réunion, à Maurice et aux Seychelles. Son importance écologique est grande dans ces îles et des interactions nombreuses existent avec de nombreuses plantes à fleurs des Seychelles comme *Deckenia nobilis*, *Phoenicophorium borsigianum*, *Nephrosperma vanhoutteana* et *Medusagyne oppositifolia* (Finger *et al.*, 2011, Kaiser-Bunbury *et al.*, 2011), de Maurice comme *Sideroxylon cinereum*, *S. puburulum* et *Dombeya sevathianii* (Hansen *et al.*, 2002, Le Pechon *et al.*, 2011) ou encore de La Réunion *Gaertnera vaginata*, *Hugonia serrata*, *Trochetia granulata*, *Weinmannia tinctoria* (Pailler and Thompson, 1997, Meeus *et al.*, 2011, Le Péchon *et al.*, 2013, Rasoloarijao, 2018). Pour confirmer ces propos, il a été montré qu'*A. m. unicolor* préférait en majorité butiner les essences indigènes ou endémiques par rapport aux espèces végétales exotiques à la Réunion (Rasoloarijao, 2018).

Les services écosystémiques rendus par l'abeille concernent également l'agriculture où à La Réunion un certain nombre de cultures sont facilitées par le travail des abeilles, qu'il s'agisse d'arboriculture avec les letchis ou les agrumes ou encore les cultures légumières de Cucurbitaceae (Porciani, 2012).

Ce travail descriptif de la situation sanitaire dans le SOOI a soulevé bon nombres de questions, émis un certain nombre d'hypothèses à confirmer ou infirmer mais aussi quelques perspectives opérationnelles mais démontrant l'importance de l'épidémiologie descriptive dans le cadre de la surveillance de la santé animale.

Néanmoins, le travail de la description de la pathosphère de l'abeille dans le SOOI n'est pas terminé. La recherche des agents pathogènes s'est focalisée sur les plus connus ou les mieux renseignés. Des travaux complémentaires devraient s'intéresser entre autres aux mycoses du couvain, protozoaires et aux micro-acariens du genre *Acarapis* à l'écologie très peu connue. D'un point de vue géographique l'archipel des Comores n'a pas été investigué. La tradition d'apicueillette qui a cours dans l'archipel pourrait amener de nouvelles perspectives dans la définition de la pathosphère des abeilles du SOOI.

L'analyse des séquences obtenues concernant les virus délivrent des informations partielles qui doivent être interprétées avec précaution. Des séquençages complets des virus d'intérêt (BQCV, CBPV et DWV) pourraient permettre de mieux comprendre la diversité de ces virus, leur taxonomie notamment en raison des recombinaisons observées entre virus, et l'impact des effets de varroa sur la transmission et la diversité de certains de ceux-ci. Le rôle de varroa dans la transmission des virus devrait être également investigué.

Dans le SOOI la diversité des Apidae est importante avec des taux d'endémismes élevés. De nombreux agents pathogènes de l'abeille mellifère peuvent affecter la faune sauvage, notamment *N. ceranae* et le virus du DWV. La proximité des haplotypes de DWV dans le SOOI avec une souche identifiée sur une abeille solitaire du genre *Megachile*, ainsi que la capacité de dispersion de ces virus via les pollens, l'augmentation des prévalences et charges virales de DWV intra colonies liés à l'infection de *V. destructor,* sont autant de risques potentiels pour la faune sauvage fragile de ces hotspots de biodiversité. Ainsi il serait important de pouvoir aussi réaliser une campagne de détection de DWV sur cette faune d'abeilles solitaires dans les zones à fort risque récemment envahies par l'ectoparasite (Réunion, Maurice) versus celles non encore envahies (Rodrigues, Seychelles).

L'arrivée de *V. destructor* à la Réunion a fortement impacté la filière apicole. Afin d'y faire face, un programme sanitaire d'élevage a été mis en place dès la fin de l'année 2017 permettant la mise à disposition rapide de traitements vétérinaires contre le varroa. Cette action a été complétée par une campagne d'information et de formation intense où pas moins de 19 sessions de formations ont été réalisées pour les apiculteurs (sous l'égide du GDS Réunion). Néanmoins, d'autres voies de gestion de cet acarien parasite existent et nécessitent tout un pan de mise en place de protocoles visant à la sélection de lignées plus résistantes ou tolérantes. Ceci passe par l'évaluation des capacités de tolérance de l'abeille réunionnaise vis-à-vis de *V. destructor* : hygiénisme, VSH et SMR, mais aussi par la caractérisation des différents traits de vie de l'abeille réunionnaise.

Les dynamiques d'infestation de varroa sont mal connues en milieu tropical. Dans ce sens, des suivis longitudinaux pourront être mis en place afin de suivre l'évolution temporelle de la dynamique de la population de varroa au sein de la colonie. Des indicateurs de mesure de la force et de la productivité de la colonie seront associés afin de pouvoir déterminer les seuils économiques de l'infestation de varroa mais aussi les seuils sanitaires (charge en varroa déclenchant des symptômes). Enfin, des études similaires à celles réalisées à Hawaii ou en Nouvelle-Zélance pourront être déployées sur certains secteurs géographiques de Madagascar, à Maurice et à La Réunion afin de mesurer l'impact de varroa sur la diversité des virus présents ainsi que sur les charges virales associées.

De manière plus pragmatique, ces travaux montrent la nécessité de pérenniser et renforcer les outils de monitoring épidémiologique dans le SOOI. Des réseaux de surveillance calqués sur le modèle de La Réunion (SEA) pourraient être étendus aux pays de la zone et notamment à Mayotte où la filière apicole est en train de se développer et de se structurer. Dans ce sens, dater et sourcer l'origine possible de varroa permettrait de pouvoir développer des outils de surveillance spécifiques pour les îles qui sont indemnes. Une vigilance spécifique doit être mise en place dans la région pour une détection précoce de *P. larvae* et enfin, pour La Réunion, Rodrigues et les Seychelles une surveillance spécifique *A. tumida* doit être mise en place.

Pour conclure, les travaux réalisés sur la zone pourraient servir de base à la constitution d'un réseau opérationnel d'acteurs de la surveillance de la santé de l'abeille, de la recherche ainsi que d'organismes techniques encadrant et structurant les filières apicoles dans la zone SOOI. Au-delà de la région, ce réseau pourrait s'ouvrir à d'autres territoires comme les autres territoires ultra-marins de France voire d'Europe.

Enfumoirs du SOOI (© Olivier Esnault)

Références bibliographiques

R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. Vienna R Found. Stat. Comput. Available http://www.R-project.org. 2014.

ABBO, P. M., KAWASAKI, J. K., HAMILTON, M., COOK, S. C., DEGRANDI-HOFFMAN, G., LI, W. F., LIU, J. & CHEN, Y. P. 2017. Effects of Imidacloprid and Varroa destructor on survival and health of European honey bees, Apis mellifera. *Insect Science,* 24**,** 467-477.

ABOU-SHAARA, H. F. 2018. Effects of two herbicides on healthy and Nosema infected honey bee workers. *Arthropods,* 7**,** 31.

AGAISSE, H. & PERRIMON, N. 2004. The roles of JAK/STAT signaling in Drosophila immune responses. *Immunological Reviews,* 198**,** 72-82.

AIKIN, R. 1897. Bees evaporated: a new malady. *Glngs Bee Cult,* 25**,** 479-480.

AKRATANAKUL, P. & BURGETT, M. 1975. Varroa jacobsoni: A prospective pest of honeybees in many parts of the world. *Bee World*.

AL-GHZAWI, A., ZAITOUN, S. & SHANNAG, H. 2009. Incidence and geographical distribution of Honeybee (Apis mellifera L.) pests in Jordan. *Ann Soc Enomol Fr,* 45**,** 305-308.

ALAUX, C., BRUNET, J. L., DUSSAUBAT, C., MONDET, F., TCHAMITCHAN, S., COUSIN, M., BRILLARD, J., BALDY, A., BELZUNCES, L. P. & LE CONTE, Y. 2010. Interactions between Nosema microspores and a neonicotinoid weaken honeybees (Apis mellifera). *Environ Microbiol,* 12**,** 774-82.

ALBURAKI, M., BERTRAND, B., LEGOUT, H., MOULIN, S., ALBURAKI, A., SHEPPARD, W. S. & GARNERY, L. 2013. A fifth major genetic group among honeybees revealed in Syria. *BMC Genetics,* 14**,** 117.

ALBURAKI, M., MOULIN, S., LEGOUT, H., ALBURAKI, A. & GARNERY, L. 2011. Mitochondrial structure of Eastern honeybee populations from Syria, Lebanon and Iraq. *Apidologie,* 42**,** 628.

ALJEDANI, D. M. & ALMEHMADI, R. M. 2016. Effects of some insecticides on longevity of the foragers honey bee worker of local honey bee race Apis mellifera jemenatica. *Electronic Physician,* 8**,** 1843-1849.

ALLEN, M. & BALL, B. 1996. The incidence and world distribution of honey bee viruses. *Bee World,* 77**,** 141-162.

ALLEN, M. F., BALL, B. V. & UNDERWOOD, B. A. 1990. An isolate of Melissococcus pluton from Apis laboriosa. *Journal of invertebrate Pathology,* 55**,** 439-440.

ALLIER, F., CHAUZAT, M. P. & VANNIER, P. 2010. Rapport de mission à l'île de la Réunion (18 au 21 Octobre 2010). ANSES, ITSAP.

ALLSOPP, M., GOVAN, V. & DAVISON, S. 1997. Bee health report: Varroa in South Africa. *Bee World,* 78**,** 171-174.

ALLSOPP, M. H. 2007. *Analysis of Varroa destructor infestation of southern African honeybee populations.* Master of Science, University of Pretoria.

AMAKPE, F., DE SMET, L., BRUNAIN, M., RAVOET, J., JACOBS, F. J., REYBROECK, W., SINSIN, B. & DE GRAAF, D. C. 2016. Discovery of Lake Sinai virus and an unusual strain of acute bee paralysis virus in West African apiaries. *Apidologie,* 47**,** 35-47.

AMDAM, G. V., HARTFELDER, K., NORBERG, K., HAGEN, A. & OMHOLT, S. W. 2004. 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.

AMENT, S. A., WANG, Y. & ROBINSON, G. E. 2010. Nutritional regulation of division of labor in honey bees: toward a systems biology perspective. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine,* 2**,** 566-576.

AMIRI, E., MEIXNER, M., NIELSEN, S. L. & KRYGER, P. 2015. Four Categories of Viral Infection Describe the Health Status of Honey Bee Colonies. *PLoS One,* 10**,** e0140272.

ANDERSON, D. L. & FUCHS, S. 1998. Two genetically distinct populations of Varroa jacobsoni with contrasting reproductive abilities on Apis mellifera. *Journal of Apicultural Research,* 37**,** 69-78.

ANDERSON, D. L. & GIACON, H. 1992. Reduced pollen collection by honey bee (Hymenoptera: Apidae) colonies infected with Nosema apis and sacbrood virus. *Journal of Economic Entomology,* 85**,** 47-51.

ANDERSON, D. L. & GIBBS, A. J. 1989. Transpuparial transmission of Kashmir bee virus and sacbrood virus in the honey bee (Apis mellifera). *Annals of applied biology,* 114**,** 1-7.

ANDERSON, D. L. & TRUEMAN, J. W. H. 2000. Varroa jacobsoni (Acari : Varroidae) is more than one species. *Experimental and Applied Acarology,* 24**,** 165-189.

ANSES 2012. Hiérarchisation de 103 maladies animales présentes dans les filières ruminants, équidés, porcs, volailles et lapins en France métropolitaine. *In:* COLLECTIVE, R. D. E. (ed.). ANSES.

ANTÚNEZ, K., ALESSANDRO, B. D., CORBELLA, E. & ZUNINO, P. 2005. Detection of Chronic bee paralysis virus and Acute bee paralysis virus in Uruguayan honeybees. *Journal of Invertebrate Pathology,* 90**,** 69-72.

ANTÚNEZ, K., ANIDO, M., BRANCHICCELA, B., HARRIET, J., CAMPA, J., INVERNIZZI, C., SANTOS, E., HIGES, M., MARTÍN-HERNÁNDEZ, R. & ZUNINO, P. 2015. Seasonal Variation of Honeybee Pathogens and its Association with Pollen Diversity in Uruguay. *Microbial Ecology,* 70**,** 522-533.

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. *Research in Veterinary Science,* 93**,** 1441-1445.

ANTUNEZ, K., D'ALESSANDRO, B., CORBELLA, E., RAMALLO, G. & ZUNINO, P. 2006. Honeybee viruses in Uruguay. *J Invertebr Pathol,* 93**,** 67-70.

ANTUNEZ, K., MARTIN-HERNANDEZ, R., PRIETO, L., MEANA, A., ZUNINO, P. & HIGES, M. 2009. Immune suppression in the honey bee (Apis mellifera) following infection by Nosema ceranae (Microsporidia). *Environ Microbiol,* 11**,** 2284-90.

ASH, C., FARROW, J. A. E., WALLBANKS, S. & COLLINS, M. D. 1991. Phylogenetic heterogeneity of the genus Bacillus revealed by comparative analysis of small-subunit-ribosomal RNA sequences. *Letters in Applied Microbiology,* 13**,** 202-206.

ASH, C., PRIEST, F. G. & COLLINS, M. D. 1993. Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. *Antonie van Leeuwenhoek,* 64**,** 253-260.

AUFAUVRE, J., BIRON, D. G., VIDAU, C., FONTBONNE, R., ROUDEL, M., DIOGON, M., VIGUES, B., BELZUNCES, L. P., DELBAC, F. & BLOT, N. 2012. Parasite-insecticide interactions: a case study of Nosema ceranae and fipronil synergy on honeybee. *Sci Rep,* 2**,** 326.

AUFAUVRE, J., MISME-AUCOUTURIER, B., VIGUES, B., TEXIER, C., DELBAC, F. & BLOT, N. 2014. Transcriptome Analyses of the Honeybee Response to Nosema ceranae and Insecticides. *PLoS One,* 9**,** e91686.

AYMÉ, A. 2014. *Synthèse des connaissances sur l'apiculture réunionnaise et enjeux pour la filière.* DVM Veterinary, Paul Sabatier.

BADIOU-BENETEAU, A., BENNEVEAU, A., GERET, F., DELATTE, H., BECKER, N., BRUNET, J. L., REYNAUD, B. & BELZUNCES, L. P. 2013. Honeybee biomarkers as promising tools to monitor environmental quality. *Environ Int,* 60**,** 31-41.

BAHREINI, R. & CURRIE, R. W. 2015. The influence of Nosema (Microspora: Nosematidae) infection on honey bee (Hymenoptera: Apidae) defense against Varroa destructor (Mesostigmata: Varroidae). *Journal of Invertebrate Pathology,* 132**,** 57-65.

BAILEY, L. 1957. The Isolation and Cultural Characteristics of Streptococcus pluton and further Observations on Bacterium eurydice. *Microbiology,* 17**,** 39-48.

BAILEY, L. 1963. The pathogenicity for honey-bee larvae of microorganisms associated with european foulbrood. *Journal of insect pathology,* 5**,** 198-205.

BAILEY, L. 1967. The incidence of virus diseases in the honey bee. *Ann Appl Biol,* 60**,** 43-8.

BAILEY, L. 1974. An unusual type of Streptococcus pluton from the Eastern hive bee. *Journal of invertebrate pathology,* 23**,** 246-247.

BAILEY, L. 1975. Recent research on honeybee viruses. *Bee World (UK)*.

BAILEY, L. & BALL, B. 1991. *Honey Bee Pathology* London, Academic Press.

BAILEY, L. & BALL, B. V. 1978. Apis iridescent virus and "clustering disease" of Apis cerana. *J Invertebr Pathol,* 31**,** 368-71.

BAILEY, L., BALL, B. V. & PERRY, J. 1983. Association of viruses with two protozoal pathogens of the honey bee. *Annals of Applied Biology,* 103**,** 13-20.

BAILEY, L., BALL, B. V. & WOODS, R. D. 1976. An iridovirus from bees. *J Gen Virol,* 31**,** 459-61.
BAILEY, L., CARPENTER, J., GOVIER, D. & WOODS, R. 1980. Bee virus Y. *Journal of General Virology,* 51**,** 405-407.
BAILEY, L., CARPENTER, J. M. & WOODS, R. D. 1979. Egypt Bee Virus and Australian Isolates of Kashmir Bee Virus. *Journal of General Virology,* 43**,** 641-647.
BAILEY, L. & COLLINS, M. D. 1982. Reclassification of 'Streptococcus pluton' (White) in a new genus Melissococcus, as Melissococcus pluton nom. rev.; comb. nov. *Journal of Applied Bacteriology,* 53**,** 215-217.
BAILEY, L., GIBBS, A. J. & WOODS, R. D. 1963. Two Viruses from Adult Honey Bees (Apis Mellifera Linnaeus). *Virology,* 21**,** 390-5.
BAILEY, L., GIBBS, A. J. & WOODS, R. D. 1964. Sacbrood virus of the larval honeybee (Apis mellifera Linnaeus). *Virology,* 23**,** 425-9.
BAILEY, L. & WOODS, R. 1977. Two more small RNA viruses from honey bees and further observations on sacbrood and acute bee-paralysis viruses. *Journal of General Virology,* 37**,** 175-182.
BAILEY, L. & WOODS, R. D. 1974. Three previously undescribed viruses from the honey bee. *J Gen Virol,* 25**,** 175-86.
BAKONYI, T., FARKAS, R., SZENDRÖI, A., DOBOS-KOVÁCS, M. & RUSVAI, M. 2002. 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**,** 63-74.
BAUER, D. M. & SUE WING, I. 2016. The macroeconomic cost of catastrophic pollinator declines. *Ecological Economics,* 126**,** 1-13.
BÉKÉSI, L., BALL, B. V., DOBOS-KOVÁCS, M., BAKONYI, T. & RUSVAI, M. 1999. OCCURRENCE OF ACUTE PARALYSIS VIRUS OF THE HONEY BEE (APIS MELLIFERA) IN A HUNGARIAN APIARY INFESTED WITH THE PARASITIC MITE VARROA JACOBSONI. *Acta Veterinaria Hungarica,* 47**,** 319-324.
BELAID, M. & DOUMANDJI, S. 2010. Effet du Varroa destructor sur la morphométrie alaire et sur les composants du système immunitaire de l'abeille ouvrière. *Apis mellifera intermissa. Lebanese Science Journal,* 11**,** 84-90.
BELAK, S., KARLSSON, O. E., BLOMSTROM, A. L., BERG, M. & GRANBERG, F. 2013. New viruses in veterinary medicine, detected by metagenomic approaches. *Vet Microbiol,* 165**,** 95-101.
BELMIN, R. 2010. *Intérêt, faisabilité et modalités de moise en place d'une Indication Géographique pour le miel de Rodrigues.* Ingeneer, Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires.
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. *Appl Environ Microbiol,* 67**,** 2384-7.
BENOIT, J. B., YODER, J. A., SAMMATARO, D. & ZETTLER, L. W. 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.
BERENYI, O., BAKONYI, T., DERAKHSHIFAR, I., KOGLBERGER, H. & NOWOTNY, N. 2006. Occurrence of six honeybee viruses in diseased Austrian apiaries. *Appl Environ Microbiol,* 72**,** 2414-20.
BERENYI, O., BAKONYI, T., DERAKHSHIFAR, I., KOGLBERGER, H., TOPOLSKA, G., RITTER, W., PECHHACKER, H. & NOWOTNY, N. 2007. Phylogenetic analysis of deformed wing virus genotypes from diverse geographic origins indicates recent global distribution of the virus. *Applied and Environmental Microbiology,* 73**,** 3605-3611.
BERNAUER, O. M., GAINES-DAY, H. R. & STEFFAN, S. A. 2015. Colonies of Bumble Bees (Bombus impatiens) Produce Fewer Workers, Less Bee Biomass, and Have Smaller Mother Queens Following Fungicide Exposure. *Insects,* 6**,** 478-488.
BERTHOUD, H., IMDORF, A., HAUETER, M., RADLOFF, S. & NEUMANN, P. 2010. Virus infections and winter losses of honey bee colonies (Apis mellifera). *Journal of Apicultural Research,* 49**,** 60-65.
BEZABIH, G., ADGABA, N., HEPBURN, H. R. & PIRK, C. W. W. 2014. The Territorial Invasion of Apis florea in Africa. *African Entomology,* 22**,** 888-890.

BIESMEIJER, J. C., ROBERTS, S. P., REEMER, M., OHLEMULLER, R., EDWARDS, M., PEETERS, T., SCHAFFERS, A. P., POTTS, S. G., KLEUKERS, R., THOMAS, C. D., SETTELE, J. & KUNIN, W. E. 2006. Parallel declines in pollinators and insect-pollinated plants in Britain and the Netherlands. *Science,* 313**,** 351-4.

BIGOT, D., DALMON, A., ROY, B., HOU, C., GERMAIN, M., ROMARY, M., DENG, S., DIAO, Q., WEINERT, L. A., COOK, J. M., HERNIOU, E. A. & GAYRAL, P. 2017. The discovery of Halictivirus resolves the Sinaivirus phylogeny. *Journal of General Virology,* 98**,** 2864-2875.

BLACKBURN, T. M., ESSL, F., EVANS, T., HULME, P. E., JESCHKE, J. M., KÜHN, I., KUMSCHICK, S., MARKOVÁ, Z., MRUGAŁA, A., NENTWIG, W., PERGL, J., PYŠEK, P., RABITSCH, W., RICCIARDI, A., RICHARDSON, D. M., SENDEK, A., VILÀ, M., WILSON, J. R. U., WINTER, M., GENOVESI, P. & BACHER, S. 2014. A Unified Classification of Alien Species Based on the Magnitude of their Environmental Impacts. *PLOS Biology,* 12**,** e1001850.

BLACKBURN, T. M., LOCKWOOD, J. L. & CASSEY, P. 2015. The influence of numbers on invasion success. *Molecular Ecology,* 24**,** 1942-1953.

BLACKBURN, T. M., PYŠEK, P., BACHER, S., CARLTON, J. T., DUNCAN, R. P., JAROŠÍK, V., WILSON, J. R. U. & RICHARDSON, D. M. 2011. A proposed unified framework for biological invasions. *Trends in Ecology & Evolution,* 26**,** 333-339.

BLACQUIÈRE, T., SMAGGHE, G., VAN GESTEL, C. A. M. & MOMMAERTS, V. 2012. Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment. *Ecotoxicology,* 21**,** 973-992.

BLANCHARD, P., CARLETTO, J., SIEDE, R., SCHURR, F., THIERY, R. & RIBIERE, M. 2014a. Identification of Kashmir bee virus in France using a new RT-PCR method which distinguishes closely related viruses. *J Virol Methods,* 198**,** 82-5.

BLANCHARD, P., GUILLOT, S., ANTUNEZ, K., KOGLBERGER, H., KRYGER, P., DE MIRANDA, J. R., FRANCO, S., CHAUZAT, M. P., THIERY, R. & RIBIERE, M. 2014b. Development and validation of a real-time two-step RT-qPCR TaqMan((R)) assay for quantitation of Sacbrood virus (SBV) and its application to a field survey of symptomatic honey bee colonies. *J Virol Methods,* 197**,** 7-13.

BLANCHARD, P., RIBIÈRE, M., CELLE, O., LALLEMAND, P., SCHURR, F., OLIVIER, V., ISCACHE, A. L. & FAUCON, J. P. 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**,** 7-13.

BLANCHARD, P., SCHURR, F., CELLE, O., COUGOULE, N., DRAJNUDEL, P., THIERY, R., FAUCON, J. P. & RIBIERE, M. 2008. First detection of Israeli acute paralysis virus (IAPV) in France, a dicistrovirus affecting honeybees (Apis mellifera). *Journal of Invertebrate Pathology,* 99**,** 348-350.

BOECKING, O. & GENERSCH, E. 2008. Varroosis – the Ongoing Crisis in Bee Keeping. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit,* 3**,** 221-228.

BORNECK, R., VIRY, A., MARTIN-HERNANDEZ, R. & HIGES, M. 2010. Honey bee colony losses in the Jura Region, France and related pathogens. *Journal of Apicultural Research,* 49**,** 334-336.

BOTIAS, C., ANDERSON, D. L., 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**,** 108-13.

BOTIAS, C., MARTIN-HERNANDEZ, R., BARRIOS, L., MEANA, A. & HIGES, M. 2013. Nosema spp. infection and its negative effects on honey bees (Apis mellifera iberiensis) at the colony level. *Vet Res,* 44**,** 25.

BOTIAS, C., MARTIN-HERNANDEZ, R., DIAS, J., GARCIA-PALENCIA, P., MATABUENA, M., JUARRANZ, A., BARRIOS, L., MEANA, A., NANETTI, A. & HIGES, M. 2012b. The effect of induced queen replacement on Nosema spp. infection in honey bee (Apis mellifera iberiensis) colonies. *Environ Microbiol,* 14**,** 845-59.

BOTIAS, C., MARTIN-HERNANDEZ, R., GARRIDO-BAILON, E., GONZALEZ-PORTO, A., MARTINEZ-SALVADOR, A., DE LA RUA, 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**,** 150-5.

BOWEN-WALKER, P., MARTIN, S. & GUNN, A. 1999. The transmission of deformed wing virus between honeybees (Apis mellifera L.) by the ectoparasitic mite Varroa jacobsoni Oud. *Journal of invertebrate pathology,* 73**,** 101-106.

BOYLE, N. K. & SHEPPARD, W. S. 2017. A scientific note on seasonal levels of pesticide residues in honey bee worker tissues. *Apidologie,* 48**,** 128-130.

BRADFORD, E. L., CHRISTIE, C. R., CAMPBELL, E. M. & BOWMAN, A. S. 2017. A real-time PCR method for quantification of the total and major variant strains of the deformed wing virus. *PLOS ONE,* 12**,** e0190017.

BRADSHAW, C. J. A., LEROY, B., BELLARD, C., ROIZ, D., ALBERT, C., FOURNIER, A., BARBET-MASSIN, M., SALLES, J.-M., SIMARD, F. & COURCHAMP, F. 2016. Massive yet grossly underestimated global costs of invasive insects. *Nature Communications,* 7**,** 12986.

BRANDT, A., GORENFLO, A., SIEDE, R., MEIXNER, M. & BÜCHLER, R. 2016. The neonicotinoids thiacloprid, imidacloprid, and clothianidin affect the immunocompetence of honey bees (Apis mellifera L.). *Journal of Insect Physiology,* 86**,** 40-47.

BREEZE, T. D., BAILEY, A. P., BALCOMBE, K. G. & POTTS, S. G. 2011. Pollination services in the UK: How important are honeybees? *Agriculture, Ecosystems & Environment,* 142**,** 137-143.

BREEZE, T. D., VAISSIÈRE, B. E., BOMMARCO, R., PETANIDOU, T., SERAPHIDES, N., KOZÁK, L., SCHEPER, J., BIESMEIJER, J. C., KLEIJN, D., GYLDENKÆRNE, S., MORETTI, M., HOLZSCHUH, A., STEFFAN-DEWENTER, I., STOUT, J. C., PÄRTEL, M., ZOBEL, M. & POTTS, S. G. 2014. Agricultural Policies Exacerbate Honeybee Pollination Service Supply-Demand Mismatches Across Europe. *PLOS ONE,* 9**,** e82996.

BRETTELL, L., MORDECAI, G., SCHROEDER, D., JONES, I., DA SILVA, J., VICENTE-RUBIANO, M. & MARTIN, S. 2017. A Comparison of Deformed Wing Virus in Deformed and Asymptomatic Honey Bees. *Insects,* 8**,** 28.

BRETTELL, L. E. & MARTIN, S. J. 2017. Oldest Varroa tolerant honey bee population provides insight into the origins of the global decline of honey bees. *Scientific Reports,* 7**,** 45953.

BRODSCHNEIDER, R. & CRAILSHEIM, K. 2010. Nutrition and health in honey bees. *Apidologie,* 41**,** 278-294.

BROMENSHENK, J. J., HENDERSON, C. B., WICK, C. H., STANFORD, M. F., ZULICH, A. W., JABBOUR, R. E., DESHPANDE, S. V., MCCUBBIN, P. E., SECCOMB, R. A., WELCH, P. M., WILLIAMS, T., FIRTH, D. R., SKOWRONSKI, E., LEHMANN, M. M., BILIMORIA, S. L., GRESS, J., WANNER, K. W. & CRAMER, R. A., JR. 2010. Iridovirus and microsporidian linked to honey bee colony decline. *PLoS One,* 5**,** e13181.

BRUTSCHER, L. M., DAUGHENBAUGH, K. F. & FLENNIKEN, M. L. 2015. Antiviral defense mechanisms in honey bees. *Curr Opin Insect Sci,* 10.

BÜCHLER, R. 1994. Varroa Tolerance in Honey Bees—Occurrence, Characters and Breeding. *Bee World,* 75**,** 54-70.

BUDGE, G. E., BARRETT, B., JONES, B., PIETRAVALLE, S., MARRIS, G., CHANTAWANNAKUL, P., THWAITES, R., HALL, J., CUTHBERTSON, A. G. S. & BROWN, M. A. 2010. The occurrence of Melissococcus plutonius in healthy colonies of Apis mellifera and the efficacy of European foulbrood control measures. *Journal of Invertebrate Pathology,* 105**,** 164-170.

BURNEY, D. A., BURNEY, L. P., GODFREY, L. R., JUNGERS, W. L., GOODMAN, S. M., WRIGHT, H. T. & JULL, A. J. T. 2004. A chronology for late prehistoric Madagascar. *Journal of Human Evolution,* 47**,** 25-63.

BURSELL, E., GOUGH, A. J. E., BEEVOR, P. S., CORK, A., HALL, D. R. & VALE, G. A. 2009. Identification of components of cattle urine attractive to tsetse flies, Glossina spp. (Diptera: Glossinidae). *Bulletin of Entomological Research,* 78**,** 281-291.

CALDERON, R. A., URENA, S. & VAN VEEN, J. W. 2012. Reproduction of Varroa destructor and offspring mortality in worker and drone brood cells of Africanized honey bees. *Experimental and Applied Acarology,* 56**,** 297-307.

CALDERONE, N. W. & KUENEN, L. P. S. 2001. Effects of Western Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Colony, Cell Type, and Larval Sex on Host Acquisition by Female Varroa destructor (Acari: Varroidae). *Journal of Economic Entomology,* 94**,** 1022-1030.

CALDERONE, N. W. & LIN, S. 2001. Behavioural responses of Varroa destructor (Acari : Varroidae) to extracts of larvae, cocoons and brood food of worker and drone honey bees, Apis mellifera (Hymenoptera : Apidae). *Physiological Entomology,* 26**,** 341-350.

CARLETTO, J., GAUTHIER, A., REGNAULT, J., BLANCHARD, P., SCHURR, F. & RIBIÈRE-CHABERT, M. 2010. Detection of main honey bee pathogens by multiplex PCR. *Euroreference,* 4**,** 13-15.

CARRECK, N. & WILLIAMS, I. 1998. The economic value of bees in the UK. *Bee World,* 79**,** 115-123.

CARRECK, N. L. 2008. Are honey bees (Apis mellifera L.) native to the British Isles? *Journal of Apicultural Research,* 47**,** 318-322.

CARRECK, N. L., BALL, B. V. & MARTIN, S. J. 2010a. The epidemiology of cloudy wing virus infections in honey bee colonies in the UK. *Journal of Apicultural Research,* 49**,** 66-71.

CARRECK, N. L., BALL, B. V. & MARTIN, S. J. 2010b. Honey bee colony collapse and changes in viral prevalence associated with Varroa destructor. *J. Apic. Res,* 49**,** 93-94.

CASTEELS, P., AMPE, C., JACOBS, F. & TEMPST, P. 1993. Functional and chemical characterization of Hymenoptaecin, an antibacterial polypeptide that is infection-inducible in the honeybee (Apis mellifera). *Journal of Biological Chemistry,* 268**,** 7044-7054.

CAVIGLI, I., DAUGHENBAUGH, K. F., MARTIN, M., LERCH, M., BANNER, K., GARCIA, E., BRUTSCHER, L. M. & FLENNIKEN, M. L. 2016. Pathogen prevalence and abundance in honey bee colonies involved in almond pollination. *Apidologie,* 47**,** 251-266.

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**,** 280-284.

CHAIMANEE, V., CHANTAWANNAKUL, P., CHEN, Y., EVANS, J. D. & PETTIS, J. S. 2012. Differential expression of immune genes of adult honey bee (Apis mellifera) after inoculated by Nosema ceranae. *J Insect Physiol,* 58**,** 1090-5.

CHAIMANEE, V., CHEN, Y., PETTIS, J. S., SCOTT CORNMAN, R. & CHANTAWANNAKUL, P. 2011. Phylogenetic analysis of Nosema ceranae isolated from European and Asian honeybees in Northern Thailand. *J Invertebr Pathol,* 107**,** 229-33.

CHAIMANEE, V., EVANS, J. D., CHEN, Y., JACKSON, C. & PETTIS, J. S. 2016. Sperm viability and gene expression in honey bee queens (Apis mellifera) following exposure to the neonicotinoid insecticide imidacloprid and the organophosphate acaricide coumaphos. *Journal of Insect Physiology,* 89**,** 1-8.

CHAIMANEE, V., WARRIT, N. & CHANTAWANNAKUL, P. 2010. Infections of Nosema ceranae in four different honeybee species. *J Invertebr Pathol,* 105**,** 207-10.

CHASKOPOULOU, A., THRASYVOULOU, A., GORAS, G., TANANAKI, C., LATHAM, M. D., KASHEFI, J., PEREIRA, R. M. & KOEHLER, P. G. 2014. Nontarget effects of aerial mosquito adulticiding with water-based unsynergized pyrethroids on honey bees and other beneficial insects in an agricultural ecosystem of north Greece. *J Med Entomol,* 51**,** 720-4.

CHAUZAT, M.-P., LAURENT, M., RIVIÈRE, M.-P., SAUGEON, C., HENDRIKX, P., RIBIÈRE-CHABERT, M. & PATHOLOGY UNIT, H. 2014. A pan-European epidemiological study on honeybee colony losses 2012-2013. 30.

CHEKE, A. S. 2015. Speculation, statistics, facts and the Dodo's extinction date. *Historical Biology,* 27**,** 624-633.

CHEMUROT, M., DE SMET, L., BRUNAIN, M., DE RYCKE, R. & DE GRAAF, D. C. 2017. Nosema neumanni n. sp. (Microsporidia, Nosematidae), a new microsporidian parasite of honeybees, Apis mellifera in Uganda. *European Journal of Protistology,* 61**,** 13-19.

CHEN, Y., EVANS, J. & FELDLAUFER, M. 2006a. Horizontal and vertical transmission of viruses in the honey bee, Apis mellifera. *J Invertebr Pathol,* 92**,** 152-9.

CHEN, Y. & EVANS, J. D. 2007. Historical presence of Israeli acute paralysis virus in the United States. *American bee journal,* 147**,** 1027-1028.

CHEN, Y., EVANS, J. D., SMITH, I. B. & PETTIS, J. S. 2008. Nosema ceranae is a long-present and wide-spread microsporidian infection of the European honey bee (Apis mellifera) in the United States. *J Invertebr Pathol,* 97**,** 186-8.

CHEN, Y., EVANS, J. D., ZHOU, L., BONCRISTIANI, H., KIMURA, K., XIAO, T., LITKOWSKI, A. M. & PETTIS, J. S. 2009. Asymmetrical coexistence of Nosema ceranae and Nosema apis in honey bees. *J Invertebr Pathol,* 101**,** 204-9.

CHEN, Y., PETTIS, J., COLLINS, A. & FELDLAUFER, M. 2006b. Prevalence and transmission of honeybee viruses. *Applied and environmental microbiology,* 72**,** 606-611.

CHEN, Y., PETTIS, J. S., CORONA, M., CHEN, W. P., LI, C. J. & SPIVAK, M. 2014. Israeli acute paralysis virus: epidemiology, pathogenesis and implications for honey bee health. *PLoS Pathog,* 10.

CHEN, Y., PETTIS, J. S., EVANS, J. D., KRAMER, M. & FELDLAUFER, M. F. 2004a. Transmission of Kashmir bee virus by the ectoparasitic mite Varroa destructor. *Apidologie,* 35**,** 441-448.

CHEN, Y., PETTIS, J. S. & FELDLAUFER, M. F. 2005. Detection of multiple viruses in queens of the honey bee Apis mellifera L. *J Invertebr Pathol,* 90**,** 118-21.

CHEN, Y., ZHAO, Y., HAMMOND, J., HSU, H. T., EVANS, J. & FELDLAUFER, M. 2004b. Multiple virus infections in the honey bee and genome divergence of honey bee viruses. *J Invertebr Pathol,* 87**,** 84-93.

CHEN, Y. P., EVANS, J. D. & PETTIS, J. S. 2011. The presence of chronic bee paralysis virus infection in honey bees (Apis mellifera L.) in the USA. *Journal of Apicultural Research,* 50**,** 85-86.

CHEN, Y. P. & HUANG, Z. Y. 2010. Nosema ceranae, a newly identified pathogen of Apis mellifera in the USA and Asia. *Apidologie,* 41**,** 364-374.

CHEN, Y. P., NAKASHIMA, N., CHRISTIAN, P. D., BAKONYI, T., BONNING, B. C., VALLES, S. M. & LIGHTNER, D. 2012a. Family--Dicistroviridae.

CHEN, Y. W., CHUNG, W. P., WANG, C. H., SOFTER, L. F. & HUANG, W. F. 2012b. Nosema ceranae infection intensity highly correlates with temperature. *Journal of Invertebrate Pathology,* 111**,** 264-267.

CHESHIRE, F. R. & CHEYNE, W. W. 1885. The Pathogenic History and History under Cultivation of a new Bacillus (B. alvei), the Cause of a Disease of the Hive Bee hitherto known as Foul Brood. *Journal of the Royal Microscopical Society,* 5**,** 581-601.

COFFIN, M. F. & RABINOWITZ, P. D. 1987. Reconstruction of Madagascar and Africa: Evidence from the Davie Fracture Zone and Western Somali Basin. *Journal of Geophysical Research: Solid Earth,* 92**,** 9385-9406.

COMBES, C. 2005. *The art of being a parasite*, University of Chicago Press.

CORE, A., RUNCKEL, C., IVERS, J., QUOCK, C., SIAPNO, T., DENAULT, S., BROWN, B., DERISI, J., SMITH, C. D. & HAFERNIK, J. 2012. A new threat to honey bees, the parasitic phorid fly Apocephalus borealis. *PLoS One,* 7**,** e29639.

CORNMAN, R. S., TARPY, D. R., CHEN, Y., JEFFREYS, L., LOPEZ, D., PETTIS, J. S., VANENGELSDORP, D. & EVANS, J. D. 2012. Pathogen webs in collapsing honey bee colonies. *PLoS One,* 7**,** e43562.

COUSIN, M., SILVA-ZACARIN, E., KRETZSCHMAR, A., EL MAATAOUI, M., BRUNET, J.-L. & BELZUNCES, L. P. 2013. Size Changes in Honey Bee Larvae Oenocytes Induced by Exposure to Paraquat at Very Low Concentrations. *PLOS ONE,* 8**,** e65693.

COX-FOSTER, D. L., CONLAN, S., HOLMES, E. C., PALACIOS, G., EVANS, J. D., MORAN, N. A., QUAN, P.-L., BRIESE, T., HORNIG, M. & GEISER, D. M. 2007a. A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science,* 318**,** 283-287.

COX-FOSTER, D. L., CONLAN, S., HOLMES, E. C., PALACIOS, G., EVANS, J. D., MORAN, N. A., QUAN, P. L., BRIESE, T., HORNIG, M., GEISER, D. M., MARTINSON, V., VANENGELSDORP, D., KALKSTEIN, A. L., DRYSDALE, A., HUI, J., ZHAI, J., CUI, L., HUTCHISON, S. K., SIMONS, J. F., EGHOLM, M., PETTIS, J. S. & LIPKIN, W. I. 2007b. A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science,* 318**,** 283-7.

CRAILSHEIM, K., SCHNEIDER, L. H. W., 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. E. 2013. *The world history of beekeeping and honey hunting*, Routledge.
CREMER, S., ARMITAGE, S. A. & SCHMID-HEMPEL, P. 2007. Social immunity. *Curr Biol,* 17**,** R693-702.
CREMONZ, T. M., DE JONG, D. & BITONDI, M. M. G. 1998. Quantification of Hemolymph Proteins as a Fast Method for Testing Protein Diets for Honey Bees (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Economic Entomology,* 91**,** 1284-1289.
CSAKI, T., HELTAI, M., MARKOLT, F., KOVACS, B., BEKESI, L., LADANYI, M., PENTEK-ZAKAR, E., MEANA, A., BOTIAS, C., MARTIN-HERNANDEZ, R. & HIGES, M. 2015. Permanent prevalence of Nosema ceranae in honey bees (Apis mellifera) in Hungary. *Acta Vet Hung,* 63**,** 358-69.
CUTLER, G. C., SCOTT-DUPREE, C. D. & DREXLER, D. M. 2014. Honey bees, neonicotinoids and bee incident reports: the Canadian situation. *Pest Management Science,* 70**,** 779-783.
DAI, P., YAN, Z., MA, S., YANG, Y., WANG, Q., HOU, C., WU, Y., LIU, Y. & DIAO, Q. 2018. The Herbicide Glyphosate Negatively Affects Midgut Bacterial Communities and Survival of Honey Bee during Larvae Reared in Vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 66**,** 7786-7793.
DAINAT, B., EVANS, J. D., CHEN, Y. P., GAUTHIER, L. & NEUMANN, P. 2012a. Predictive markers of honey bee colony collapse. *PLoS One,* 7**,** e32151.
DAINAT, B. & NEUMANN, P. 2013a. Clinical signs of deformed wing virus infection are predictive markers for honey bee colony losses. *Journal of Invertebrate Pathology,* 112**,** 278-280.
DAINAT, B. & NEUMANN, P. 2013b. Clinical signs of deformed wing virus infection are predictive markers for honey bee colony losses. *J Invertebr Pathol,* 112**,** 278-80.
DAINAT, B., VANENGELSDORP, D. & NEUMANN, P. 2012b. Colony collapse disorder in Europe. *Environ Microbiol Rep,* 4**,** 123-5.
DALMON, A., DESBIEZ, C., COULON, M., THOMASSON, M., LE CONTE, Y., ALAUX, C., VALLON, J. & MOURY, B. 2017. Evidence for positive selection and recombination hotspots in Deformed wing virus (DWV). *Scientific Reports,* 7**,** 41045.
DANFORTH, B. N., CARDINAL, S., PRAZ, C., ALMEIDA, E. A. B. & MICHEZ, D. 2013. The Impact of Molecular Data on Our Understanding of Bee Phylogeny and Evolution. *Annual Review of Entomology,* 58**,** 57-78.
DANFORTH, B. N., SIPES, S., FANG, J. & BRADY, S. G. 2006. The history of early bee diversification based on five genes plus morphology. *Proceedings of the National Academy of Sciences,* 103**,** 15118-15123.
DANKA, R. G. & VILLA, J. D. 1998. Evidence of autogrooming as a mechanism of honey bee resistance to tracheal mite infestation. *Journal of Apicultural Research,* 37**,** 39-46.
DAVISON, S., GOVAN, V., LEAT, N. & ALLSOPP, M. 1999. Bee diseases in South Africa 1: EFB, AFB, chalkbrood and bee viruses. *South African Bee Journal,* 71**,** 84-87.
DE GRAAF, D., MÉROC, E., NGUYEN, B. K., ROELANDT, S., ROELS, S., VAN DER STEDE, Y., TONNERSEN, T., KRYGER, P., JAARMA, K., KUUS, M., RAIE, A., HEINIKAINEN, S., PELKONEN, S., VÄHÄNIKKILÄ, N., ANDRIEUX, C., BALLIS, A., BARRIEU, G., BENDALI, F., BRUGOUX, C., FRANCO, S., FUENTES, A.-M., JOEL, A., LAYEC, Y., LOPEZ, J., LOZACH, A., MALHERBE-DULUC, L., MARIAU, V., MEZIANI, F., MONOD, D., MUTEL, S., OESTERLE, E., ORLOWSKI, M., PETIT, M., PILLU, P., PORET, F., VIRY, A., BERG, S., BÜCHLER, R., DE CRAIGHER, D., GENERSCH, E., KAATZ, H.-H., MEIXNER, M. D., VON DER OHE, W., OTTEN, C., ROSENKRANZ, P., SCHÄFER, M. O., SCHROEDER, A., AGIANIOTAKI, E., ARFARA, S., BOUTSINI, S., GIANNOULOPOULOU, M., HONDROU, V., KARIPIDOU, S., KATSAROS, D., KATZAGIANNAKIS, A., KIRIAKOPOULOS, A., OUREILIDIS, K., PANTELI, A., PANTOLEON, F., PAPAGIANNI, Z., PAPALEXIOU, E., PERDIKARIS, S., PRAPAS, A., SIANA, P., SKANDALAKIS, I., STOUGIOU, D., TOMAZINAKIS, I., TSALI, E., TSELIOU, E., TSIPLAKIDIS, A., TSOMPANELLIS, E., VAMVAKAS, G., VARVAROUTA, V., VOURVIDIS, D., DÁN, Á., DARÓCZI, G., LÁNG, M., PAPP, M., PAULUS, P. D., PUPP, E., SZALÓ, M., TÓTH, Á., ZSÉLI, S., BRESSAN, G., CERRONE, A., FORMATO, G., GRANATO, A., LAVAZZA, A., MACELLARI, P., MARCELLO, P., GHITTINO, C., PONTI, A. M., POSSIDENTE, R., MUTINELLI, F., NASSUATO, C., PINTORE, A., RICCHIUTI, L., RUOCCO, L.,

SALVAGGIO, A., TROIANO, P., et al. 2016. Risk indicators affecting honeybee colony survival in Europe: one year of surveillance. *Apidologie,* 47**,** 348-378.
DE GUZMAN, L. I. 2006. Some observations on the small hive beetle, Aethina tumida murray in Russian honey bee colonies. *American bee journal,* v. 146**,** pp. 618-620-2006 v.146 no.7.
DE GUZMAN, L. I. & DELFINADO-BAKER, M. 1996. A new species of Varroa (Acari: Varroidae) associated with Apis koschevnikovi (Apidae: Hymenoptera) in Borneo. *International Journal of Acarology,* 22**,** 23-27.
DE GUZMAN, L. I., FRAKE, A. M. & RINDERER, T. E. 2008a. Detection and removal of brood infested with eggs and larvae of small hive beetles (Aethina tumida Murray) by Russian honey bees. *Journal of Apicultural Research,* 47**,** 216-221.
DE GUZMAN, L. I., RINDERER, T. E. & FRAKE, A. M. 2008b. Comparative reproduction of Varroa destructor in different types of Russian and Italian honey bee combs. *Experimental and Applied Acarology,* 44**,** 227-238.
DE LA RUA, P., JAFFE, R., DALL'OLIO, R., MUNOZ, I. & SERRANO, J. 2009. Biodiversity, conservation and current threats to European honeybees. *Apidologie,* 40**,** 263-284.
DE MIRANDA, J., CORNMAN, R., EVANS, J., SEMBERG, E., HADDAD, N., NEUMANN, P. & GAUTHIER, L. 2015. Genome Characterization, Prevalence and Distribution of a Macula-Like Virus from Apis mellifera and Varroa destructor. *Viruses,* 7**,** 2789.
DE MIRANDA, J., GAUTHIER, L., RIBIERE, M. & CHEN, Y. 2012. Honey bee viruses and their effect on bee and colony health. *Honey bee colony health: Challenges and sustainable solutions***,** 71-102.
DE MIRANDA, J. R., CORDONI, G. & BUDGE, G. 2010a. The Acute bee paralysis virus-Kashmir bee virus-Israeli acute paralysis virus complex. *J Invertebr Pathol,* 103 Suppl 1**,** S30-47.
DE MIRANDA, J. R., DAINAT, B., LOCKE, B., CORDONI, G., BERTHOUD, H., GAUTHIER, L., NEUMANN, P., BUDGE, G. E., BALL, B. V. & STOLTZ, D. B. 2010b. Genetic characterization of slow bee paralysis virus of the honeybee (Apis mellifera L.). *J Gen Virol,* 91**,** 2524-30.
DE MIRANDA, J. R., DREBOT, M., TYLER, S., SHEN, M., CAMERON, C. E., STOLTZ, D. B. & CAMAZINE, S. M. 2004. Complete nucleotide sequence of Kashmir bee virus and comparison with acute bee paralysis virus. *J Gen Virol,* 85**,** 2263-70.
DE MIRANDA, J. R. & FRIES, I. 2008. Venereal and vertical transmission of deformed wing virus in honeybees (Apis mellifera L.). *J Invertebr Pathol,* 98**,** 184-9.
DE MIRANDA, J. R. & GENERSCH, E. 2010. Deformed wing virus. *J Invertebr Pathol,* 103 Suppl 1**,** S48-61.
DE RYCKE, P. H., JOUBERT, J. J., HOSSEIN HOSSEINIAN, S. & JACOBS, F. J. 2002. The possible role of Varroa destructor in the spreading of American foulbrood among apiaries. *Experimental & Applied Acarology,* 27**,** 313-318.
DE SAINTE-PALAYE, L. 1880. Dictionnaire historique de l'ancien langage françois. *Le roman en vers de très-xcellent, puissant et noble homme Girart de Rossillon, edit. Th. JA Mignard (Paris-Dijon, 1858)***,** 100.
DEGRANDI-HOFFMAN, G. & CHEN, Y. 2015. Nutrition, immunity and viral infections in honey bees. *Current Opinion in Insect Science,* 10**,** 170-176.
DEGRANDI-HOFFMAN, G., CHEN, Y., WATKINS DEJONG, E., CHAMBERS, M. L. & HIDALGO, G. 2015. Effects of Oral Exposure to Fungicides on Honey Bee Nutrition and Virus Levels. *Journal of Economic Entomology,* 108**,** 2518-2528.
DELATTE, H., PAUPY, C., DEHECQ, J. S., THIRIA, J., FAILLOUX, A. B. & FONTENILLE, D. 2008. [Aedes albopictus, vector of chikungunya and dengue viruses in Reunion Island: biology and control]. *Parasite,* 15**,** 3-13.
DELFINADO-BAKER, M. & AGGARWAL, K. 1987. A new Varroa (Acari: Varroidae) from the nest of Apis cerana (Apidae). *International Journal of Acarology,* 13**,** 233-237.
DELFINADO-BAKER, M. & BAKER, E. W. 1982. Notes on honey bee mites of the genus Acarapis hirst (Acari: Tarsonemidae). *International Journal of Acarology,* 8**,** 211-226.
DENNIS, B. & KEMP, W. P. 2016. How Hives Collapse: Allee Effects, Ecological Resilience, and the Honey Bee. *PLOS ONE,* 11**,** e0150055.

DESAI, S. D., KUMAR, S. & CURRIE, R. W. 2016. Occurrence, detection, and quantification of economically important viruses in healthy and unhealthy honey bee (Hymenoptera: Apidae) colonies in Canada. *Canadian Entomologist,* 148**,** 22-35.

DEUTSCH, C. A., TEWKSBURY, J. J., TIGCHELAAR, M., BATTISTI, D. S., MERRILL, S. C., HUEY, R. B. & NAYLOR, R. L. 2018. Increase in crop losses to insect pests in a warming climate. *Science,* 361**,** 916-919.

DEVAUCHELLE, G., ATTIAS, J., MONNIER, C., BARRAY, S., CERUTTI, M., GUERILLON, J. & ORANGE-BALANGE, N. 1985. Chilo iridescent virus. *Iridoviridae.* Springer.

DI PASQUALE, G., ALAUX, C., LE CONTE, Y., ODOUX, J.-F., PIOZ, M., VAISSIÈRE, B. E., BELZUNCES, L. P. & DECOURTYE, A. 2016. Variations in the Availability of Pollen Resources Affect Honey Bee Health. *PLOS ONE,* 11**,** e0162818.

DI PASQUALE, G., SALIGNON, M., LE CONTE, Y., BELZUNCES, L. P., DECOURTYE, A., KRETZSCHMAR, 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.

DI PRISCO, G., PENNACCHIO, F., CAPRIO, E., BONCRISTIANI, H. F., JR., EVANS, J. D. & CHEN, Y. 2011. Varroa destructor is an effective vector of Israeli acute paralysis virus in the honeybee, Apis mellifera. *J Gen Virol,* 92**,** 151-5.

DIVELY, G. P., EMBREY, M. S., KAMEL, A., HAWTHORNE, D. J. & PETTIS, J. S. 2015. Assessment of Chronic Sublethal Effects of Imidacloprid on Honey Bee Colony Health. *PLOS ONE,* 10**,** e0118748.

DIXON, P. 2003. VEGAN, a package of R functions for community ecology. *Journal of Vegetation Science,* 14**,** 927-930.

DOBSON, J. 1999. A'bee-louse'Braula schmitzi Orosi-pal (Diptera: Braulidae) new to the British Isles, and the status of Braula spp. in England and Wales. *British Journal of Entomology and Natural History (United Kingdom),* 11**,** 139-148.

DOHOO, I., MARTIN, W. & STRYHN, H. 2003. *Veterinary epidemiologic research,* Charlottetown, AVC Inc.

DOLEZAL, A. G. & TOTH, A. L. 2018. Feedbacks between nutrition and disease in honey bee health. *Current Opinion in Insect Science,* 26**,** 114-119.

DONER, L. W. 1977. The sugars of honey—A review. *Journal of the Science of Food and Agriculture,* 28**,** 443-456.

DONZÉ, G. & GUERIN, P. M. 1994. Behavioral attributes and parental care of Varroa mites parasitizing honeybee brood. *Behavioral Ecology and Sociobiology,* 34**,** 305-319.

DONZÉ, G., HERRMANN, M., BACHOFEN, B. & GUÉRIN, P. M. 1996. Effect of mating frequency and brood cell infestation rate on the reproductive success of the honeybee parasite Varroa jacobsoni. *Ecological Entomology,* 21**,** 17-26.

DORAN, D. J. 1978. The Life Cycle of Eimeria dispersa Tyzzer 1929 from the Turkey in Gallinaceous Birds. *The Journal of Parasitology,* 64**,** 882-885.

DOUBLET, V., LABARUSSIAS, M., DE MIRANDA, J. R., MORITZ, R. F. & PAXTON, R. J. 2015. Bees under stress: sublethal doses of a neonicotinoid pesticide and pathogens interact to elevate honey bee mortality across the life cycle. *Environ Microbiol,* 17**,** 969-83.

DUCARME, F., LUQUE, G. M. & COURCHAMP, F. 2013. What are “charismatic species” for conservation biologists. *BioSciences Master Reviews,* 10**,** 1-8.

DUSSAUBAT, C., MAISONNASSE, A., ALAUX, C., TCHAMITCHAN, S., BRUNET, J. L., PLETTNER, E., BELZUNCES, L. P. & LE CONTE, Y. 2010. Nosema spp. infection alters pheromone production in honey bees (Apis mellifera). *J Chem Ecol,* 36**,** 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. *J Invertebr Pathol,* 113**,** 42-51.

DYKOVÁ, I. & LOM, J. 1981. Fish coccidia: critical notes on life cycles, classification and pathogenicity. *Journal of Fish Diseases,* 4**,** 487-505.

DZIERZON, J. 1882. Rational bee-keeping. *Houlston and Sons, London*.

ELLIS, J. D. & MUNN, P. A. 2005. The worldwide health status of honey bees. *Bee World,* 86**,** 88-101.
ELLIS, J. D. & NALEN, C. Z. 2013. Bee louse, bee fly, braulid, Braula coeca Nitzsch (Insecta: Diptera: Braulidae).
ELLIS, J. J. D., NEUMANN, P., HEPBURN, R. & ELZEN, P. J. 2002. Longevity and Reproductive Success of Aethina tumida (Coleoptera: Nitidulidae) Fed Different Natural Diets. *Journal of Economic Entomology,* 95**,** 902-907.
ELLIS JR, J. D. 2002. Food for Thought: How diet affects small hive beetles. *American Bee Journal,* 142**,** 515-518.
ENGEL, M. S. 1999. The taxonomy of recent and fossil honey bees (Hymenoptera: Apidae; Apis).
ESNAULT, O., MEENOWA, D., SOOKAR, P., CHAUZAT, M.-P. & DELATTE, H. 2018. Spread and strain determination of Varroa destructor following its introduction to Mauritius and interactions with the bee louse Braula pretoriensis in honey bee colonies. *Journal of Apicultural Research***,** 1-9.
ESNAULT, O., SINELLE, J., BÈGUE, H., LESQUIN, S., REYNAUD, B. & DELATTE, H. 2014. Caractérisation de l'apiculture réunionnaise : chiffres-clés, pratique et typologie. *La santé de l'abeille,* 262**,** 325-343.
EVANS, J. D. & SCHWARZ, R. S. 2011. Bees brought to their knees: microbes affecting honey bee health. *Trends Microbiol,* 19.
EVANS, J. D. & SPIVAK, M. 2010. Socialized medicine: individual and communal disease barriers in honey bees. *J Invertebr Pathol,* 103 Suppl 1**,** S62-72.
FACON, B., GENTON, B. J., SHYKOFF, J., JARNE, P., ESTOUP, A. & DAVID, P. 2006. A general eco-evolutionary framework for understanding bioinvasions. *Trends in Ecology & Evolution,* 21**,** 130-135.
FAYE, B., LEFÈVRE, P. C., LANCELOT, R. & QUIRIN, R. 1994. *Ecopathologie animale, méthodologie, applications en milieu tropical,* Maisons-Alfort.
FAZIER, M., MULI, E., CONKLIN, T., SCHMEHL, D., TORTO, B., FRAZIER, J., TUMLINSON, J., EVANS, J. D. & RAINA, S. 2010. A scientific note on Varroa destructor found in East Africa; threat or opportunity? *Apidologie,* 41**,** 463-465.
FEDIAEVSKY, A., MARCÉ, C., DELEFOSSE, H., HENDRIKX, P., CALAVAS, D. & GUÉRIAUX, D. 2013. La catégorisation des dangers sanitaires apporte de la flexibilité et partage les responsabilités. *Bulletin épidémiologique,* 60**,** 30-32.
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. *Appl Environ Microbiol,* 75**,** 6886-9.
FERNÁNDEZ, P. G. 1999. Acarapidosis or tracheal acariosis. *Bee Disease Diagnosis,* Serie B: Etudes et recherches**,** 107-115.
FINGER, A., KETTLE, C. J., KAISER-BUNBURY, C. N., VALENTIN, T., DOUDEE, D., MATATIKEN, D. & GHAZOUL, J. 2011. Back from the brink: potential for genetic rescue in a critically endangered tree. *Molecular Ecology,* 20**,** 3773-3784.
FLETCHER, D. J. C. 1978. The African Bee, Apis Mellifera Adansonii, in Africa. *Annual Review of Entomology,* 23**,** 151-171.
FORGÁCH, P., BAKONYI, T., TAPASZTI, Z., NOWOTNY, N. & RUSVAI, M. 2008. Prevalence of pathogenic bee viruses in Hungarian apiaries: Situation before joining the European Union. *Journal of Invertebrate Pathology,* 98**,** 235-238.
FORSGREN, E. 2010. European foulbrood in honey bees. *J Invertebr Pathol,* 103 Suppl 1**,** S5-9.
FORSGREN, E., BUDGE, G. E., CHARRIERE, J. D. & HORNITZKY, M. A. Z. 2013. Standard methods for European foulbrood research. *Journal of Apicultural Research,* 52.
FORSGREN, E. & FRIES, I. 2010. Comparative virulence of Nosema ceranae and Nosema apis in individual European honey bees. *Vet Parasitol,* 170**,** 212-7.
FORSGREN, E. & FRIES, I. 2013. Temporal study of Nosema spp. in a cold climate. *Environ Microbiol Rep,* 5**,** 78-82.

FORSGREN, E., LUNDHAGEN, A. C., IMDORF, A. & FRIES, I. 2005. Distribution of Melissococcus plutonius in honeybee colonies with and without symptoms of European foulbrood. *Microb Ecol,* 50**,** 369-74.

FRANCK, P., GARNERY, L., LOISEAU, A., OLDROYD, B. P., HEPBURN, H. R., SOLIGNAC, M. & CORNUET, J. M. 2001. Genetic diversity of the honeybee in Africa: microsatellite and mitochondrial data. *Heredity,* 86**,** 420.

FREY, E., ODEMER, R., BLUM, T. & ROSENKRANZ, P. 2013. Activation and interruption of the reproduction of Varroa destructor is triggered by host signals (Apis mellifera). *J Invertebr Pathol,* 113**,** 56-62.

FRIES, I. 1993. Nosema Apis—A Parasite in the Honey Bee Colony. *Bee World,* 74**,** 5-19.

FRIES, I. 2010a. Nosema ceranae in European honey bees (Apis mellifera). *J Invertebr Pathol,* 103.

FRIES, I. 2010b. Nosema ceranae in European honey bees (Apis mellifera). *J Invertebr Pathol,* 103 Suppl 1**,** S73-9.

FRIES, I. 2014. Microsporidia. *In:* RITTER, W. (ed.) *Bee health and veterinarians.* OIE.

FRIES, I., FENG, F., DA SILVA, A., SLEMENDA, S. B. & PIENIAZEK, N. J. 1996a. 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**,** 356-365.

FRIES, I., HUAZHEN, W., WEI, S. & JIN, C., SHU 1996b. Grooming behavior and damaged mites (Varroa jacobsoni) in Apis cerana cerana and Apis mellifera ligustica. *Apidologie,* 27**,** 3-11.

FRIES, I., LINDSTROM, A. & KORPELA, S. 2006. Vertical transmission of American foulbrood (Paenibacillus larvae) in honey bees (Apis mellifera). *Vet Microbiol,* 114**,** 269-74.

FUJIYUKI, T., MATSUZAKA, E., NAKAOKA, T., TAKEUCHI, H., WAKAMOTO, A., OHKA, S., SEKIMIZU, K., NOMOTO, A. & KUBO, T. 2009. Distribution of Kakugo virus and its effects on the gene expression profile in the brain of the worker honeybee Apis mellifera L. *J Virol,* 83**,** 11560-8.

FUJIYUKI, T., OHKA, S., TAKEUCHI, H., ONO, M., NOMOTO, A. & KUBO, T. 2006. Prevalence and phylogeny of Kakugo virus, a novel insect picorna-like virus that infects the honeybee (Apis mellifera L.), under various colony conditions. *J Virol,* 80**,** 11528-38.

FUJIYUKI, T., TAKEUCHI, H., ONO, M., OHKA, S., SASAKI, T., NOMOTO, A. & KUBO, T. 2004. Novel insect picorna-like virus identified in the brains of aggressive worker honeybees. *J Virol,* 78**,** 1093-100.

GALLAI, N., SALLES, J.-M., SETTELE, J. & VAISSIÈRE, B. E. 2009. Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecological Economics,* 68**,** 810-821.

GARCIA-PALENCIA, P., MARTIN-HERNANDEZ, R., GONZALEZ-PORTO, A. V., MARIN, P., MEANA, A. & HIGES, M. 2010. Natural infection by Nosema ceranae causes similar lesions as in experimentally infected caged-worker honey bees (Apis mellifera). *Journal of Apicultural Research,* 49**,** 278-283.

GARNERY, L., CORNUET, J.-M. & SOLIGNAC, M. 1992. Evolutionary history of the honey bee Apis mellifera inferred from mitochondrial DNA analysis. *Molecular Ecology,* 1**,** 145-154.

GARRIDO-BAILON, E., BARTOLOME, C., PRIETO, L., BOTIAS, C., MARTINEZ-SALVADOR, A., MEANA, A., MARTIN-HERNANDEZ, R. & HIGES, M. 2012. The prevalence of Acarapis woodi in Spanish honey bee (Apis mellifera) colonies. *Experimental Parasitology,* 132**,** 530-536.

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. *Microbial Biotechnology,* 6**,** 731-739.

GAUTHIER, L., TENTCHEVA, D., TOURNAIRE, M., DAINAT, B., COUSSERANS, F., COLIN, M., EDOUARD & BERGOIN, M. 2007. Viral load estimation in asymptomatic honey bee colonies using the quantitative RT-PCR technique. *Apidologie,* 38**,** 426-435.

GEMECHU, G., ALEMU, S., BEZABEH, A. & BERHAN, M. 2013. Prevalence and Associated Risk Factors of Bee Lice in Holeta and its Suroundings, Ethiopia. *J Veterinar Sci Technol,* 4**,** 2.

GENERSCH, E. 2008. Paenibacillus larvae and American Foulbrood – long since known and still surprising. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit,* 3**,** 429-434.

GENERSCH, E. 2010. American Foulbrood in honeybees and its causative agent, Paenibacillus larvae. *J Invertebr Pathol,* 103 Suppl 1**,** S10-9.

GENERSCH, E., ASHIRALIEVA, A. & FRIES, I. 2005. Strain- and Genotype-Specific Differences in Virulence of Paenibacillus larvae subsp. larvae, a Bacterial Pathogen Causing American Foulbrood Disease in Honeybees. *Applied and Environmental Microbiology,* 71**,** 7551-7555.

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., YUE, C., FRIES, I. & DE MIRANDA, J. R. 2006b. Detection of Deformed wing virus, a honey bee viral pathogen, in bumble bees (Bombus terrestris and Bombus pascuorum) with wing deformities. *J Invertebr Pathol,* 91**,** 61-3.

GERARDIN, P., GUERNIER, V., PERRAU, J., FIANU, A., LE ROUX, K., GRIVARD, P., MICHAULT, A., DE LAMBALLERIE, X., FLAHAULT, A. & FAVIER, F. 2008. Estimating Chikungunya prevalence in La Reunion Island outbreak by serosurveys: two methods for two critical times of the epidemic. *BMC Infect Dis,* 8**,** 99.

GESLIN, B., GAUZENS, B., BAUDE, M., DAJOZ, I., FONTAINE, C., HENRY, M., ROPARS, L., ROLLIN, O., THÉBAULT, E. & VEREECKEN, N. J. 2017. Chapter Four - Massively Introduced Managed Species and Their Consequences for Plant–Pollinator Interactions. *In:* BOHAN, D. A., DUMBRELL, A. J. & MASSOL, F. (eds.) *Advances in Ecological Research.* Academic Press.

GHAZOUL, J. 2005. Buzziness as usual? Questioning the global pollination crisis. *Trends Ecol Evol,* 20**,** 367-73.

GHAZOUL, J. 2015. Qualifying pollinator decline evidence. *Science,* 348**,** 981-982.

GIERSCH, T., BERG, T., GALEA, F. & HORNITZKY, M. 2009. Nosema ceranae infects honey bees (Apis mellifera) and contaminates honey in Australia. *Apidologie,* 40**,** 117-123.

GIRAUDET, B., DORSEUIL, J. C. & PAYET, F. 2007. Propositions pour le développement de la filière apicole à Rodrigues. Syndicat Apicole de La Réunion.

GLINSKI, Z. & BUCZEK, K. 2003. Response of the Apoidea to fungal infections. *Apiacta,* 38**,** 183-189.

GOBLIRSCH, M., HUANG, Z. Y. & SPIVAK, M. 2013. Physiological and behavioral changes in honey bees (Apis mellifera) induced by Nosema ceranae infection. *PLoS One,* 8**,** e58165.

GOMEZ-MORACHO, T., BARTOLOME, C., BELLO, X., MARTIN-HERNANDEZ, R., HIGES, M. & MASIDE, X. 2015. Recent worldwide expansion of Nosema ceranae (Microsporidia) in Apis mellifera populations inferred from multilocus patterns of genetic variation. *Infect Genet Evol*.

GOODMAN, S. M., WILMÉ, L. & SCHÜTZ, H. 2008. *Paysages naturels et biodiversité de Madagascar*, Muséum national d'histoire naturelle.

GOULSON, D., NICHOLLS, E., BOTÍAS, C. & ROTHERAY, E. L. 2015. Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science,* 347.

GRABENSTEINER, E., RITTER, W., CARTER, M. J., DAVISON, S., PECHHACKER, H., KOLODZIEJEK, J., BOECKING, O., DERAKHSHIFAR, I., MOOSBECKHOFER, R., LICEK, E. & NOWOTNY, N. 2001. Sacbrood virus of the honeybee (Apis mellifera): rapid identification and phylogenetic analysis using reverse transcription-PCR. *Clin Diagn Lab Immunol,* 8**,** 93-104.

GRANBERG, F., VICENTE-RUBIANO, M., RUBIO-GUERRI, C., KARLSSON, O. E., KUKIELKA, D., BELAK, S. & SANCHEZ-VIZCAINO, J. M. 2013. Metagenomic detection of viral pathogens in Spanish honeybees: co-infection by Aphid Lethal Paralysis, Israel Acute Paralysis and Lake Sinai Viruses. *PLoS One,* 8**,** e57459.

GRAYSTOCK, P., BLANE, E. J., MCFREDERICK, Q. S., GOULSON, D. & HUGHES, W. O. H. 2016. Do managed bees drive parasite spread and emergence in wild bees? *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife,* 5**,** 64-75.

GRAYSTOCK, P., YATES, K., DARVILL, B., GOULSON, D. & HUGHES, W. O. 2013a. Emerging dangers: deadly effects of an emergent parasite in a new pollinator host. *J Invertebr Pathol,* 114**,** 114-9.

GRAYSTOCK, P., YATES, K., EVISON, S. E. F., DARVILL, B., GOULSON, D. & HUGHES, W. O. H. 2013b. The Trojan hives: pollinator pathogens, imported and distributed in bumblebee colonies. *Journal of Applied Ecology,* 50**,** 1207-1215.

GREGORC, A., EVANS, J. D., SCHARF, M. & ELLIS, J. D. 2012. Gene expression in honey bee (Apis mellifera) larvae exposed to pesticides and Varroa mites (Varroa destructor). *J Insect Physiol,* 58**,** 1042-9.

GRIMALDI, D. & UNDERWOOD, B. A. 1986. Megabraula, a new genus for two new species of Braulidae (Diptera), and a discussion of braulid evolution. *Systematic entomology,* 11**,** 427-438.

HAMIDA, T. B. 1999. Enemies of bees. *Options Méditerranéennes: Série B. Etudes et Recherches***,** 147-165.

HAMIDUZZAMAN, M. M., GUZMAN-NOVOA, E., GOODWIN, P. H., REYES-QUINTANA, M., KOLEOGLU, G., CORREA-BENÍTEZ, A. & PETUKHOVA, T. 2015. Differential responses of Africanized and European honey bees (Apis mellifera) to viral replication following mechanical transmission or Varroa destructor parasitism. *Journal of Invertebrate Pathology,* 126**,** 12-20.

HAN, F., WALLBERG, A. & WEBSTER, M. T. 2012. From where did the Western honeybee (Apis mellifera) originate? *Ecology and Evolution,* 2**,** 1949-1957.

HANSEN, D. M., OLESEN, J. M. & JONES, C. G. 2002. Trees, birds and bees in Mauritius: exploitative competition between introduced honey bees and endemic nectarivorous birds? *Journal of Biogeography,* 29**,** 721-734.

HARBO, J. R. & HARRIS, J. W. 2009. Responses to Varroa by honey bees with different levels of Varroa Sensitive Hygiene. *Journal of Apicultural Research,* 48**,** 156-161.

HARRIS, J. W., DANKA, R. G. & VILLA, J. D. 2010. Honey Bees (Hymenoptera: Apidae) with the Trait of Varroa Sensitive Hygiene Remove Brood with All Reproductive Stages of Varroa Mites (Mesostigmata: Varroidae). *Annals of the Entomological Society of America,* 103**,** 146-152.

HARRIS, J. W., DANKA, R. G. & VILLA, J. D. 2012. Changes in Infestation, Cell Cap Condition, and Reproductive Status of Varroa destructor (Mesostigmata: Varroidae) in Brood Exposed to Honey Bees With Varroa Sensitive Hygiene. *Annals of the Entomological Society of America,* 105**,** 512-518.

HEBERLE, H., MEIRELLES, G. V., DA SILVA, F. R., TELLES, G. P. & MINGHIM, R. 2015. InteractiVenn: a web-based tool for the analysis of sets through Venn diagrams. *BMC Bioinformatics,* 16**,** 169.

HERBERT, L. H., VAZQUEZ, D. E., ARENAS, A. & FARINA, W. M. 2014. Effects of field-realistic doses of glyphosate on honeybee appetitive behaviour. *The Journal of Experimental Biology*.

HEYNDRICKX, M., VANDEMEULEBROECKE, K., HOSTE, B., JANSSEN, P., KERSTERS, K., DE VOS, P., LOGAN, N. A., ALI, N. & BERKELEY, R. C. W. 1996. Reclassification of Paenibacillus (formerly Bacillus) pulvifaciens (Nakamura 1984) Ash et al. 1994, a Later Subjective Synonym of Paenibacillus (formerly Bacillus) larvae (White 1906) Ash et al. 1994, as a Subspecies of P. larvae, with Emended Descriptions of P. larvae as P. larvae subsp. larvae and P. larvae subsp. pulvifaciens. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology,* 46**,** 270-279.

HIGES, M., GARCIA-PALENCIA, P., MARTIN-HERNANDEZ, R. & MEANA, A. 2007. Experimental infection of Apis mellifera honeybees with Nosema ceranae (Microsporidia). *J Invertebr Pathol,* 94**,** 211-7.

HIGES, M., JUARRANZ, Á., DIAS-ALMEIDA, J., LUCENA, S., BOTÍAS, C. & MEANA, A. 2013a. Apoptosis in the pathogenesis of Nosema ceranae (Microsporidia: Nosematidae) in honey bees (Apis mellifera). *Environ Microbiol Rep,* 5.

HIGES, M., MARTIN-HERNANDEZ, R., BOTIAS, C., BAILON, E. G., GONZALEZ-PORTO, A. V., BARRIOS, L., DEL NOZAL, M. J., BERNAL, J. L., JIMENEZ, J. J., PALENCIA, P. G. & MEANA, A. 2008. How natural infection by Nosema ceranae causes honeybee colony collapse. *Environ Microbiol,* 10**,** 2659-69.

HIGES, M., MARTIN-HERNANDEZ, R., GARRIDO-BAILON, E., GONZALEZ-PORTO, A. V., GARCIA-PALENCIA, P., MEANA, A., DEL NOZAL, M. J., MAYO, R. & BERNAL, J. L. 2009. Honeybee colony collapse due to Nosema ceranae in professional apiaries. *Environ Microbiol Rep,* 1**,** 110-3.

HIGES, M., MARTIN-HERNANDEZ, R., MARTINEZ-SALVADOR, A., GARRIDO-BAILON, E., GONZALEZ-PORTO, A. V., MEANA, A., BERNAL, J. L., DEL NOZAL, M. J. & BERNAL, J. 2010a. A preliminary study of the epidemiological factors related to honey bee colony loss in Spain. *Environ Microbiol Rep,* 2**,** 243-50.

HIGES, M., MARTIN-HERNANDEZ, R. & MEANA, A. 2010b. Nosema ceranae in Europe: an emergent type C nosemosis. *Apidologie,* 41**,** 375-392.

HIGES, M., MARTIN, R. & MEANA, A. 2006. Nosema ceranae, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe. *J Invertebr Pathol,* 92**,** 93-5.

HIGES, M., MEANA, A., BARTOLOME, C., BOTIAS, C. & MARTIN-HERNANDEZ, R. 2013b. Nosema ceranae (Microsporidia), a controversial 21st century honey bee pathogen. *Environ Microbiol Rep,* 5**,** 17-29.

HOBBS, J. J. 2016. *Fundamentals of world regional geography*, Cengage Learning.

HOOD, W. 1999. Clemson University Entomology Information Series. *Clemson, South Carolina: Clemson University*.

HORNITZKY, M. A. Z. 1998. The spread of Paenibacillus larvae subsp larvae infections in an apiary. *Journal of Apicultural Research,* 37**,** 261-265.

HOSONO, S., NAKAMURA, J. & ONO, M. 2017. European honeybee defense against Japanese yellow hornet using heat generation by bee-balling behavior. *Entomological Science,* 20**,** 163-167.

HOWARD, D. F. & TSCHINKEL, W. R. 1976. Aspects of Necrophoric Behavior in the Red Imported Fire Ant, Solenopsis Invicta. *Behaviour,* 56**,** 157-178.

HUANG, W. F., JIANG, J. H., CHEN, Y. W. & WANG, C. H. 2007. A Nosema ceranae isolate from the honeybee Apis mellifera. *Apidologie,* 38**,** 30-37.

HUME, J. P. Contrasting taphofacies in ocean island settings: the fossil record of Mascarene vertebrates. Proceedings of the International Symposium" Insular Vertebrate Evolution: the Palaeontological Approach": September, 16-19 Mallorca, 2005. Societat d'Història Natural de les Balears, 129-144.

HUSSEIN, M. H. 2000. Beekeeping in Africa: I. North, East, North-East and West African countries. *Apiacta,* 1**,** 32-48.

IBAY, L. A. 1989. *Biology of the two external Acarapis species of honey bees : Acarapis dorsalis Morgenthaler and Acarapis externus Morgenthaler (Acari: Tarsonemidae).* Oregon State University.

ILYASOV, R. A., KUTUEV, I. A., PETUKHOV, A. V., POSKRYAKOV, A. V. & NIKOLENKO, A. G. 2011. Phylogenetic relationships of dark European honeybees Apis mellifera mellifera L. from the Russian Ural and West European populations. *Journal of Apicultural science,* 55**,** 67-76.

INGS, T. C., RAINE, N. E. & CHITTKA, L. 2005. Mating preference in the commercially imported bumblebee species Bombus terrestris in Britain (Hymenoptera: Apidae). *Entomologia Generalis,* 28**,** 233.

INVERNIZZI, C., ABUD, C., TOMASCO, I. H., HARRIET, J., RAMALLO, G., CAMPA, J., KATZ, H., GARDIOL, G. & MENDOZA, Y. 2009. Presence of Nosema ceranae in honeybees (Apis mellifera) in Uruguay. *J Invertebr Pathol,* 101**,** 150-3.

IQBAL, J. & MUELLER, U. 2007. Virus infection causes specific learning deficits in honeybee foragers. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences,* 274**,** 1517-1521.

IWASAKI, J. M., BARRATT, B. I. P., LORD, J. M., MERCER, A. R. & DICKINSON, K. J. M. 2015. The New Zealand experience of varroa invasion highlights research opportunities for Australia. *Ambio,* 44**,** 694-704.

JACQUES, A., LAURENT, M., CONSORTIUM, E., RIBIÈRE-CHABERT, M., SAUSSAC, M., BOUGEARD, S., BUDGE, G. E., HENDRIKX, P. & CHAUZAT, M.-P. 2017. A pan-European epidemiological study reveals honey bee colony survival depends on beekeeper education and disease control. *PLOS ONE,* 12**,** e0172591.

JACQUET, S. 2015. *Invasions biologiques et maladies émergentes en santé animale : expansion et colonisation du bassin méditerranéen par Culicoides imicola (Diptera : Ceratopogonidae), moucheron vecteur d'Orbivirus.* PhD, Université de Montpellier.

JAY, S. C. 1964. The Cocoon of the Honey Bee, Apis mellifera L. *The Canadian Entomologist,* 96**,** 784-792.

JEAN-PROST, P. & LE CONTE, Y. 2005. *Apiculture*

Connaître l'abeille - Conduire le rucher, Paris, Editions TEC & DOC.

JOHNSON, B. R. 2008. Within-nest temporal polyethism in the honey bee. *Behavioral Ecology and Sociobiology,* 62**,** 777-784.

JOHNSON, B. R., BOROWIEC, M. L., CHIU, J. C., LEE, E. K., ATALLAH, J. & WARD, P. S. 2013. Phylogenomics resolves evolutionary relationships among ants, bees, and wasps. *Curr Biol,* 23**,** 2058-62.

KAISER-BUNBURY, C. N., VALENTIN, T., MOUGAL, J., MATATIKEN, D. & GHAZOUL, J. 2011. The tolerance of island plant–pollinator networks to alien plants. *Journal of Ecology,* 99**,** 202-213.

KAJOBE, R., MARRIS, G., BUDGE, G., LAURENSON, L., CORDONI, G., JONES, B., WILKINS, S., CUTHBERTSON, A. G. S. & BROWN, M. A. 2010. First molecular detection of a viral pathogen in Ugandan honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology,* 104**,** 153-156.

KATZNELSON, H. 1950. BACILLUS PULVIFACIENS (N. SP.), AN ORGANISM ASSOCIATED WITH POWDERY SCALE OF HONEYBEE LARVAE. *Journal of Bacteriology,* 59**,** 153-155.

KAWASAKI, T. & KAWAI, T. 2014. Toll-Like Receptor Signaling Pathways. *Frontiers in Immunology,* 5.

KEANE, R. M. & CRAWLEY, M. J. 2002. Exotic plant invasions and the enemy release hypothesis. *Trends in Ecology & Evolution,* 17**,** 164-170.

KENNEDY, A. D. & DELEO, F. R. 2009. Neutrophil apoptosis and the resolution of infection. *Immunologic Research,* 43**,** 25-61.

KING, A. M., LEFKOWITZ, E., ADAMS, M. J. & CARSTENS, E. B. 2011. *Virus taxonomy: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, Elsevier.

KIRK, P., CANNON, P., MINTER, D. & STALPERS, J. 2008. Dictionary of the Fungi CABI. *Wallingford, UK,* 396.

KLEE, J., BESANA, A. M., GENERSCH, E., GISDER, S., NANETTI, A., TAM, D. Q., CHINH, T. X., PUERTA, F., RUZ, J. M., KRYGER, P., MESSAGE, D., HATJINA, F., KORPELA, S., FRIES, I. & PAXTON, R. J. 2007. Widespread dispersal of the microsporidian Nosema ceranae, an emergent pathogen of the western honey bee, Apis mellifera. *J Invertebr Pathol,* 96**,** 1-10.

KNOP, E. & REUSSER, N. 2012. Jack-of-all-trades: phenotypic plasticity facilitates the invasion of an alien slug species. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*.

KOCH, H., CISAROVSKY, G. & SCHMID-HEMPEL, P. 2012. Ecological effects on gut bacterial communities in wild bumblebee colonies. *J Anim Ecol,* 81**,** 1202-10.

KOELLA, J. C., SØRENSEN, F. L. & ANDERSON, R. A. 1998. The malaria parasite, Plasmodium falciparum, increases the frequency of multiple feeding of its mosquito vector, Anopheles gambiae. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences,* 265**,** 763-768.

KOJIMA, Y., TOKI, T., MORIMOTO, T., YOSHIYAMA, M., KIMURA, K. & KADOWAKI, T. 2011. Infestation of Japanese Native Honey Bees by Tracheal Mite and Virus from Non-native European Honey Bees in Japan. *Microbial Ecology,* 62**,** 895-906.

KRALJ, J., BROCKMANN, A., FUCHS, S. & TAUTZ, J. 2007. The parasitic mite Varroa destructor affects non-associative learning in honey bee foragers, Apis mellifera L. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol,* 193**,** 363-70.

KRALJ, J. & FUCHS, S. 2006. Parasitic *Varroa destructor* mites influence flight duration and homing ability of infested *Apis mellifera* foragers. *Apidologie,* 37**,** 577-587.

KRUITWAGEN, A., VAN LANGEVELDE, F., VAN DOOREMALEN, C. & BLACQUIÈRE, T. 2017. Naturally selected honey bee (Apis mellifera) colonies resistant to Varroa destructor do not groom more intensively. *Journal of Apicultural Research,* 56**,** 354-365.

KUMAR, S., NEI, M., DUDLEY, J. & TAMURA, K. 2008. MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings in bioinformatics,* 9**,** 299-306.

KWADHA, C. A., ONG'AMO, G. O., NDEGWA, P. N., RAINA, S. K. & FOMBONG, A. T. 2017. The Biology and Control of the Greater Wax Moth, Galleria mellonella. *Insects,* 8**,** 61.

KWONG, W. K. & MORAN, N. A. 2016. Gut microbial communities of social bees. *Nature Reviews Microbiology,* 14**,** 374.

LAL, K., BROMLEY, E., OAKES, R., PRIETO, J. H., SANDERSON, S. J., KURIAN, D., HUNT, L., YATES, J. R., WASTLING, J. M., SINDEN, R. E. & TOMLEY, F. M. 2009. Proteomic comparison of four Eimeria tenella life-cycle stages: Unsporulated oocyst, sporulated oocyst, sporozoite and second-generation merozoite. *PROTEOMICS,* 9**,** 4566-4576.

LANZI, G., DE MIRANDA, J. R., BONIOTTI, M. B., CAMERON, C. E., LAVAZZA, A., CAPUCCI, L., CAMAZINE, S. M. & ROSSI, C. 2006. Molecular and Biological Characterization of Deformed Wing Virus of Honeybees (Apis mellifera L.). *Journal of Virology,* 80**,** 4998-5009.

LATREILLE, P. A. 1804. Notice des espèces d'abeilles vivant en grande sociétée, ou d'abeilles proprement dites, et description d'espèces nouvelles. *Annales du Muséum National d'Histoire Naturelle,* 5**,** 161-178.

LAURENT, M., HENDRIKX, P., RIBIÈRE-CHABERT, M. & CHAUZAT, M. P. 2015. EPILOBEE - A pan-European epidemiological study on honeybee colony losses 2012-2014. Brussels: European Union.

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 PECHON, T., BAIDER, C., GIGORD, L. D. B., HAEVERMANS, A. & DUBUISSON, J. Y. 2011. *Dombeya sevathianii* (Malvaceae): A new critically endangered species endemic to Mauritius (Indian Ocean). *2011,* 24**,** 10.

LE PÉCHON, T., SANCHEZ, M., HUMEAU, L., GIGORD, L. D. B. & ZHANG, L.-B. 2013. Vertebrate pollination of the endemic Trochetia granulata (Malvaceae) on Réunion. *Journal of Tropical Ecology,* 29**,** 353-356.

LE RU, B. P., ONG'AMO, G. O., MOYAL, P., NGALA, L., MUSYOKA, B., ABDULLAH, Z., CUGALA, D., DEFABACHEW, B., HAILE, T. A., MATAMA, T. K., LADA, V. Y., NEGASSI, B., PALLANGYO, K., RAVOLONANDRIANINA, J., SIDUMO, A., OMWEGA, C. O., SCHULTHESS, F., CALATAYUD, P. A. & SILVAIN, J. F. 2007. Diversity of lepidopteran stem borers on monocotyledonous plants in eastern Africa and the islands of Madagascar and Zanzibar revisited. *Bulletin of Entomological Research,* 96**,** 555-563.

LÊ, S., JOSSE, J. & HUSSON, F. 2008. FactoMineR: an R package for multivariate analysis. *Journal of statistical software,* 25**,** 1-18.

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. *Journal of General Virology,* 81**,** 2111-2119.

LEE, K. V., MOON, R. D., BURKNESS, E. C., HUTCHISON, W. D. & SPIVAK, M. 2010. Practical Sampling Plans for <I>Varroa destructor</I> (Acari: Varroidae) in <I>Apis mellifera</I> (Hymenoptera: Apidae) Colonies and Apiaries. *Journal of Economic Entomology,* 103**,** 1039-1050.

LEE, K. V., STEINHAUER, N., RENNICH, K., WILSON, M. E., TARPY, D. R., CARON, D. M., ROSE, R., DELAPLANE, K. S., BAYLIS, K. & LENGERICH, E. J. 2015. A national survey of managed honey bee 2013-2014 annual colony losses in the USA: results from the Bee Informed Partnership.

LEES, D. C., KREMEN, C. & ANDRIAMAMPIANINA, L. 1999. A null model for species richness gradients: bounded range overlap of butterflies and other rainforest endemics in Madagascar. *Biological Journal of the Linnean Society,* 67**,** 529-584.

LEVER, J. J., NES, E. H., SCHEFFER, M. & BASCOMPTE, J. 2014. The sudden collapse of pollinator communities. *Ecology Letters,* 17**,** 350-359.

LI, B., HOU, C., DENG, S., ZHANG, X., CHU, Y., YUAN, C. & DIAO, Q. 2016. First Complete Genome Sequence of Chronic Bee Paralysis Virus Isolated from Honey Bees (Apis mellifera) in China. *Genome Announcements,* 4**,** e00618-16.

LLORENS-PICHER, M., HIGES, M., MARTÍN-HERNÁNDEZ, R., DE LA RÚA, P., MUÑOZ, I., AIDOO, K., BEMPONG, E. O., POLKURAF, F. & MEANA, A. 2017. Honey bee pathogens in Ghana and the presence of contaminated beeswax. *Apidologie,* 48**,** 732-742.

LOCKE, B. 2016. Natural Varroa mite-surviving Apis mellifera honeybee populations. *Apidologie,* 47**,** 467-482.

LOCKE, B., CONTE, Y. L., CRAUSER, D. & FRIES, I. 2012. Host adaptations reduce the reproductive success of Varroa destructor in two distinct European honey bee populations. *Ecology and Evolution,* 2**,** 1144-1150.

LOCKE, B. & FRIES, I. 2011. Characteristics of honey bee colonies (Apis mellifera) in Sweden surviving Varroa destructor infestation. *Apidologie,* 42**,** 533-542.

LOCKWOOD, J. L., CASSEY, P. & BLACKBURN, T. 2005. The role of propagule pressure in explaining species invasions. *Trends in Ecology & Evolution,* 20**,** 223-228.

LOCKWOOD, J. L., HOOPES, M. F. & MARCHETTI, M. P. 2013. *Invasion ecology*, John Wiley & Sons.

MADL, M. 2006. *Notes on Hymenoptera from Aride Island (Republic of Seychelles)*, na.

MADL, M. 2013. New records of Hymenoptera from Bird (Republic of Seychelles). *Phelsuma,* 21**,** 65-67.

MAGGI, M., ANTÚNEZ, K., INVERNIZZI, C., ALDEA, P., VARGAS, M., NEGRI, P., BRASESCO, C., DE JONG, D., MESSAGE, D., TEIXEIRA, E. W., PRINCIPAL, J., BARRIOS, C., RUFFINENGO, S., DA SILVA, R. R. & EGUARAS, M. 2016. Honeybee health in South America. *Apidologie,* 47**,** 835-854.

MAGGI, M., PERALTA, L., RUFFINENGO, S., FUSELLI, S. & EGUARAS, M. 2012. Body size variability of Varroa destructor and its role in acaricide tolerance. *Parasitol Res,* 110**,** 2333-40.

MAGNANOU, E. 2005. *Micromammifères, helminthes et insularité : évolution des traits d'histoire de vie du rat noir (Muridae) et de deux musaraignes (Crocidurinae) sur les îles ouest-méditerranéennes.* PhD, Montpellier.

MAHIEU, M. 2014. *Gestion du parasitisme gastro-intestinal des petits ruminants en zone tropicale humide.* PhD PhD, Université de Lorraine.

MANDONNET, N., AUMONT, G., FLEURY, J., GRUNER, L., BOUIX, J. & VU TIEN KHANG, J. 1996. Genetic Variability in Resistance of Creole Goats to Natural Infection with Trichostrongylids in Guadeloupe a. *Annals of the New York Academy of Sciences,* 791**,** 421-431.

MAO, W., SCHULER, M. A. & BERENBAUM, M. R. 2017. Disruption of quercetin metabolism by fungicide affects energy production in honey bees (Apis mellifera). *Proceedings of the National Academy of Sciences,* 114**,** 2538-2543.

MAORI, E., LAVI, S., MOZES-KOCH, R., GANTMAN, Y., PERETZ, Y., EDELBAUM, O., TANNE, E. & SELA, I. 2007. 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**,** 3428-38.

MARTEL, A. C., ZEGGANE, S., DRAJNUDEL, P., FAUCON, J. P. & AUBERT, M. 2006. Tetracycline residues in honey after hive treatment. *Food Addit Contam,* 23**,** 265-73.

MARTIN-HERNANDEZ, R., BOTIAS, C., BAILON, E. G., MARTINEZ-SALVADOR, A., PRIETO, L., MEANA, A. & HIGES, M. 2012. Microsporidia infecting Apis mellifera: coexistence or competition. Is Nosema ceranae replacing Nosema apis? *Environ Microbiol,* 14**,** 2127-38.

MARTIN-HERNANDEZ, R., MEANA, A., PRIETO, L., SALVADOR, A. M., GARRIDO-BAILON, E. & HIGES, M. 2007. Outcome of colonization of Apis mellifera by Nosema ceranae. *Appl Environ Microbiol,* 73**,** 6331-8.

MARTIN, S. 1998. A population model for the ectoparasitic mite Varroa jacobsoni in honey bee (Apis mellifera) colonies. *Ecological Modelling,* 109**,** 267-281.

MARTIN, S. J. 2004. Acarcide (pyrethroid) resistance in Varroa destructor. *Bee World,* 85**,** 67-69.

MARTIN, S. J. & BAYFIELD, J. 2014. Is the bee louse Braula coeca (Diptera) using chemical camouflage to survive within honeybee colonies? *Chemoecology,* 24**,** 165-169.

MARTIN, S. J., HARDY, J., VILLALOBOS, E., MARTIN-HERNANDEZ, R., NIKAIDO, S. & HIGES, M. 2013. Do the honeybee pathogens Nosema ceranae and deformed wing virus act synergistically? *Environ Microbiol Rep,* 5**,** 506-10.

MARTIN, S. J., HIGHFIELD, A. C., BRETTELL, L., VILLALOBOS, E. M., BUDGE, G. E., POWELL, M., NIKAIDO, S. & SCHROEDER, D. C. 2012. Global honey bee viral landscape altered by a parasitic mite. *Science,* 336**,** 1304-6.

MARTINEZ, J., LEAL, G. & CONGET, P. 2012. Nosema ceranae an emergent pathogen of Apis mellifera in Chile. *Parasitol Res,* 111**,** 601-7.

MATHESON, A. 1994. The impact of Varroa infestation on beekeeping.

MAYR, E. 1970. *Populations, species, and evolution: an abridgment of animal species and evolution*, Harvard University Press.

MAZZEI, M., CARROZZA, M. L., LUISI, E., FORZAN, M., GIUSTI, M., SAGONA, S., TOLARI, F. & FELICIOLI, A. 2014. Infectivity of DWV Associated to Flower Pollen: Experimental Evidence of a Horizontal Transmission Route. *PLOS ONE,* 9**,** e113448.

MCDOUGALL, I. 1965. A geological reconnaissance of Rodriguez island, Indian ocean. *Nature,* 206**,** 26-27.

MCDOUGALL, I. 1971. The geochronology and evolution of the young volcanic island of Réunion, Indian Ocean. *Geochimica et Cosmochimica Acta,* 35**,** 261-288.

MCDOUGALL, I. & CHAMALAUN, F. H. 1969. Isotopic dating and geomagnetic polarity studies on volcanic rocks from Mauritius, Indian Ocean. *Geological Society of America Bulletin,* 80**,** 1419-1442.

MCMENAMIN, A., DAUGHENBAUGH, K., PAREKH, F., PIZZORNO, M. & FLENNIKEN, M. 2018. Honey Bee and Bumble Bee Antiviral Defense. *Viruses,* 10**,** 395.

MCMENAMIN, A. J., BRUTSCHER, L. M., GLENNY, W. & FLENNIKEN, M. L. 2016. Abiotic and biotic factors affecting the replication and pathogenicity of bee viruses. *Current Opinion in Insect Science,* 16**,** 14-21.

MCMENAMIN, A. J. & GENERSCH, E. 2015a. Honey bee (Apis mellifera) colony losses and associated viruses. *Current Opinion in Insect Science*.

MCMENAMIN, A. J. & GENERSCH, E. 2015b. Honey bee colony losses and associated viruses. *Curr Opin Insect Sci,* 8.

MEANA, A., LLORENS-PICHER, M., EUBA, A., BERNAL, J. L., BERNAL, J., GARCÍA-CHAO, M., DAGNAC, T., CASTRO-HERMIDA, J. A., GONZALEZ-PORTO, A. V., HIGES, M. & MARTÍN-HERNÁNDEZ, R. 2017. Risk factors associated with honey bee colony loss in apiaries in Galicia, NW Spain. *2017,* 15.

MEEUS, S., JACQUEMYN, H., HONNAY, O. & PAILLER, T. 2011. Self-incompatibility and pollen limitation in the rare tristylous endemic Hugonia serrata on La Réunion Island. *Plant Systematics and Evolution,* 292**,** 143-151.

MEIKLE, W. G., PATT, J. M. & SAMMATARO, D. 2012. Intraspecific Competition Effects on Aethina tumida (Coleoptera: Nitidulidae). *Journal of Economic Entomology,* 105**,** 26-33.

MEIXNER, M. D., LETA, M. A., KOENIGER, N. & FUCHS, S. 2011. The honey bees of Ethiopia represent a new subspecies of Apis mellifera—Apis mellifera simensis n. ssp. *Apidologie,* 42**,** 425-437.

MICHENER, C. D. 1969. Comparative Social Behavior of Bees. *Annual Review of Entomology,* 14**,** 299-342.

MICHENER, C. D. 2000. *The bees of the world*, JHU press.

MILUM, V. G. 1947. *Grooming Dance of the Honeybee Colony*, Illinois Academy of Science.

MINGXIAO, M., MING, L., JIAN, C., SONG, Y., SHUDE, W. & PENGFEI, L. 2011. Molecular and Biological Characterization of Chinese Sacbrood Virus LN Isolate. *Comp Funct Genomics,* 2011**,** 409386.

MITCHELL, C. E., AGRAWAL, A. A., BEVER, J. D., GILBERT, G. S., HUFBAUER, R. A., KLIRONOMOS, J. N., MARON, J. L., MORRIS, W. F., PARKER, I. M. & POWER, A. G. 2006. Biotic interactions and plant invasions. *Ecology letters,* 9**,** 726-740.

MITCHELL, E. A. D., MULHAUSER, B., MULOT, M., MUTABAZI, A., GLAUSER, G. & AEBI, A. 2017. A worldwide survey of neonicotinoids in honey. *Science,* 358**,** 109-111.

MITTERMEIER, R. A., TURNER, W. R., LARSEN, F. W., BROOKS, T. M. & GASCON, C. 2011. Global Biodiversity Conservation: The Critical Role of Hotspots. *In:* ZACHOS, F. E. & HABEL, J. C. (eds.) *Biodiversity Hotspots: Distribution and Protection of Conservation Priority Areas.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

MOLINERI, A., GIACOBINO, A., PACINI, A., BULACIO CAGNOLO, N., MERKE, J., ORELLANO, E., BERTOZZI, E., ZAGO, L., AIGNASSE, A., PIETRONAVE, H., RODRÍGUEZ, G., CRISANTI, P., PALACIO, M. A. & SIGNORINI, M. 2018. Environment and Varroa destructor management as determinant of colony losses in apiaries under temperate and subtropical climate. *Journal of Apicultural Research*, 1-14.

MONAGHAN, M. T., WILD, R., ELLIOT, M., FUJISAWA, T., BALKE, M., INWARD, D. J. G., LEES, D. C., RANAIVOSOLO, R., EGGLETON, P., BARRACLOUGH, T. G. & VOGLER, A. P. 2009. Accelerated Species Inventory on Madagascar Using Coalescent-Based Models of Species Delineation. *Systematic Biology,* 58**,** 298-311.

MONDET, F., DE MIRANDA, J. R., KRETZSCHMAR, A., LE CONTE, Y. & MERCER, A. R. 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**,** e1004323.

MONDET, F., KIM, S. H., DE MIRANDA, J. R., BESLAY, D., LE CONTE, Y. & MERCER, A. R. 2016. Specific Cues Associated With Honey Bee Social Defence against Varroa destructor Infested Brood. *Scientific Reports,* 6**,** 25444.

MONTAGGIONI, L. 1976. Histoire géologique des récifs coralliens de l 'archipel des Mascareignes. *Biologie marine et exploitation des ressources de l 'océan Indien occidental. ORSTOM, Paris, Travaux et Documents de l 'ORSTOM,* 47**,** 113-128.

MOORE, J., JIRONKIN, A., CHANDLER, D., BURROUGHS, N., EVANS, D. J. & RYABOV, E. V. 2011a. Recombinants between Deformed wing virus and Varroa destructor virus-1 may prevail in Varroa destructor-infested honeybee colonies. *J Gen Virol,* 92**,** 156-61.

MOORE, J., WHITE, W. M., PAUL, D., DUNCAN, R. A., ABOUCHAMI, W. & GALER, S. J. G. 2011b. Evolution of shield-building and rejuvenescent volcanism of Mauritius. *Journal of Volcanology and Geothermal Research,* 207**,** 47-66.

MORDECAI, G. J., WILFERT, L., MARTIN, S. J., JONES, I. M. & SCHROEDER, D. C. 2016. Diversity in a honey bee pathogen: first report of a third master variant of the Deformed Wing Virus quasispecies. *The ISME Journal,* 10**,** 1264-1273.

MORENS, D. M., FOLKERS, G. K. & FAUCI, A. S. 2008. Emerging infections: a perpetual challenge. *The Lancet Infectious Diseases,* 8**,** 710-719.

MORITZ, R. F. A. & HÄNEL, H. 1984. Restricted development of the parasitic mite Varroa jacobsoni Oud. in the Cape honeybee Apis mellifera capensis Esch.1. *Zeitschrift für Angewandte Entomologie,* 97**,** 91-95.

MORSE, S. S. 2001. Factors in the Emergence of Infectious Diseases. *In:* PRICE-SMITH, A. T. (ed.) *Plagues and Politics: Infectious Disease and International Policy.* London: Palgrave Macmillan UK.

MORTENSEN, A. N., JACK, C. J. & ELLIS, J. D. 2018. The discovery of Varroa destructor on drone honey bees, Apis mellifera, at drone congregation areas. *Parasitology Research,* 117**,** 3337-3339.

MORTENSEN, A. N., SCHMEHL, D. R., ALLSOPP, M., BUSTAMANTE, T. A., KIMMEL, C. B., DYKES, M. E. & ELLIS, J. D. 2016. Differences in Varroa destructor infestation rates of two indigenous subspecies of Apis mellifera in the Republic of South Africa. *Exp Appl Acarol,* 68**,** 509-15.

MORTENSEN, A. N., SCHMEHL, D. R. & ELLIS JR, J. D. 2013. European Honey Bee *Apis mellifera* Linnaeus and subspecies (Insecta: Hymenoptera: Apidae)1. University of Florida.

MORTON, J., BALL, R., BROWN, M. & WILKINS, S. 2005. Managing Varroa. *Department for Environment, Food and Rural Affairs-Central Science Laboratory, London, UK*.

MOTTA, E. V. S., RAYMANN, K. & MORAN, N. A. 2018. Glyphosate perturbs the gut microbiota of honey bees. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.

MULI, E., KILONZO, J., DOGLEY, N., MONTHY, G., KURGAT, J., IRUNGU, J. & RAINA, S. 2018. Detection of Pesticide Residues in Selected Bee Products of Honeybees (Apis melllifera L.) Colonies in a Preliminary Study from Seychelles Archipelago. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology,* 101**,** 451-457.

MULI, E., PATCH, H., FRAZIER, M., FRAZIER, J., TORTO, B., BAUMGARTEN, T., KILONZO, J., KIMANI, J. N., MUMOKI, F., MASIGA, D., TUMLINSON, J. & GROZINGER, C. 2014. Evaluation of the Distribution

and Impacts of Parasites, Pathogens, and Pesticides on Honey Bee (Apis mellifera) Populations in East Africa. *PLoS One,* 9**,** e94459.
MUMBI, C. T., MWAKATOBE, A. R., MPINGA, I. H., RICHARD, A. & MACHUMU, R. 2014. Parasitic mite, Varroa species (Parasitiformes: Varroidae) infesting the colonies of African honeybees, Apis mellifera scutellata (Hymenoptera: Apididae) in Tanzania. *J. Entomol. Zool. Stud,* 2**,** 188-196.
MUMOKI, F., FOMBONG, A., MULI, E., MUIGAI, A. & MASIGA, D. 2014. An inventory of documented diseases of African honeybees. *African Entomology,* 22**,** 473-487.
MUNOZ, I., CEPERO, A., PINTO, M. A., MARTIN-HERNANDEZ, R., HIGES, M. & DE LA RUA, P. 2014. Presence of Nosema ceranae associated with honeybee queen introductions. *Infect Genet Evol,* 23C**,** 161-168.
MUSSEN, E. C., LOPEZ, J. E. & PENG, C. Y. S. 2004. Effects of Selected Fungicides on Growth and Development of Larval Honey Bees, Apis mellifera L. (Hymenoptera: Apidae). *Environmental Entomology,* 33**,** 1151-1154.
MUTINELLI, F. 2011. The spread of pathogens through trade in honey bees and their products (including queen bees and semen): overview and recent developments. *Rev Sci Tech,* 30**,** 257-71.
MUTINELLI, F. B., A.; PIRO, R. 2002. OIE and UE regulations governing international trade and community exchanges of bees and bee products. *In:* JONES, R. B. (ed.) *Bees without frontiers: Sixth European Bee Conference, Cardiff, UK, 1-5 July 2002.* Cardiff.
MUZ, D. & MUZ, M. N. 2018. A molecular epidemiological study of black queen cell virus in honeybees (Apis mellifera) of Turkey: the first genetic characterization and phylogenetic analysis of field viruses. *Apidologie,* 49**,** 89-100.
MYERS, N., MITTERMEIER, R. A., MITTERMEIER, C. G., DA FONSECA, G. A. & KENT, J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature,* 403**,** 853-8.
NACKLEY, L. L., WEST, A. G., SKOWNO, A. L. & BOND, W. J. 2017. The Nebulous Ecology of Native Invasions. *Trends in Ecology & Evolution,* 32**,** 814-824.
NAGAMITSU, T., YAMAGISHI, H., KENTA, T., INARI, N. & KATO, E. 2010. Competitive effects of the exotic Bombus terrestris on native bumble bees revealed by a field removal experiment. *Population Ecology,* 52**,** 123-136.
NATHAN, C. & SHILOH, M. U. 2000. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences,* 97**,** 8841-8848.
NAVAJAS, M., ANDERSON, D. L., DE GUZMAN, L. I., HUANG, Z. Y., CLEMENT, J., ZHOU, T. & LE CONTE, Y. 2010. New Asian types of Varroa destructor: a potential new threat for world apiculture. *Apidologie,* 41**,** 181-193.
NAZZI, F., BROWN, S. P., ANNOSCIA, D., DEL PICCOLO, F., DI PRISCO, G., VARRICCHIO, P., DELLA VEDOVA, G., CATTONARO, F., CAPRIO, E. & PENNACCHIO, F. 2012. Synergistic parasite-pathogen interactions mediated by host immunity can drive the collapse of honeybee colonies. *PLoS Pathog,* 8**,** e1002735.
NAZZI, F. & LE CONTE, Y. 2016. Ecology of Varroa destructor, the major ectoparasite of the western honey bee, Apis mellifera. *Annu Rev Entomol Annu Rev,* 61.
NAZZI, F. & PENNACCHIO, F. 2014. Disentangling multiple interactions in the hive ecosystem. *Trends in Parasitology,* 30**,** 556-561.
NAZZI, F. & PENNACCHIO, F. 2018. Honey Bee Antiviral Immune Barriers as Affected by Multiple Stress Factors: A Novel Paradigm to Interpret Colony Health Decline and Collapse. *Viruses,* 10**,** 159.
NEUMANN, P. & CARRECK, N. L. 2010. Honey bee colony losses. *Journal of Apicultural Research,* 49**,** 1-6.
NEUMANN, P. & ELZEN, P. J. 2004. The biology of the small hive beetle (Aethina tumida, Coleoptera: Nitidulidae): Gaps in our knowledge of an invasive species. *Apidologie,* 35**,** 229-247.
NEUMANN, P., NAEF, J., CRAILSHEIM, K., CREWE, R. M. & PIRK, C. W. W. 2015. Hit-and-run trophallaxis of small hive beetles. *Ecology and Evolution,* 5**,** 5478-5486.

NEUMANN, P., PETTIS, J. S. & SCHÄFER, M. O. 2016. Quo vadis Aethina tumida? Biology and control of small hive beetles. *Apidologie,* 47**,** 427-466.

NEUMANN, P., PIRK, C., HEPBURN, H., SOLBRIG, A., RATNIEKS, F., ELZEN, P. & BAXTER, J. 2001. Social encapsulation of beetle parasites by Cape honeybee colonies (Apis mellifera capensis Esch.). *Naturwissenschaften,* 88**,** 214-216.

NGANSO, B. T., FOMBONG, A. T., YUSUF, A. A., PIRK, C. W. W., STUHL, C. & TORTO, B. 2017. Hygienic and grooming behaviors in African and European honeybees—New damage categories in Varroa destructor. *PLOS ONE,* 12**,** e0179329.

NGANSO, B. T., FOMBONG, A. T., YUSUF, A. A., PIRK, C. W. W., STUHL, C. & TORTO, B. 2018. Low fertility, fecundity and numbers of mated female offspring explain the lower reproductive success of the parasitic mite Varroa destructor in African honeybees. *Parasitology,* 145**,** 1633-1639.

NICOLSON, S. W. & HUMAN, H. 2008. Bees get a head start on honey production. *Biology Letters,* 4**,** 299-301.

NOIRETERRE, P. 2011. Biologie et Pathogénie de Varroa destructor. *Bulletin des GTV,* 62**,** 101-106.

NORDSTROM, S. 2003. Distribution of deformed wing virus within honey bee (Apis mellifera) brood cells infested with the ectoparasitic mite Varroa destructor. *Experimental and Applied Acarology,* 29**,** 293-302.

ODDIE, M. A. Y., DAHLE, B. & NEUMANN, P. 2017. Norwegian honey bees surviving Varroa destructor mite infestations by means of natural selection. *PeerJ,* 5**,** e3956.

OIE 2012. Varoosis of honey bees. *In:* EPIZOOTIES, O. I. D. (ed.) *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals.* Paris: Office International des Epizooties.

OIE 2013. Nosemosis of Honey Bees. *In:* EPIZOOTIES, O. I. D. (ed.) *Manual of Standards for Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals.* Paris: Office International des Epizooties.

ONGUS, J. R., FOMBONG, A. T., IRUNGU, J., MASIGA, D. & RAINA, S. 2017. Prevalence of common honey bee pathogens at selected apiaries in Kenya, 2013/2014. *International Journal of Tropical Insect Science,* 38**,** 58-70.

ONGUS, J. R., PETERS, D., BONMATIN, J. M., BENGSCH, E., VLAK, J. M. & VAN OERS, M. M. 2004. Complete sequence of a picorna-like virus of the genus Iflavirus replicating in the mite Varroa destructor. *J Gen Virol,* 85**,** 3747-55.

ONGUS, J. R., ROODE, E. C., PLEIJ, C. W., VLAK, J. M. & VAN OERS, M. M. 2006. The 5' non-translated region of Varroa destructor virus 1 (genus Iflavirus): structure prediction and IRES activity in Lymantria dispar cells. *J Gen Virol,* 87**,** 3397-407.

ÖRÖSI-PÁL, Z. 1938. Studien über die Bienenlaus (Braula coeca Nitzsch, Diptera). *Zeitschrift für Parasitenkunde,* 10**,** 221-238.

OTRANTO, D. & TRAVERSA, D. 2002. A review of dicrocoeliosis of ruminants including recent advances in the diagnosis and treatment. *Veterinary Parasitology,* 107**,** 317-335.

OUDEMANS, A. 1904. Note VIII. *On a new genus and species of parasitic Acari***,** 216-222.

OWEN, R. 2017. Role of Human Action in the Spread of Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Pathogens. *Journal of Economic Entomology,* 110**,** 797-801.

PAILLER, T. & THOMPSON, J. D. 1997. Distyly and variation in heteromorphic Incompatibility in Gaertnera Vaginata (Rubiaceae) endemic to La Reunion Island. *American Journal of Botany,* 84**,** 315-327.

PAKANDL, M. 2009. Coccidia of rabbit: a review. *Folia Parasitologica,* 56**,** 153-166.

PALMER-YOUNG, E. C., TOZKAR, C. Ö., SCHWARZ, R. S., CHEN, Y., IRWIN, R. E., ADLER, L. S. & EVANS, J. D. 2017. Nectar and Pollen Phytochemicals Stimulate Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Immunity to Viral Infection. *Journal of Economic Entomology,* 110**,** 1959-1972.

PARMENTIER, L., SMAGGHE, G., DE GRAAF, D. C. & MEEUS, I. 2016. Varroa destructor Macula-like virus, Lake Sinai virus and other new RNA viruses in wild bumblebee hosts (Bombus pascuorum, Bombus lapidarius and Bombus pratorum). *Journal of Invertebrate Pathology,* 134**,** 6-11.

PARNAUDEAU, R. & MADL, M. 2009. Liste des Hyménoptères des îlots coralliens français et mauricien de l'océan Indien occidental. *Bulletin de la Société entomologique de France,* 114**,** 453-462.

PAULY, A., BROOKS, R. W., NILSSON, L. A., PESENKO, Y. A., EARDLEY, C., D., TERZO, M., GRISWOLD, T. L., SCHWARTZ, M., PATINY, S., MUNZINGER, J. & BARBIER, Y. 2001. *Hymenoptera Apoidea de Madagascar et des îles voisines,* Tervuren, Musée Royal de l'Afrique Centrale.

PECK, D. T., SMITH, M. L. & SEELEY, T. D. 2016. Varroa destructor Mites Can Nimbly Climb from Flowers onto Foraging Honey Bees. *PLOS ONE,* 11**,** e0167798.

PENG, W., LI, J., ZHAO, Y., CHEN, Y. & ZENG, Z. 2015. A descriptive study of the prevalence of parasites and pathogens in Chinese black honeybees. *Parasitology,* 142**,** 1364-74.

PERNAL, S. F. & CURRIE, R. W. 2000. Pollen quality of fresh and 1-year-old single pollen diets for worker honey bees (Apis mellifera L.). *Apidologie,* 31**,** 387-409.

PETTIS, J. S., LICHTENBERG, E. M., 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.

PETTIS, J. S., VANENGELSDORP, D., JOHNSON, J. & DIVELY, G. 2012. Pesticide exposure in honey bees results in increased levels of the gut pathogen Nosema. *Naturwissenschaften,* 99**,** 153-8.

PILLING, E. D. & JEPSON, P. C. 1993. Synergism between EBI fungicides and a pyrethroid insecticide in the honeybee (Apis mellifera). *Pesticide Science,* 39**,** 293-297.

PIMENTEL, D., ZUNIGA, R. & MORRISON, D. 2005. Update on the environmental and economic costs associated with alien-invasive species in the United States. *Ecological Economics,* 52**,** 273-288.

PIRK, C. & YUSUF, A. 2015. A small hive beetle lesson from South Africa. *In:* CARRECK, N. L. (ed.) *The small hive beetle in Europe.* Cambridge: International Bee Re-

search Association, Groombridge.

PIRK, C. W., HUMAN, H., CREWE, R. M. & VANENGELSDORP, D. 2014. A survey of managed honey bee colony losses in the Republic of South Africa-2009 to 2011. *J Apicul Res,* 53**,** 35-42.

PIRK, C. W. W., STRAUSS, U., YUSUF, A. A., DÉMARES, F. & HUMAN, H. 2016. Honeybee health in Africa—a review. *Apidologie,* 47**,** 276-300.

POKHREL, V., DELISI, N. A., DANKA, R. G., WALKER, T. W., OTTEA, J. A. & HEALY, K. B. 2018. Effects of truck-mounted, ultra low volume mosquito adulticides on honey bees (Apis mellifera) in a suburban field setting. *PLOS ONE,* 13**,** e0193535.

PORCIANI, A. 2012. *Analyse de risque qualitative de l'arrivée de Varroa destructor sur l'île de la Réunion et ses conséquences pour les filières apicoles et associées.* MSc, Montpellier 2.

PORRINI, C., MUTINELLI, F., BORTOLOTTI, L., GRANATO, A., LAURENSON, L., ROBERTS, K., GALLINA, A., SILVESTER, N., MEDRZYCKI, P., RENZI, T., SGOLASTRA, F. & LODESANI, M. 2016. The Status of Honey Bee Health in Italy: Results from the Nationwide Bee Monitoring Network. *PLoS One,* 11**,** e0155411.

POSADA, D. 2008. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution,* 25**,** 1253-1256.

POTTS, S. G., IMPERATRIZ-FONSECA, V., NGO, H. T., AIZEN, M. A., BIESMEIJER, J. C., BREEZE, T. D., DICKS, L. V., GARIBALDI, L. A., HILL, R., SETTELE, J. & VANBERGEN, A. J. 2016. Safeguarding pollinators and their values to human well-being. *Nature,* 540**,** 220.

POWELL, J. E., MARTINSON, V. G., URBAN-MEAD, K. & MORAN, N. A. 2014. Routes of acquisition of the gut microbiota of Apis mellifera. *Applied and Environmental Microbiology*.

PTASZYNSKA, A. A., BORSUK, G., MULENKO, W. & OLSZEWSKI, K. 2012. Monitoring of nosemosis in the Lublin region and preliminary morphometric studies of Nosema spp. spores. *Medycyna Weterynaryjna,* 68**,** 622-625.

QGIS DEVELOPMENT TEAM 2016. QGIS Geographic Information System.

R DEVELOPMENT CORE TEAM 2013. R : A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.

RÅBERG, L., GRAHAM, A. L. & READ, A. F. 2009. Decomposing health: tolerance and resistance to parasites in animals. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences,* 364**,** 37-49.

RADZEVIČIŪTĖ, R., THEODOROU, P., HUSEMANN, M., JAPOSHVILI, G., KIRKITADZE, G., ZHUSUPBAEVA, A. & PAXTON, R. J. 2017. Replication of honey bee-associated RNA viruses across multiple bee species in apple orchards of Georgia, Germany and Kyrgyzstan. *Journal of Invertebrate Pathology,* 146**,** 14-23.

RALALAHARISOA-RAMAMONJISOA, Z., RALIMANANAI, H. & LOBREAU-CALLEN, D. 1996. Comportement de butinage d'Apis mellifera var unicolor (Hymenoptera, Apidae) dans divers biotopes. *Biogéographie de Madagascar***,** 517-522.

RAMBAUT, A. & DRUMMOND, A. 2006. FigTree v1. 0. *Available from the author (http://evolve. zoo. ox. ac. uk/software. html*.

RAMSEY, S. D., OCHOA, R., BAUCHAN, G., GULBRONSON, C., MOWERY, J., COHEN, A., LIM, D., JOKLIK, J., CICERO, J. M., ELLIS, J. D., HAWTHORNE, D. & VANENGELSDORP, D. *Varroa destructor* feeds primarily on honey bee fat body tissue not hemolymph. *In:* UNIVERSITY, G., ed. EURBEE 8, 2018 Ghent. 272.

RANGEL, J., GONZALEZ, A., STONER, M., HATTER, A. & TRAVER, B. E. 2018. Genetic diversity and prevalence of Varroa destructor, Nosema apis, and N. ceranae in managed honey bee (Apis mellifera) colonies in the Caribbean island of Dominica, West Indies. *Journal of Apicultural Research***,** 1-10.

RASOLOARIJAO, T. M. 2018. *Écologie de l'abeille, Apis mellifera unicolor, dans les écosystèmes forestiers naturels de Ranomafana (Madagascar) et Mare Longue (Réunion) : étude du comportement de butinage et de l'utilisation des ressources florales par approche mélissopalynologique.* PhD, Université de La Réunion.

RASOLOFOARIVAO, H. 2014. *Apis mellifera unicolor (Latreille, 1804, Hymenoptera: Apidae) et Varrroa destructor (Anderson and Trueman, 2000, Acari : Varroidae) à Madagascar : diversité génétique, impact et comportement hygiénique.* PgD, Université de La Réunion

Université d'Antananarivo.

RASOLOFOARIVAO, H., CLEMENCET, J., RAVAOMANARIVO, L. H., RAZAFINDRAZAKA, D., REYNAUD, B. & DELATTE, H. 2013. Spread and strain determination of Varroa destructor (Acari: Varroidae) in Madagascar since its first report in 2010. *Exp Appl Acarol,* 60**,** 521-30.

RASOLOFOARIVAO, H., CLÉMENCET, J., TECHER, M., RAVAOMANARIVO, L., REYNAUD, B. & DELATTE, H. 2015a. Genetic diversity of the endemic honeybee: Apis mellifera unicolor (Hymenoptera: Apidae) in Madagascar. *Apidologie***,** 1-13.

RASOLOFOARIVAO, H., DELATTE, H., RAVAOMANARIVO, L., REYNAUD, B. & CLÉMENCET, J. 2015b. Assessing hygienic behavior of Apis mellifera unicolor (Hymenoptera: Apidae), the endemic honey bee from Madagascar. *GENETICS AND MOLECULAR RESEARCH,* 14**,** 5879-5889.

RAVOET, J., DE SMET, L., MEEUS, I., SMAGGHE, G., WENSELEERS, T. & DE GRAAF, D. C. 2014. Widespread occurrence of honey bee pathogens in solitary bees. *Journal of Invertebrate Pathology,* 122**,** 55-58.

RAYMANN, K., SHAFFER, Z. & MORAN, N. A. 2017. Antibiotic exposure perturbs the gut microbiota and elevates mortality in honeybees. *PLOS Biology,* 15**,** e2001861.

RENAULT, P., SOLET, J. L., SISSOKO, D., BALLEYDIER, E., LARRIEU, S., FILLEUL, L., LASSALLE, C., THIRIA, J., RACHOU, E., DE VALK, H., ILEF, D., LEDRANS, M., QUATRESOUS, I., QUENEL, P. & PIERRE, V. 2007. A major epidemic of chikungunya virus infection on Reunion Island, France, 2005-2006. *Am J Trop Med Hyg,* 77**,** 727-31.

RETSCHNIG, G., NEUMANN, P. & WILLIAMS, G. R. 2014a. Thiacloprid-Nosema ceranae interactions in honey bees: Host survivorship but not parasite reproduction is dependent on pesticide dose. *J Invertebr Pathol,* 118C**,** 18-19.

RETSCHNIG, G., WILLIAMS, G. R., MEHMANN, M. M., YANEZ, O., DE MIRANDA, J. R. & NEUMANN, P. 2014b. Sex-specific differences in pathogen susceptibility in honey bees (Apis mellifera). *PLoS One,* 9**,** e85261.

RETSCHNIG, G., WILLIAMS, G. R., ODEMER, R., BOLTIN, J., DI POTO, C., MEHMANN, M. M., RETSCHNIG, P., WINIGER, P., ROSENKRANZ, P. & NEUMANN, P. 2015. Effects, but no interactions, of

ubiquitous pesticide and parasite stressors on honey bee (Apis mellifera) lifespan and behaviour in a colony environment. *Environmental Microbiology,* 17**,** 4322-4331.
RHODES, C. J. 2018. Pollinator decline; an ecological calamity in the making? *Science Progress,* 101**,** 121-160.
RIBIÈRE, M., BALL, B. & AUBERT, M. 2008. Natural history and geographical distribution of honey bee viruses. *Virology and the honey bee***,** 15-84.
RIBIERE, 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**,** 7711-7716.
RIBIERE, M., OLIVIER, V. & BLANCHARD, P. 2010. Chronic bee paralysis: a disease and a virus like no other? *J Invertebr Pathol,* 103 Suppl 1**,** S120-31.
RITTER, W. 1981. Varroa Disease of the Honeybee Apis Mellifera. *Bee World,* 62**,** 141-153.
ROBERTS, J. M. K., ANDERSON, D. L. & DURR, P. A. 2017. Absence of deformed wing virus and Varroa destructor in Australia provides unique perspectives on honeybee viral landscapes and colony losses. *Scientific Reports,* 7**,** 6925.
RODRÍGUEZ-DEHAIBES, S. R., OTERO-COLINA, G., SEDAS, V. P. & JIMÉNEZ, J. A. V. 2005. Resistance to amitraz and flumethrin in Varroa destructor populations from Veracruz, Mexico. *Journal of Apicultural Research,* 44**,** 124-125.
RONQUIST, F. & HUELSENBECK, J. P. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics,* 19**,** 1572-1574.
ROSENKRANZ, P., AUMEIER, P. & ZIEGELMANN, B. 2010. Biology and control of Varroa destructor. *J Invertebr Pathol,* 103 Suppl 1**,** S96-119.
RÚA, P. D. L., GALIÁN, J., PEDERSEN, B. V. & SERRANO, J. 2006. Molecular characterization and population structure of Apis mellifera from Madeira and the Azores. *Apidologie,* 37**,** 699-708.
RUNCKEL, C., FLENNIKEN, M. L., ENGEL, J. C., RUBY, J. G., GANEM, D., ANDINO, R. & DERISI, J. L. 2011. Temporal analysis of the honey bee microbiome reveals four novel viruses and seasonal prevalence of known viruses, Nosema, and Crithidia. *PLoS One,* 6**,** e20656.
RUTTNER, F. 1988. *Biogeography and taxonomy of honeybees* Berlin, Springer.
RYABOV, E. V., CHILDERS, A. K., CHEN, Y., MADELLA, S., NESSA, A., VANENGELSDORP, D. & EVANS, J. D. 2017. Recent spread of Varroa destructor virus-1, a honey bee pathogen, in the United States. *Scientific Reports,* 7**,** 17447.
RYABOV, E. V., WOOD, G. R., FANNON, J. M., MOORE, J. D., BULL, J. C., CHANDLER, D., MEAD, A., BURROUGHS, N. & EVANS, D. J. 2014. A Virulent Strain of Deformed Wing Virus (DWV) of Honeybees (Apis mellifera) Prevails after Varroa destructor-Mediated, or In Vitro, Transmission. *PLOS Pathogens,* 10**,** e1004230.
RYBA, S., TITERA, D., SCHODELBAUEROVA-TRAXMANDLOVA, I. & KINDLMANN, P. 2012. Prevalence of honeybee viruses in the Czech Republic and coinfections with other honeybee disease. *Biologia,* 67**,** 590-595.
SAKAMOTO, Y., MAEDA, T., YOSHIYAMA, M. & PETTIS, J. S. 2017. Differential susceptibility to the tracheal mite Acarapis woodi between Apis cerana and Apis mellifera. *Apidologie,* 48**,** 150-158.
SAMMATARO, D., GERSON, U. & NEEDHAM, G. 2000. Parasitic mites of honey bees: life history, implications, and impact. *Annu Rev Entomol,* 45**,** 519-48.
SANCHEZ-BAYO, F., GOULSON, D., PENNACCHIO, F., NAZZI, F., GOKA, K. & DESNEUX, N. 2016. Are bee diseases linked to pesticides? - A brief review. *Environ Int,* 89-90**,** 7-11.
SANTAMARIA, J., VILLALOBOS, E. M., BRETTELL, L. E., NIKAIDO, S., GRAHAM, J. R. & MARTIN, S. 2018. Evidence of Varroa-mediated deformed wing virus spillover in Hawaii. *Journal of Invertebrate Pathology,* 151**,** 126-130.
SCHIRACH, G. 1769. Histoire des Abeilles. *Chapter,* 3**,** 56.
SCHMICKL, T. & CRAILSHEIM, K. 2001. Cannibalism and early capping: strategy of honeybee colonies in times of experimental pollen shortages. *Journal of Comparative Physiology A,* 187**,** 541-547.

SCHMICKL, T. & CRAILSHEIM, K. 2002. How honeybees (Apis mellifera L.) change their broodcare behaviour in response to non-foraging conditions and poor pollen conditions. *Behavioral Ecology and Sociobiology,* 51**,** 415-425.

SCHNEIDER, P. & DRESCHER, W. 1987. Einfluss der Parasitierung durch die Milbe Varroa jacobsoni Oud. auf das Schlupfgewicht, die Gewichtsentwicklung, die Entwicklung der Hypopharynxdrüsen und die Lebensdauer von Apis mellifera L. *Apidologie,* 18**,** 101-110.

SCHROEDER, D. C. & MARTIN, S. J. 2012. Deformed wing virus. *Virulence,* 3**,** 589-591.

SCHUFFENECKER, I., ITEMAN, I., MICHAULT, A., MURRI, S., FRANGEUL, L., VANEY, M.-C., LAVENIR, R., PARDIGON, N., REYNES, J.-M., PETTINELLI, F., BISCORNET, L., DIANCOURT, L., MICHEL, S., DUQUERROY, S., GUIGON, G., FRENKIEL, M.-P., BRÉHIN, A.-C., CUBITO, N., DESPRÈS, P., KUNST, F., REY, F. A., ZELLER, H. & BRISSE, S. 2006. Genome Microevolution of Chikungunya Viruses Causing the Indian Ocean Outbreak. *PLOS Medicine,* 3**,** e263.

SCOTT-DUPREE, C., BALL, B., WELSH, O. & ALLEN, M. An investigation into the potential transmission of viruses by the honey bee tracheal mite (Acarapis woodi R.) to honeybees. Canadian Honey Council Res. Symposium Proc, 1995. 15-24.

SEELEY, T. D. 1982. Adaptive significance of the age polyethism schedule in honeybee colonies. *Behavioral Ecology and Sociobiology,* 11**,** 287-293.

SEELEY, T. D. 2009. *The wisdom of the hive: the social physiology of honey bee colonies*, Harvard University Press.

SEELEY, T. D. & MORSE, R. A. 1976. The nest of the honey bee (Apis mellifera L.). *Insectes Sociaux,* 23**,** 495-512.

SHEN, M., YANG, X., COX-FOSTER, D. & CUI, L. 2005. The role of varroa mites in infections of Kashmir bee virus (KBV) and deformed wing virus (DWV) in honey bees. *Virology,* 342**,** 141-9.

SHEPPARD, W. S. & MEIXNER, M. D. 2003. Apis mellifera pomonella, a new honey bee subspecies from Central Asia. *Apidologie,* 34**,** 367-375.

SHUMKOVA, R., NEOV, B., SIRAKOVA, D., GEORGIEVA, A., GADJEV, D., TEOFANOVA, D., RADOSLAVOV, G., BOUGA, M. & HRISTOV, P. 2018. Molecular detection and phylogenetic assessment of six honeybee viruses in Apis mellifera L. colonies in Bulgaria. *PeerJ,* 6**,** e5077.

SIEDE, R. & BÜCHLER, R. 2003. [Symptomatic Black Queen Cell Virus infection of drone brood in Hessian apiaries]. *Berliner und Munchener tierarztliche Wochenschrift,* 116**,** 130-133.

SILACCI, P., BIOLLEY, C., JUD, C., CHARRIÈRE, J. D. & DAINAT, B. 2018. An improved DNA method to unambiguously detect small hive beetle Aethina tumida, an invasive pest of honeybee colonies. *Pest Management Science,* 0.

SIMBERLOFF, D., MARTIN, J.-L., GENOVESI, P., MARIS, V., WARDLE, D. A., ARONSON, J., COURCHAMP, F., GALIL, B., GARCÍA-BERTHOU, E., PASCAL, M., PYŠEK, P., SOUSA, R., TABACCHI, E. & VILÀ, M. 2013. Impacts of biological invasions: what's what and the way forward. *Trends in Ecology & Evolution,* 28**,** 58-66.

SINGH, M., KANE, G. J., MACKINLAY, L., QUAKI, I., YAP, E. H., HO, B. C., HO, L. C. & LIM, K. C. 1982. Detection of antibodies to Nosema cuniculi (Protozoa : Microscoporidia) in human and animal sera by the indirect fluorescent antibody technique. *Southeast Asian J Trop Med Public Health,* 13**,** 110-3.

SINGH, R., LEVITT, A. L., RAJOTTE, E. G., HOLMES, E. C., OSTIGUY, N., VANENGELSDORP, D., LIPKIN, W. I., DEPAMPHILIS, C. W., TOTH, A. L. & COX-FOSTER, D. L. 2010. RNA viruses in hymenopteran pollinators: evidence of inter-Taxa virus transmission via pollen and potential impact on non-Apis hymenopteran species. *PLoS One,* 5**,** e14357.

SMITH, I. B. & CARON, D. M. 1984. Distribution of the Bee Louse Braula Coeca Nitzsch in Honeybee Colonies and its Preferences Among Workers, Queens and Drones. *Journal of Apicultural Research,* 23**,** 171-176.

SMITH, M. R., SINGH, G. M., MOZAFFARIAN, D. & MYERS, S. S. 2015. Effects of decreases of animal pollinators on human nutrition and global health: a modelling analysis. *Lancet,* 386**,** 1964-72.

SOLIGNAC, M., CORNUET, J. M., 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. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences,* 272**,** 411-419.
SOMERVILLE, D. 2003. Study of the small hive beetle in the USA. *Rural Industries Research and Development Corporation, Barton, Australian Capital Territory*.
SOMERVILLE, D. 2007a. *Braula fly*.
SOMERVILLE, D. 2007b. *Braula fly*.
SOMERVILLE, D. & HORNITZKY, M. 2007. Nosema disease. *Primefact,* 699**,** 1-3.
SPIVAK, M. & GILLIAM, M. 1998. Hygienic behaviour of honey bees and its application for control of brood diseases and varroa. *Bee World,* 79**,** 124-134.
STARKS, P. T., BLACKIE, C. A. & SEELEY, T. D. 2000. Fever in honeybee colonies. *Naturwissenschaften,* 87**,** 229-231.
STEINHAUER, N., KULHANEK, K., ANTÚNEZ, K., HUMAN, H., CHANTAWANNAKUL, P., CHAUZAT, M.-P. & VANENGELSDORP, D. 2018. Drivers of colony losses. *Current Opinion in Insect Science,* 26**,** 142-148.
STEINHAUER, N. A., RENNICH, K., WILSON, M. E., CARON, D. M., LENGERICH, E. J., PETTIS, J. S., ROSE, R., SKINNER, J. A., TARPY, D. R., WILKES, J. T., VANENGELSDORP, D. & BEE INFORMED, P. 2014. A national survey of managed honey bee 2012-2013 annual colony losses in the USA: results from the Bee Informed Partnership. *Journal of Apicultural Research,* 53**,** 1-18.
STEULLET, P. & GUERIN, P. M. 1994. Identification of vertebrate volatiles stimulating olfactory receptors on tarsus I of the tick Amblyomma variegatum Fabricius (Ixodidae). *Journal of Comparative Physiology A,* 174**,** 27-38.
STEVENSON, M. A., BENARD, H., BOLGER, P. & MORRIS, R. S. 2005. Spatial epidemiology of the Asian honey bee mite (Varroa destructor) in the North Island of New Zealand. *Prev Vet Med,* 71**,** 241-52.
STOLL, N. R. 1929. Studies with the Strongyloid nematode, *Haemonchus contortus*: I. Acquired resistance of hosts under natural reinfection conditions out-of-doors. *American Journal of Epidemiology,* 10**,** 384-418.
STONE, L. & ROBERTS, A. 1990. The checkerboard score and species distributions. *Oecologia,* 85**,** 74-79.
STOREY, M., MAHONEY, J. J., SAUNDERS, A. D., DUNCAN, R. A., KELLEY, S. P. & COFFIN, M. F. 1995. Timing of Hot Spot—Related Volcanism and the Breakup of Madagascar and India. *Science,* 267**,** 852-855.
STRASBERG, D., ROUGET, M., RICHARDSON, D. M., BARET, S., DUPONT, J. & COWLING, R. M. 2005. An Assessment of Habitat Diversity and Transformation on La Réunion Island (Mascarene Islands, Indian Ocean) as a Basis for Identifying Broad-scale Conservation Priorities. *Biodiversity & Conservation,* 14**,** 3015-3032.
STRAUSS, U., DIETEMANN, V., HUMAN, H., CREWE, R. M. & PIRK, C. W. W. 2015a. Resistance rather than tolerance explains survival of savannah honeybees (Apis mellifera scutellata) to infestation by the parasitic mite Varroa destructor. *Parasitology,* 143**,** 374-387.
STRAUSS, U., HUMAN, H., GAUTHIER, L., CREWE, R. M., DIETEMANN, V. & PIRK, C. W. 2013. Seasonal prevalence of pathogens and parasites in the savannah honeybee (Apis mellifera scutellata). *J Invertebr Pathol,* 114**,** 45-52.
STRAUSS, U., PIRK, C. W., CREWE, R. M., HUMAN, H. & DIETEMANN, V. 2014a. Impact of Varroa destructor on honeybee (Apis mellifera scutellata) colony development in South Africa. *Exp Appl Acarol*.
STRAUSS, U., PIRK, C. W., DIETEMANN, V., CREWE, R. M. & HUMAN, H. 2014b. Infestation rates of Varroa destructor and Braula coeca in the savannah honey bee (Apis mellifera scutellata). *Journal of Apicultural Research,* 53**,** 475-477.
STRAUSS, U., PIRK, C. W. W., CREWE, R. M., HUMAN, H. & DIETEMANN, V. 2015b. Impact of Varroa destructor on honeybee (Apis mellifera scutellata) colony development in South Africa. *Experimental and Applied Acarology,* 65**,** 89-106.
SUMNER, S., LAW, G. & CINI, A. 2018. Why we love bees and hate wasps. *Ecological Entomology,* 0.

TAKAMATSU, D., MORINISHI, K., ARAI, R., SAKAMOTO, A., OKURA, M. & OSAKI, M. 2014. Typing of Melissococcus plutonius isolated from European and Japanese honeybees suggests spread of sequence types across borders and between different Apis species. *Vet Microbiol,* 171**,** 221-6.

TAN, K., CHEN, W., DONG, S., LIU, X., WANG, Y. & NIEH, J. C. 2014. Imidacloprid Alters Foraging and Decreases Bee Avoidance of Predators. *PLOS ONE,* 9**,** e102725.

TAPASZTI, Z., FORGACH, P., KOVAGO, C., TOPOLSKA, G., NOWOTNY, N., RUSVAI, M. & BAKONYI, T. 2009. Genetic analysis and phylogenetic comparison of Black queen cell virus genotypes. *Vet Microbiol,* 139**,** 227-34.

TASSIN, J. & KULL, C. A. 2015. Facing the broader dimensions of biological invasions. *Land Use Policy,* 42**,** 165-169.

TEAM, R. D. C. 2008. R: A language and environment for statistical computing. Austria: R Foundation for Statistical Computing V.

TECHER, M. A. 2015. *Diversité génétique et phylogéographie de l'abeille Apis mellifera dans les îles du Sud-Ouest de l'Océan Indien.* PhD, Université de La Réunion.

TECHER, M. A., CLÉMENCET, J., SIMIAND, C., PREEADUTH, S., AZALI, H. A., REYNAUD, B. & HÉLÈNE, D. 2017a. Large-scale mitochondrial DNA analysis of native honey bee Apis mellifera populations reveals a new African subgroup private to the South West Indian Ocean islands. *BMC Genetics,* 18**,** 53.

TECHER, M. A., CLÉMENCET, J., SIMIAND, C., TURPIN, P., GARNERY, L., REYNAUD, B. & DELATTE, H. 2017b. Genetic diversity and differentiation among insular honey bee populations in the southwest Indian Ocean likely reflect old geographical isolation and modern introductions. *PLOS ONE,* 12**,** e0189234.

TECHER, M. A., CLÉMENCET, J., TURPIN, P., VOLBERT, N., REYNAUD, B. & DELATTE, H. 2015. Genetic characterization of the honeybee (Apis mellifera) population of Rodrigues Island, based on microsatellite and mitochondrial DNA. *Apidologie,* 46**,** 445-454.

TECHER, M. A. & SADEYEN, J. 2011. *Niveaux de polyandrie et diversité génétique chez les colonies d'abeilles à la Réunion.* Master 1 BEST, Université de La Réunion.

TEHEL, A., BROWN, M. J. F. & PAXTON, R. J. 2016. Impact of managed honey bee viruses on wild bees. *Current Opinion in Virology,* 19**,** 16-22.

TEIXEIRA, E. W., SANTOS, L. G., SATTLER, A., MESSAGE, D., ALVES, M. L., MARTINS, M. F., GRASSI-SELLA, M. L. & FRANCOY, T. M. 2013. Nosema ceranae has been present in Brazil for more than three decades infecting Africanized honey bees. *J Invertebr Pathol,* 114**,** 250-4.

TENTCHEVA, D., GAUTHIER, L., ZAPPULLA, N., DAINAT, B., COUSSERANS, F., COLIN, M. E. & BERGOIN, M. 2004. Prevalence and seasonal variations of six bee viruses in Apis mellifera L. and Varroa destructor mite populations in France. *Appl Environ Microbiol,* 70**,** 7185-91.

TERIO, V., MARTELLA, V., CAMERO, M., DECARO, N., TESTINI, G., BONERBA, E., TANTILLO, G. & BUONAVOGLIA, C. 2008. Detection of a honeybee iflavirus with intermediate characteristics between kakugo virus and deformed wing virus. *New Microbiol,* 31**,** 439-44.

THANY, S., BOURDIN, C., GRATON, J., LAURENT, A., MATHÉ-ALLAINMAT, M., LEBRETON, J. & LE QUESTEL, J.-Y. 2015. Similar Comparative Low and High Doses of Deltamethrin and Acetamiprid Differently Impair the Retrieval of the Proboscis Extension Reflex in the Forager Honey Bee (Apis mellifera). *Insects,* 6**,** 805.

THÉBAUD, C., WARREN, B. H., STRASBERG, D. & CHEKE, A. 2009. Mascarene islands, biology. *Atoll Research Bulletin,* 127**,** 1-216.

THEOPOLD, U. & DUSHAY, M. S. 2007. Mechanisms of Drosophila Immunity - An Innate Immune System at Work. *Current Immunology Reviews,* 3**,** 276-288.

THOMANN, M., IMBERT, E., DEVAUX, C. & CHEPTOU, P.-O. 2013. Flowering plants under global pollinator decline. *Trends in Plant Science,* 18**,** 353-359.

THOMAS, F., LEFEVRE, T. & RAYMOND, M. 2010. *Biologie évolutive,* Bruxelles, de Boeck.

THOMPSON, J. D., HIGGINS, D. G. & GIBSON, T. J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research,* 22**,** 4673-4680.

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**,** 354-367.

TOGUEBAYE, B. S., QUILICHINI, Y., DIAGNE, P. M. & MARCHAND, B. 2014. Ultrastructure and development of Nosema podocotyloidis n. sp. (Microsporidia), a hyperparasite of Podocotyloides magnatestis (Trematoda), a parasite of Parapristipoma octolineatum (Teleostei). *Parasite,* 21**,** 44.

TOMA, B., DUFOUR, B., SANNA, M., BÉNET, J. J., SHAW, A., MOUTOU, F. & LOUZÃ, A. 2001. *Epidémiologie appliquée à la lutte collective contre les maladies animales transmissibles majeures,* Maisons-Alfort, AEEMA.

TOPLAK, I., JAMNIKAR CIGLENECKI, 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**,** 2282-97.

TOULLEC, A. N. K. 2008. *Apis mellifera mellifera, Historique et Sauvegarde.* DVM, Ecole Nationale Vétérinaire de Maisons-Alfort.

TRÜPER, H. G. & DE'CLARI, L. 1998. Taxonomic note: erratum and correction of further specific epithets formed as substantives (nouns)'in apposition'. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology,* 48**,** 615-615.

TSEVEGMID, K., NEUMANN, P. & YANEZ, O. 2016. The Honey Bee Pathosphere of Mongolia: European Viruses in Central Asia. *PLoS One,* 11**,** e0151164.

TSVETKOV, N., SAMSON-ROBERT, O., SOOD, K., PATEL, H. S., MALENA, D. A., GAJIWALA, P. H., MACIUKIEWICZ, P., FOURNIER, V. & ZAYED, A. 2017. Chronic exposure to neonicotinoids reduces honey bee health near corn crops. *Science,* 356**,** 1395-1397.

VAN DER ZEE, R., GRAY, A., PISA, L. & DE RIJK, T. 2015. An Observational Study of Honey Bee Colony Winter Losses and Their Association with Varroa destructor, Neonicotinoids and Other Risk Factors. *PLOS ONE,* 10**,** e0131611.

VAN VALEN, L. 1977. The Red Queen. *The American Naturalist,* 111**,** 809-810.

VANBERGEN, A. J., ESPÍNDOLA, A. & AIZEN, M. A. 2018. Risks to pollinators and pollination from invasive alien species. *Nature Ecology & Evolution,* 2**,** 16-25.

VANDAME, R. & BELZUNCES, L. P. 1998. Joint actions of deltamethrin and azole fungicides on honey bee thermoregulation. *Neuroscience Letters,* 251**,** 57-60.

VANENGELSDORP, D., EVANS, J. D., SAEGERMAN, C., MULLIN, C., HAUBRUGE, E., NGUYEN, B. K., FRAZIER, M., FRAZIER, J., COX-FOSTER, D., CHEN, Y., UNDERWOOD, R., TARPY, D. R. & PETTIS, J. S. 2009a. Colony collapse disorder: a descriptive study. *PLoS One,* 4**,** e6481.

VANENGELSDORP, D., HAYES, J., JR., UNDERWOOD, R. M. & PETTIS, J. 2009b. A Survey of Honey Bee Colony Losses in the U.S., Fall 2007 to Spring 2008. *PLOS ONE,* 3**,** e4071.

VANENGELSDORP, D. & MEIXNER, M. D. 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.

VESEY-FITZGERALD, D. 1950. Nesting habits of some aculeate Hymenoptera in the Seychelles. *Proceedings of the Royal Entomological Society of London. Series A, General Entomology,* 25**,** 75-80.

VIDAL-NAQUET, N. 2015. *Honeybee Veterinary Medicine: Apis Mellifera L,* Sheffield, UK, 5M Publishing.

VIDAU, C., DIOGON, M., AUFAUVRE, J., FONTBONNE, R., VIGUES, B., BRUNET, J. L., TEXIER, C., BIRON, D. G., BLOT, N., EL ALAOUI, H., BELZUNCES, L. P. & DELBAC, F. 2011. Exposure to sublethal doses of fipronil and thiacloprid highly increases mortality of honeybees previously infected by Nosema ceranae. *PLoS One,* 6**,** e21550.

VIEIRA, M. C., CIANCIARUSO, M. V. & ALMEIDA-NETO, M. 2013. Plant-Pollinator Coextinctions and the Loss of Plant Functional and Phylogenetic Diversity. *PLOS ONE,* 8**,** e81242.

VILLA, J. D. 2004. Swarming Behavior of Honey Bees (Hymenoptera: Apidae) in Southeastern Louisiana. *Annals of the Entomological Society of America,* 97**,** 111-116.

VILLA, J. D. & DANKA, R. G. 2005. Caste, Sex and Strain of Honey Bees (Apis mellifera) Affect Infestation with Tracheal Mites (Acarapis woodi)*. *Experimental & Applied Acarology,* 37**,** 157.

VISSCHER, P. K. 1980. Adaptations of honey bees (Apis mellifera) to problems of nest hygiene. *Sociobiology,* 5**,** 249-260.

WARREN, B. H., STRASBERG, D., BRUGGEMANN, J. H., PRYS-JONES, R. P. & THÉBAUD, C. 2010. Why does the biota of the Madagascar region have such a strong Asiatic flavour? *Cladistics,* 26**,** 526-538.

WEBSTER, J. P. 2007. The Effect of Toxoplasma gondii on Animal Behavior: Playing Cat and Mouse. *Schizophrenia Bulletin,* 33**,** 752-756.

WEBSTER, T. C., POMPER, K. W., HUNT, G., THACKER, E. M. & JONES, S. C. 2004. Nosema apis infection in worker

and queen Apis mellifera. *Apidologie,* 35**,** 49-54.

WEGENER, J., RUHNKE, H., SCHELLER, K., MISPAGEL, S., KNOLLMANN, U., KAMP, G. & BIENEFELD, K. 2016. Pathogenesis of varroosis at the level of the honey bee (Apis mellifera) colony. *Journal of Insect Physiology,* 91-92**,** 1-9.

WHITE, G. 1906. The bacteria of the apiary with special reference to bee disease. *USDA, Bureau of Entomology, Technical Series,* 14**,** 1-50.

WHITE, G. 1912. The cause of European foulbrood. US Department of Agriculture Bureau of Entomology circular no. 157. US Department of Agriculture, Washington, DC.

WHITFIELD, C. W., BEHURA, S. K., BERLOCHER, S. H., CLARK, A. G., JOHNSTON, J. S., SHEPPARD, W. S., SMITH, D. R., SUAREZ, A. V., WEAVER, D. & TSUTSUI, N. D. 2006. Thrice out of Africa: ancient and recent expansions of the honey bee, Apis mellifera. *Science,* 314**,** 642-645.

WILFERT, L., LONG, G., LEGGETT, H. C., SCHMID-HEMPEL, P., BUTLIN, R., MARTIN, S. J. M. & BOOTS, M. 2016. Deformed wing virus is a recent global epidemic in honeybees driven by Varroa mites. *Science,* 351**,** 594-597.

WILLIAMS, G. R., SHAFER, A. B., ROGERS, R. E., SHUTLER, D. & STEWART, D. T. 2008. First detection of Nosema ceranae, a microsporidian parasite of European honey bees (Apis mellifera), in Canada and central USA. *J Invertebr Pathol,* 97**,** 189-92.

WILLIAMS, G. R., TARPY, D. R., VANENGELSDORP, D., CHAUZAT, M. P., COX-FOSTER, D. L., DELAPLANE, K. S., NEUMANN, P., PETTIS, J. S., ROGERS, R. E. & SHUTLER, D. 2010. Colony Collapse Disorder in context. *Bioessays,* 32**,** 845-6.

WILLIAMSON, M. & FITTER, A. 1996. The Varying Success of Invaders. *Ecology,* 77**,** 1661-1666.

WILSON, J. R. U., DORMONTT, E. E., PRENTIS, P. J., LOWE, A. J. & RICHARDSON, D. M. 2009. Something in the way you move: dispersal pathways affect invasion success. *Trends in Ecology & Evolution,* 24**,** 136-144.

WILSON, W. T. 1971. Resistance to American foulbrood in honey bees. XI: Fate of Bacillus larvae spores ingested by adults. *Journal of Invertebrate Pathology,* 17**,** 247-255.

WINSTON, M. L. 1992. *Killer bees. The Africanized honey bee in the Americas*, Harvard University Press.

WOOLHOUSE, M., SCOTT, F., HUDSON, Z., HOWEY, R. & CHASE-TOPPING, M. 2012. Human viruses: discovery and emergence. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences,* 367**,** 2864-2871.

WORLD HEALTH ORGANIZATION 2009. Mathematical modelling of the pandemic H1N1 2009. *Weekly Epidemiological Record= Relevé épidémiologique hebdomadaire,* 84**,** 341-348.

WRAGG, D., TECHER, M. A., CANALE-TABET, K., BASSO, B., BIDANEL, J.-P., LABARTHE, E., BOUCHEZ, O., LE CONTE, Y., CLÉMENCET, J., DELATTE, H. & VIGNAL, A. 2018. Autosomal and Mitochondrial Adaptation Following Admixture: A Case Study on the Honeybees of Reunion Island. *Genome Biology and Evolution,* 10**,** 220-238.

YANEZ, O., NEUMANN, P. & TEJADA, G. 2014. First detection of viruses in africanized honey bees from Peru. *Virologica Sinica,* 5**,** 321-323.

YANG, B., PENG, G., LI, T. & KADOWAKI, T. 2013. Molecular and phylogenetic characterization of honey bee viruses, Nosema microsporidia, protozoan parasites, and parasitic mites in China. *Ecol Evol,* 3**,** 298-311.

YANG, X. & COX-FOSTER, D. L. 2005. Impact of an ectoparasite on the immunity and pathology of an invertebrate: Evidence for host immunosuppression and viral amplification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,* 102**,** 7470-7475.

YODER, J. A., JAJACK, A. J., ROSSELOT, A. E., SMITH, T. J., YERKE, M. C. & SAMMATARO, D. 2013. Fungicide contamination reduces beneficial fungi in bee bread based on an area-wide field study in honey bee, Apis mellifera, colonies. *J Toxicol Environ Health A,* 76**,** 587-600.

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**,** 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. *J Invertebr Pathol,* 92**,** 105-8.

ZAITOUN, S. & AL-GHZAWI, A. A. M. 2008. Daily number of bee louse (Braula coeca) in honey bee (Apis mellifera carnica and A. m. syriaca) colonies maintained under semi-arid conditions. *Insect Science,* 15**,** 563-567.

ZANDER, E. 1909. Tierische parasiten als krankenheitserreger bei der biene. *Münchener Bienenzeitung,* 31**,** 196-204.

ZAVALETA, E. S., HOBBS, R. J. & MOONEY, H. A. 2001. Viewing invasive species removal in a whole-ecosystem context. *Trends in Ecology & Evolution,* 16**,** 454-459.

ZHANG, E. & NIEH, J. C. 2015. The neonicotinoid imidacloprid impairs honey bee aversive learning of simulated predation. *The Journal of Experimental Biology,* 218**,** 3199-3205.

ZHANG, X., HE, S. Y., EVANS, J. D., PETTIS, J. S., YIN, G. F. & CHEN, Y. P. 2012. New evidence that deformed wing virus and black queen cell virus are multi-host pathogens. *J Invertebr Pathol,* 109**,** 156-9.

ZHENG, H., POWELL, J. E., STEELE, M. I., DIETRICH, C. & MORAN, N. A. 2017. Honeybee gut microbiota promotes host weight gain via bacterial metabolism and hormonal signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences,* 114**,** 4775-4780.

ZHU, W., SCHMEHL, D. R., MULLIN, C. A. & FRAZIER, J. L. 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**,** e77547.

ZIEGELMANN, B., STEIDLE, H., LINDENMAYER, A. & ROSENKRANZ, P. 2008. Sex pheromones trigger the mating behaviour of Varroa destructor. *Apidologie,* 39**,** 598.

ZIONI, N., SOROKER, V. & CHEJANOVSKY, N. 2011. Replication of Varroa destructor virus 1 (VDV-1) and a Varroa destructor virus 1–deformed wing virus recombinant (VDV-1–DWV) in the head of the honey bee. *Virology,* 417**,** 106-112.

Annexes

Annexe 1

Décrets, arrêtés, circulaires

TEXTES GÉNÉRAUX

MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE, DE L'AGROALIMENTAIRE ET DE LA FORÊT

Arrêté du 29 juillet 2013 relatif à la définition des dangers sanitaires de première et deuxième catégorie pour les espèces animales

NOR : *AGRG1320208A*

Publics concernés : *tous publics, éleveurs, associations d'éleveurs, organismes à vocation sanitaire, vétérinaires, organisations vétérinaires à vocation technique, chasseurs, laboratoires d'analyses, collectivités territoriales, services de l'Etat.*

Objet : *définition des listes de dangers sanitaires de première et de deuxième catégorie pour les espèces animales.*

Entrée en vigueur : *le texte entre en vigueur le lendemain de sa publication.*

Notice : *l'ordonnance n° 2011-862 du 22 juillet 2011 relative à l'organisation de l'épidémiosurveillance, de la prévention et de la lutte contre les maladies animales et végétales et aux conditions de délégation de certaines tâches liées au contrôle, a déterminé les conditions générales dans lesquelles divers organismes peuvent concourir aux actions de surveillance, de prévention et de lutte contre les dangers sanitaires auxquels sont exposés les animaux et les végétaux. Elle définit les dangers de première, deuxième et troisième catégorie. Le décret n° 2012-845 du 30 juin 2012 relatif aux dispositions générales organisant la prévention, la surveillance et la lutte contre les dangers sanitaires de première et deuxième catégorie pris en application de cette ordonnance fixe les conditions d'établissement des listes des dangers sanitaires de première et deuxième catégorie. Le présent arrêté fixe les listes de dangers sanitaires de première et de deuxième catégorie auxquels sont exposés les animaux en s'appuyant sur les avis de l'ANSES « Hiérarchisation de 103 maladies animales présentes dans les filières ruminants, équidés, porcs, volailles et lapins en France métropolitaine » du 12 juin 2012 et « Méthodologie de hiérarchisation des maladies animales ; application aux agents pathogènes exotiques pour la France métropolitaine » du 26 janvier 2012.*

Les dangers sanitaires de première catégorie ont été regroupés dans l'annexe I.a qui regroupe :

- *les maladies ayant fait l'objet d'un avis de l'ANSES et retenues en première catégorie ;*
- *les maladies des filières n'ayant pas fait l'objet d'un avis de l'ANSES (maladies des poissons, crustacés, abeilles, carnivores domestiques...) mais précédemment classées maladies réputées contagieuses. Ces maladies sont repérées par un astérisque (*).*

Une annexe I.b a été créée pour accueillir les dangers sanitaires émergents.

Les dangers sanitaires de deuxième catégorie sont listés dans l'annexe II qui regroupe les dangers sanitaires d'intérêt collectif réglementés ou devant faire l'objet d'un signalement à l'OIE ou à la Commission européenne et les maladies faisant l'objet d'un programme collectif volontaire reconnu.

Références : *le présent arrêté peut être consulté sur le site Légifrance (http://www.legifrance.gouv.fr).*

Le ministre de l'agriculture, de l'agroalimentaire et de la forêt,

Vu la directive 90/425/CEE du Conseil du 26 juin 1990 relative aux contrôles vétérinaires et zootechniques applicables dans les échanges intracommunautaires de certains animaux vivants et produits dans la perspective de la réalisation du marché intérieur ;

Vu la directive 92/119/CEE du Conseil du 17 décembre 1992 établissant des mesures communautaires générales de lutte contre certaines maladies animales ainsi que des mesures spécifiques à l'égard de la maladie vésiculeuse du porc ;

Vu le code rural et de la pêche maritime, notamment les articles L. 201-1 et D. 201-1 à D. 201-4 ;

Vu l'avis de l'Agence nationale de sécurité sanitaire, de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif à la « méthodologie de hiérarchisation des maladies animales ; application aux agents pathogènes exotiques pour la France métropolitaine » en date du 26 janvier 2012 ;

Vu l'avis de l'Agence nationale de sécurité sanitaire, de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif à la « hiérarchisation de 103 maladies animales présentes dans les filières ruminants, équidés, porcs, volailles et lapins en France métropolitaine » en date du 12 juin 2012 ;

Vu l'avis du Conseil national d'orientation de la politique sanitaire animale et végétale en date du 13 juin 2013,

Arrête :

Art. 1er. – La liste des dangers sanitaires de première catégorie pour les espèces animales est définie à l'annexe I.a.

La liste des dangers sanitaires émergents de première catégorie pour les espèces animales est définie à l'annexe I.b.

Art. 2. – Le ministre chargé de l'agriculture peut inscrire provisoirement à l'annexe I.b un danger sanitaire émergent. La catégorisation d'un tel danger doit être révisée, à l'issue d'une période maximale de trois ans, sur la base d'une évaluation scientifique de l'Agence nationale de sécurité sanitaire, de l'alimentation, de l'environnement et du travail.

Un danger sanitaire est considéré comme émergent s'il répond à la définition qui en est donnée par l'Organisation mondiale de la santé animale (OIE), en particulier si l'émergence résulte :

– soit de l'évolution ou de la modification d'un agent pathogène existant ;
– soit d'une infection connue se propageant à une nouvelle aire géographique ou à une nouvelle population ;
– soit de la présence d'un agent pathogène non identifié antérieurement.

Le ministre chargé de l'agriculture peut inscrire en tant que danger sanitaire émergent une maladie ayant des répercussions graves sur la santé animale ou sur la santé publique, dont le diagnostic est posé pour la première fois avant que l'agent étiologique n'ait été identifié. Dans ce cas le danger est uniquement désigné par le nom de la maladie qu'il provoque.

Art. 3. – La liste des dangers sanitaires de deuxième catégorie pour les espèces animales est définie à l'annexe II.

La déclaration de l'apparition de certains dangers sanitaires de deuxième catégorie peut être obligatoire. Elle est alors réalisée auprès de l'autorité administrative désignée dans la colonne intitulée « Destinataire de la déclaration quand elle est obligatoire » de l'annexe II.

Art. 4. – L'arrêté du 20 novembre 2007 relatif aux mesures de lutte contre *Trypanosoma evansi* ou *surra* est abrogé.

Art. 5. – Le directeur général de l'alimentation et les préfets sont chargés, chacun en ce qui le concerne, de l'exécution du présent arrêté, qui sera publié au *Journal officiel* de la République française.

Fait le 29 juillet 2013.

Pour le ministre et par délégation :
Le directeur général adjoint
de l'alimentation,
chef du service de la coordination
des actions sanitaires,
J.-L. ANGOT

ANNEXES

ANNEXE I.a

DANGERS SANITAIRES DE PREMIÈRE CATÉGORIE POUR LES ESPÈCES ANIMALES

DÉNOMINATION	DANGER SANITAIRE VISÉ	ESPÈCES VISÉES
Anémie infectieuse des équidés	Virus de l'anémie infectieuse des équidés *(Retroviridae Lentivirus)*	Equidés
Anémie infectieuse du saumon	Virus de l'anémie infectieuse du saumon *(Orthomyxoviridae, Isavirus)*	Saumon atlantique *(Salmo salar),* truite arc-en-ciel *(Oncorhynchus mykiss),* truite fario *(Salmo trutta)*
Botulisme	*Clostridium botulinum*	Toutes espèces sensibles
Brucellose	Toute Brucella autre que *Brucella ovis* et *Brucella suis sérovar 2*	Toutes espèces de mammifères

DÉNOMINATION	DANGER SANITAIRE VISÉ	ESPÈCES VISÉES
Clavelée	Virus de la clavelée *(Poxviridae, Capripoxvirus)*	Ovins
Dermatose nodulaire contagieuse	Virus de la dermatose nodulaire contagieuse *(Poxviridae, Capripoxvirus)*	Bovins
Encéphalite à virus Nipah	Virus Nipah *Paramyxoviridés Henipavirus*	Porcins, félins, canins
Encéphalite japonaise	Virus de l'encéphalite japonaise *(Flaviviridae, Flavivirus)*	Equidés, porcins, volailles
Encéphalites virales de type Est et Ouest	Virus de l'encéphalomyélite virale de l'Est et de l'Ouest *(Togaviridae, Alphavirus)*	Equidés
Encéphalite virale de type Venezuela	Virus de l'encéphalomyélite virale du Venezuela *(Togaviridae, Alphavirus)*	Equidés
Encéphalite West-Nile	Virus West-Nile *(Flaviviridae, Flavivirus)*	Equidés et oiseaux
Encéphalopathie spongiforme bovine (ESB)	Prion ou agent de l'encéphalopathie spongiforme bovine	Bovins, ovins, caprins
Encéphalopathies spongiformes transmissibles	Prions ou agents des encéphalopathies spongiformes transmissibles	Toutes espèces sensibles
Fièvre aphteuse	Virus de la fièvre aphteuse *(Picornaviridae, Aphtovirus)*	Toutes espèces animales sensibles
Fièvre Catarrhale ovine	Virus de la fièvre catarrhale du mouton *(Reoviridae, Orbivirus)* Tous sérotypes	Ruminants et camélidés
Fièvre charbonneuse	*Bacillus anthracis*	Toutes espèces de mammifères
Fièvre de la vallée du Rift	Virus de la fièvre de la vallée du Rift *(Bunyaviridae, Phlebovirus)*	Ruminants et camélidés
Herpèsvirose de la carpe (*)	Virus de l'herpèsvirose de la carpe *(Herpesviridae, Herpesvirus)*	Carpes *(Cyprinus carpio)*
Infection à *Bonamia exitiosa* (*)	*Bonamia exitiosa*	Huîtres plates (australienne et du Chili)
Infection à *Bonamia ostreae* (*)	*Bonamia ostreae*	Huîtres plates (européenne, australienne, du Chili, du Pacifique, asiatique et d'Argentine)
Infection à *Marteilia refringens* (*)	*Marteilia refringens*	Huîtres plates (australienne, du Chili, européenne, d'Argentine) et moule (commune et méditerranéenne)
Infection à *Perkinsus marinus* (*)	*Perkinsus marinus*	Huîtres japonaises et de l'Atlantique
Infection à *Microcytos mackini* (*)	*Microcytos mackini*	Huîtres plates (européenne et du Pacifique), huîtres japonaises et de l'Atlantique
Infestation due à *Aethina tumida* (*)	*Aethina tumida*	Abeilles domestiques *(Apis mellifera)*
Infestation due à *Tropilaelaps* (*)	*Tropilaelaps clareae*	Abeilles domestiques *(Apis mellifera)*
Influenza aviaire faiblement pathogène	Virus de l'influenza aviaire *(Orthomyxoviridae, Influenza A.)* de sous-type H5, H7 faiblement pathogène	Toutes espèces d'oiseaux de la catégorie volailles et oiseaux captifs
Influenza aviaire hautement pathogène	Virus de l'influenza aviaire *(Orthomyxoviridae, Influenza A)* hautement pathogène	Toutes espèces d'oiseaux

DÉNOMINATION	DANGER SANITAIRE VISÉ	ESPÈCES VISÉES
Loque américaine (*)	*Paenibacillus larvae*	Abeilles domestiques *(Apis mellifera)*
Maladie d'Aujeszky	Herpès virus du porc *(Herpesviridae, Varicellovirus)*	Toutes espèces de mammifères
Maladie de la tête jaune (*)	Virus de la maladie de la tête jaune *(Roniviridae, Okavirus)*	Crevette brune *(Penaeus aztecus),* crevette rose (Penaeus duorarum), crevette kuruma *(Penaeus japonicus),* crevette tigrée brune (Penaeus monodon), crevette ligubam du Nord *(Penaeus setiferus),* crevette bleue *(Penaeus stylirostris),* crevette à pattes blanches du Pacifique *(Penaeus vannamei)*
Maladie de Newcastle	Virus de la maladie de Newcastle *(Paramyxoviridae, Avulavirus)*	Toutes espèces d'oiseaux de la catégorie volailles
Maladie des points blancs (*)	Virus de la maladie des points blancs *(Nimaviridae, Whispovirus)*	Crustacés décapodes
Maladie de Teschen	Enterovirus porcin *(Picornaviridae, Teschovirus)*	Porcins
Maladie hémorragique épizootique des cervidés	Virus de la maladie épizootique des cervidés *(Reoviridae, Orbivirus)*	Ruminants
Maladie vésiculeuse du porc	Virus de la maladie vésiculeuse du porc *(Picornaviridae, Enterovirus)*	Suidés
Nécrose hématopoïétique infectieuse (*)	Virus de la nécrose hématopoïétique infectieuse *(Rhabdoviridae, Novirhabdovirus)*	Saumons : atlantique (S. salar), keta (O. keta), argenté (O. kisutch), japonais (O. masou), sockeye (O. nerka), chinook (O. tshawytscha), truite biwamasou (O. rhodurus) et truite arc-en-ciel (O. mykiss)
Nécrose hématopoïétique épizootique (*)	Virus de la nécrose hématopoïétique épizootique *(Iridoviridae, Ranavirus)*	Truites arc-en-ciel (O. mykiss) et perche commune *(Perca fluviatilis)*
Nosémose des abeilles (*)	*Nosema apis*	Abeilles domestiques *(Apis mellifera)*
Péripneumonie contagieuse bovine	*Mycoplasma mycoides* subspecies *mycodies*	Bovinés
Peste bovine	Virus de la peste bovine *(Paramyxoviridae, Morbillivirus)*	Ruminants et suidés
Peste des petits ruminants	Virus de la peste des petits ruminants *(Paramyxoviridae, Morbillivirus)*	Ovins et caprins
Peste équine	Virus de la peste équine *(Reoviridae, Orbivirus)*	Equidés
Peste porcine africaine	Virus de la peste porcine africaine *(Asfarviridae, Asfivirus)*	Suidés
Peste porcine classique	Virus de la peste porcine classique *(Flaviviridae, Pestivirus)*	Suidés
Rage	Virus de la rage *(Rhabdoviridae, Lyssavirus)*	Toutes espèces de mammifères
Salmonellose aviaire	*Salmonella Enteritidis, Salmonella Hadar, Salmonella Infantis, Salmonella Typhimurium, Salmonella Virchow*	Oiseaux des espèces *Gallus gallus* et *Meleagris gallopavo*
Septicémie hémorragique virale (*)	Virus de la septicémie hémorragique virale *(Rhabdoviridae, Novirhabdovirus)*	Saumons du Pacifique, truites arc-en-ciel et fario, brochets, corégones, ombres communs, turbots, morues de l'Atlantique et du Pacifique, harengs, aiglefins et sprats. Motelle *(Onos motellus)* Cardeau hirame (Paralichthys olivaceus)

DÉNOMINATION	DANGER SANITAIRE VISÉ	ESPÈCES VISÉES
Stomatite vésiculeuse	Virus de la stomatite vésiculeuse *(Rhabdoviridae, Vesiculovirus)*	Bovins, équidés et suidés
Syndrome de Taura (*)	Virus du syndrome de Taura *(Dicistroviridae)*	Crevette ligubam du Nord *(Penaeus setiferus)*, crevette bleue *(Peneus stylirotris)* crevette à pattes blanches du Pacifique *(Peneus vannamei)*
Syndrome ulcéreux épizootique (*)	*Aphanomyces invadans*	Poissons exotiques des genres : Catla, Channa, Labeo, Mastacembelus, Mugil, Puntius et Trichogaster
Tuberculose	*Mycobacterium bovis, Mycobacterium caprae Mycobacterium tuberculosis*	Toutes espèces de mammifères
Variole caprine	Virus de la variole caprine *(Poxviridae, Capripoxvirus)*	Caprins
(*) Dangers sanitaires antérieurement maladies réputées contagieuses n'ayant pas encore fait l'objet d'un avis de l'ANSES.		

ANNEXE I.b

DANGERS SANITAIRES DE PREMIÈRE CATÉGORIE POUR LES ESPÈCES ANIMALES FAISANT L'OBJET D'UNE ÉMERGENCE ET INSCRITE À TITRE TEMPORAIRE POUR TROIS ANS MAXIMUM

DÉNOMINATION	DANGER SANITAIRE VISÉ	ESPÈCES VISÉES	DATE D'INSCRIPTION
Néant			

ANNEXE II

DANGERS SANITAIRES DE DEUXIÈME CATÉGORIE POUR LES ESPÈCES ANIMALES

DÉNOMINATION	DANGER SANITAIRE visé	ESPÈCES VISÉES	RÉGION FAISANT L'OBJET d'un programme collectif	DESTINATAIRE de la déclaration quand elle est obligatoire
Artérite virale équine	Virus de l'artérite équine *(Arteriviridae, Arterivirus).*	Equidés	France	Préfet
Arthrite encéphalite caprine	Virus de l'arthrite encéphalite caprine *(Retroviridae, Lentivirus)*	Caprins	France	
Brucellose porcine	*Brucella suis sérovar 2*	Porcins	France	Préfet
Chlamydophilose aviaire ou ornithose-psittacose	*Chlamydophila psittaci.*	Volailles et oiseaux captifs	France	Préfet
Frelon asiatique (*)	*Vespa velutina*	Abeilles domestiques *(Apis mellifera)*	France	Préfet
Hypodermose clinique	*Hypoderma bovis* ou *Hypoderma lineatum*	Bovins	France	Préfet
Leucose bovine enzootique	Virus de la leucose bovine enzootique *(Retroviridae, Deltaretrovirus)*	Bovins	France	Préfet
Maladie des muqueuses/diarrhée virale bovine	Pestivirus de la maladie des muqueuses *(Flaviviridae, pestivirus)*	Bovins	France	

DÉNOMINATION	DANGER SANITAIRE visé	ESPÈCES VISÉES	RÉGION FAISANT L'OBJET d'un programme collectif	DESTINATAIRE de la déclaration quand elle est obligatoire
Morve	*Burkholderia mallei*	Equidés	France	Préfet
Métrite contagieuse équine	*Taylorella equigenitalis*	Equidés	France	Préfet
Pullorose-typhose	*Salmonella Gallinarum Pullorum*	Volailles	France	Préfet
Rhinotrachéite infectieuse bovine	*Herpes-virus bovin BoHV-1*	Bovins	France	
Trichinellose	*Trichinella* spp.	Toute espèce animale sensible	France	Préfet
Tularémie	*Francisella tularensis*	Lièvre et autres espèces réceptives	France	Préfet
Varroose (*)	*Varroa destructor*	Abeilles domestiques *(Apis mellifera)*	France	Préfet
Visna-Maëdi	Virus du Visna-Maëdi	Ovins	France	

(*) Dangers sanitaires antérieurement maladies à déclaration obligatoire ou classées en danger sanitaire de deuxième catégorie n'ayant pas encore fait l'objet d'un avis de l'ANSES.

Annexe 2

Ordre de méthode

MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE ET DE L'ALIMENTATION

Direction générale de l'alimentation **Service des actions sanitaires en production primaire** **Sous-direction de la qualité, de la santé et de la protection des végétaux** **Sous-direction de la santé et de la protection animales** **251 rue de Vaugirard** **75 732 PARIS CEDEX 15** **0149554955**	**Instruction technique** **DGAL/SASPP/2018-444** **12/06/2018**

Date de mise en application : Immédiate
Diffusion : Tout public

Cette instruction abroge :
DGAL/SDQPV/2014-899 du 19/11/2014 : Surveillance des mortalités massives aiguës et des maladies, classées dangers sanitaires de première catégorie des abeilles.
Cette instruction ne modifie aucune instruction.
Nombre d'annexes : 14

Objet : Surveillance des mortalités massives aiguës d'abeilles adultes avec hypothèse d'intoxication par des produits et pratiques phytopharmaceutiques, biocides et médicamenteuses.

Destinataires d'exécution
DRAAF DAAF DDT(M) DD(CS)PP DRIAAF

Résumé : A partir des observations et déclarations d'apiculteurs, la présente instruction vise à détecter les causes de mortalités massives aiguës d'abeilles domestiques adultes par intoxication pouvant être imputées aux produits phytopharmaceutiques, biocides et médicaments vétérinaires. Elle définit les circonstances et modalités de déclaration des mortalités aiguës des abeilles, en saison de production ou pendant l'hiver, à la DDecPP. Elle précise les modalités d'investigations

ainsi que les conditions de recueil et de traitement des informations, de leur communication et des suites à donner.
Les évolutions apportées au dispositif par rapport à la précédente instruction s'appuient sur les recommandations du rapport d'évaluation de l'Anses par la méthode OASIS, les retours d'expérience et les réflexions engagées sur ces bases par un groupe de travail dédié, constitué dans le cadre de la plateforme d'Epidémiosurveillance en Santé Animale (ESA). Ces évolutions sont d'effet immédiat. Ces dispositions sont amenées à être complétées les années suivantes sur la base des préconisations du groupe de travail précité.

Textes de référence : Code rural et de la pêche maritime, notamment l'article L. 251-1.

SURVEILLANCE RENOVEE DE LA MORTALITE MASSIVE AIGUE DES ABEILLES : CONTEXTE

Le dispositif officiel de surveillance et de suivi des mortalités des abeilles a été instauré dans les années 80 et a fait l'objet, depuis cette date, de plusieurs adaptations.

Suite aux débats et interrogations soulevés début 2017 par la publication des résultats et conclusions de ce dispositif, l'ANSES a été saisie par la DGAL pour conduire une évaluation du dispositif de surveillance des mortalités massives aiguës des abeilles en France métropolitaine, dans le cadre de la Plateforme d'Epidémiosurveillance en Santé Animale (Plateforme ESA), selon la méthode OASIS (https://www.plateforme-esa.fr/outils-et-methodes-methodes-oasis). Les résultats et conclusions de cette évaluation ont été présentés au comité d'expert apicole du CNOPSAV[1] le 26 octobre 2017. Lors de cette réunion, l'intérêt de ce dispositif a été confirmé et il a été décidé que la note de service du 14 novembre 2014 ferait l'objet d'une révision. Un groupe de travail dédié a ainsi été constitué, dans le cadre de la Plateforme ESA, rassemblant des scientifiques, des représentants d'organisations professionnelles et syndicales apicoles, de l'ITSAP-Institut de l'abeille, de l'ANSES, de l'administration centrale et des services déconcentrés du ministère en charge de l'agriculture.

La présente note de service est issue des travaux de ce groupe pour une première phase de rénovation du dispositif dès l'année 2018 qui vise à :

- clarifier et repréciser les objectifs et les conditions d'intervention des services de l'Etat dans le cadre du dispositif de surveillance des mortalités massives et aiguës des abeilles domestiques. En particulier le suivi des dangers sanitaires de première catégorie ne figure plus au titre des objectifs du dispositif.
- prendre en compte les améliorations immédiatement ou rapidement disponibles et formulées dans le rapport de l'ANSES d'octobre 2017.

Des évolutions ultérieures sont envisagées dans le cadre de ce groupe de travail, concernant notamment la définition des cas suspects d'intoxication à explorer et la possibilité de surveillance des co-expositions (dont les effets synergiques). Ces évolutions possibles ne concerneront pas la campagne apicole 2018.

OBJECTIFS DU DISPOSITIF

A partir des observations et déclarations d'apiculteurs, ce dispositif de surveillance vise à détecter et caractériser les mésusages, les effets non intentionnels et les accidents dans le process de fabrication de produits phytopharmaceutiques, de biocides et de médicaments vétérinaires en recensant et en investiguant les ruchers atteints de mortalités massives aiguës d'abeilles domestiques adultes (MMAA).

I - DEFINITIONS

Un rucher est considéré comme atteint d'une mortalité massive aiguë d'abeilles adultes lorsque, brutalement et sur une période inférieure à 15 jours :

- au moins 20% des colonies ou au moins 1 colonie lorsque le rucher en compte 2 à 5 ou 2 lorsqu'il en compte 6 à 10 sont atteintes de MMAA.

Une colonie est considérée victime de mortalité massive aiguë d'abeilles adultes (MMAA) lorsque, brutalement et sur une période inférieure à 15 jours, une des caractéristiques suivantes est vérifiée :

- des abeilles adultes sont retrouvées mortes ou moribondes sous forme d'un tapis devant ou dans la ruche (volume d'abeilles touchées supérieur à un litre),
- la colonie est victime de dépopulation (hors essaimage), c'est à dire qu'il y a disparition d'une grande partie des abeilles adultes avec présence dans la ruche d'une population très réduite d'abeilles avec présence de couvain, de réserves de miel et de pollen en quantité.

1 CNOPSAV= Conseil national d'orientation de la politique sanitaire animale et végétale

Les mortalités constatées en fin d'hiver ne sont pas à considérer comme des phénomènes de mortalité aiguë s'il n'est pas possible de les positionner dans une période précise permettant de définir leur caractère aigu, c'est-à-dire des troubles brutaux apparus en moins de 15 jours.

Les phénomènes de dépérissement ou d'affaiblissement ne sont actuellement pas pris en compte dans ce dispositif, du fait de leur caractère non aigu.

Mortalités massives aiguës groupées : mortalités massives aiguës survenant, dans plusieurs ruchers, dans une période et une zone géographique données, faisant suspecter une origine commune.

II. MODALITES DE DECLARATION D'UN RUCHER ATTEINT DE MMAA

Voir schéma figurant en annexe I.

II – A : Personnes appelées à déclarer un rucher atteint de MMAA

Le dispositif de surveillance repose sur la déclaration volontaire, par les détenteurs ou propriétaires de ruches ou les personnes responsables du suivi de colonies, des ruchers potentiellement atteints de MMAA, tels que définis au chapitre précédent.

Ces déclarants peuvent, à leur initiative, être assistés dans leur démarche par les vétérinaires, les techniciens sanitaires apicoles (TSA), les laboratoires compétents en pathologie apiaire ou en recherche des substances toxiques pour les abeilles, les organismes à vocation sanitaire (OVS), les organisations sanitaires départementales (OSAD) ou les associations de développement de l'apiculture (ADA).

Les ruchers victimes d'événements de santé autres que des MMAA (par exemple les ruchers victimes de mortalités apparaissant en période hivernale sans caractère aigu ou de mortalités nymphales ou larvaires), ne sont actuellement pas couverts par le présent dispositif de surveillance. Les apiculteurs sont toutefois invités à les signaler aux Directions Départementales en charge de la Protection des Populations (DD(CS)PP) qui en assureront le recensement et l'enregistrement. Pour ces autres cas, il est conseillé à l'apiculteur de se rapprocher de son vétérinaire ou organisation sanitaire pour élucider les troubles de santé.

Toutefois, des investigations spécifiques d'événements de santé autres que des MMAA peuvent être menées à l'initiative des services déconcentrés (DD(CS)PP et/ou Direction Régionale de l'Alimentation, de l'Agriculture et de la Forêt [DRAAF]), notamment en cas d'événements de santé groupés dans le temps ou dans l'espace, avec si besoin, la possibilité de recourir à l'appui du niveau national.

Par ailleurs, il est rappelé que toute suspicion de danger sanitaire de première catégorie (Loque Américaine [*Paenibacillus larvae*], Nosémose à *Nosema apis*, Petit coléoptère de la ruche [*Aethina tumida*] et *Tropilaelaps spp.*) est à déclaration obligatoire auprès de la DD(CS)PP.

II- B : Guichet unique auquel sont adressées les déclarations

La DD(CS)PP constitue dans ce dispositif le guichet unique auquel sont adressées les déclarations, à l'exception des régions où le dispositif OMAA (Observatoire des Mortalités et des Affaiblissements de l'Abeille mellifère) est déployé[2]. Dans ces régions, c'est le guichet unique de l'OMAA qui réceptionne et enregistre les déclarations et qui signale le cas de MMAA à la DD(CS)PP et à la DRAAF.

L'agent en charge de la réception des déclarations remplit la fiche de déclaration révisée et jointe en annexe II et l'enregistre dans le fichier fourni en annexe XIII. Cet enregistrement est réalisé quelles que soient les suites qui sont données à la déclaration. L'agent remplit autant de fiches de déclaration que de ruchers impactés.

2 https://www.plateforme-esa.fr/page/observatoire-des-mortalites-et-des-affaiblissements-de-l-abeille-mellifere-omaa

En parallèle et dès réception, la fiche de déclaration est adressée systématiquement au DRAAF-SRAL pour le tenir informé du cas et de la localisation géographique du rucher impacté.

II - C : Expertise des déclarations à l'initiative des DD(CS)PP

Afin d'identifier les cas de ruchers déclarés mais non compatibles avec une hypothèse d'intoxication aiguë (ex : tableau clinique compatible avec une famine) et non investigués dans le cadre du présent dispositif, la fiche de déclaration est transmise pour expertise à un agent de la DD(CS)PP ou de la DRAAF compétent en apiculture ou à défaut à un vétérinaire apicole assisté, si besoin, d'un TSA.

Si des éléments utiles ne figurent pas dans la déclaration, l'agent en charge de l'expertise peut les rechercher, sans devoir se déplacer, en se mettant en relation avec le déclarant ou avec toute autre personne susceptible de les lui donner.

Cette expertise doit être conduite dans les plus brefs délais suite à la réception de la déclaration.

Les cas de ruchers victimes de MMAA non compatibles avec une hypothèse d'intoxication aiguë ne font pas l'objet de suites au titre de la présente instruction. Cette décision n'empêche pas son enregistrement. Une information est faite à l'apiculteur et il lui est conseillé de se rapprocher de son vétérinaire ou organisation sanitaire pour élucider le trouble de santé.

Le document d'appui fourni en annexe III est une aide, pour l'agent, pour identifier les cas de MMAA.

Au cas où les déclarations de ruchers atteints de mortalités massives aiguës se multiplient sur une région donnée et que ces mortalités peuvent être considérées comme groupées, la DD(CS)PP en informe immédiatement la DGAL (point de contact : Référent national en apiculture de la DGAl et copie du message à « sdqspv.dgal@agriculture.gouv.fr », « sdspa.dgal@agriculture.gouv.fr » et « bsa.sdspa.dgal@agriculture.gouv.fr »).

III - ENQUETES ET GESTION

À toute étape de l'enquête, les services instructeurs ou l'apiculteur peuvent décider de recourir à une procédure judiciaire. Ils se chargent d'en informer chacune des personnes impliquées dans l'enquête. L'apiculteur est prévenu dès le début de l'enquête administrative de cette nécessité de prévenir les services en cas de suite judiciaire envisagée.

III – A Mise en œuvre des enquêtes

III – A - 1 Objectifs des enquêtes

Les enquêtes conduites par la DD(CS)PP et le DRAAF-SRAL ont pour objectifs :

- de vérifier que le rucher est bien victime d'une MMAA, telle que définie au point I.
- de vérifier que les caractéristiques de l'événement de santé sont compatibles avec une hypothèse d'intoxication,
- si les deux premiers points sont vérifiés, d'établir un lien entre l'application des produits phytopharmaceutiques ou d'autres produits toxiques, y compris les antiparasitaires et les biocides utilisés en élevage ou à proximité, et l'événement de santé constaté sur le rucher.

Pour cela, plusieurs types d'enquêtes complémentaires peuvent être mises en œuvre, notamment une enquête sur le rucher (point III-A-2) et une enquête environnementale (point III-A-3).

III – A - 2 Enquête sur le rucher et prélèvements

Modalités de mise en œuvre de l'enquête sur le rucher

Les ruchers atteints de MMAA dont l'hypothèse d'intoxication ne peut être écartée peuvent faire l'objet d'une visite d'investigation décidée par la DD(CS)PP, éventuellement en relation avec la DRAAF. Le délai entre la survenue de l'événement de santé et la déclaration est à prendre en compte pour évaluer la pertinence d'engager une enquête (il est important que la déclaration intervienne le plus tôt possible après constatation de l'événement de santé pour maximiser les chances de confirmation d'une suspicion d'intoxication). Cette visite peut être réalisée par un agent de la DD(CS)PP formé en apiculture ou par un vétérinaire reconnu compétent en apiculture, missionné par la DD(CS)PP et qui peut intervenir en collaboration avec un TSA.

L'investigateur se rend sur les lieux du rucher, de préférence dans les 48 heures après la déclaration, afin de l'inspecter et de procéder aux prélèvements adaptés. Il veille à demander à l'apiculteur si celui-ci s'est engagé dans une procédure judiciaire ou s'il a l'intention de le faire.

Cette visite est réalisée en concertation avec le correspondant « abeilles » du DRAAF-SRAL ou, si nécessaire, en sa compagnie.

Lors de l'enquête du rucher, les dégâts sont recensés et sa localisation géoréférencée. Une fiche d'investigation est établie suivant le modèle révisé figurant en annexe IV.

L'enquêteur se renseigne également sur les ruchers à proximité et prend, si besoin, contact avec les apiculteurs voisins afin de savoir s'ils sont également touchés par une MMAA. Au cas où il s'agit de mortalités groupées au sens de la définition figurant au chapitre I, l'enquêteur en avertit immédiatement la DD(CS)PP et la DRAAF qui en informe la DGAL. La DGAL peut alors décider d'en alerter à son tour l'ANSES, et procéder à un renforcement de l'enquête.

Si plusieurs ruchers d'un même apiculteur sont affectés par les troubles, plusieurs enquêtes peuvent être réalisées.

Sauf si l'enquête met en évidence des pratiques délictuelles dont l'information au procureur de la république est obligatoire, il est important d'amener l'apiculteur et ses représentants à s'inscrire dans une approche de pédagogie dont le but essentiel est la connaissance des origines des mortalités.

À l'issue de la visite du ou des ruchers, la ou les fiches d'investigation (annexe IV) dûment renseignées sont transmises sans délai, par la DD(CS)PP ou le vétérinaire missionné, au DRAAF-SRAL pour information et suites éventuelles à donner.

Le prélèvement d'abeilles atteintes

En cas de suspicion d'intoxication, un prélèvement d'abeilles atteintes est réalisé en qualité et en quantité suffisantes en vue d'une recherche toxicologique. Cette recherche participe à vérifier l'exposition des abeilles à des molécules potentiellement toxiques, et contribue à évaluer, le cas échéant, le niveau d'exposition (cf. point III-B).

Si le prélèvement n'est pas possible ou s'il ne peut être de bonne qualité, l'enquête environnementale peut être menée à l'initiative des services déconcentrés pour rechercher des sources d'exposition potentielles et surveiller les pratiques agricoles. Toutefois, toute possibilité de conclure avec certitude à une intoxication massive et aiguë d'abeilles apparaît compromise.

Un prélèvement d'abeilles sur une colonie du rucher impacté mais ne manifestant pas de signes cliniques peut aussi être réalisé afin d'aider à la compréhension de l'événement de santé.

Le prélèvement d'abeilles mortes ou moribondes pour recherche toxicologique est :

1. à réaliser le plus tôt possible après la déclaration et au mieux dans les 48 heures, et dans la mesure du possible ruche par ruche. Des prélèvements plus tardifs (>48H) sont possibles mais diminuent fortement les possibilités de prouver une intoxication.

2. à effectuer, si possible, en trois exemplaires homogènes de 50g (environ 500 abeilles) pour permettre les contre-expertises. Dans ce cas, un échantillon est envoyé par la DD(CS)PP à l'analyse, un échantillon scellé est conservé par l'apiculteur, et un échantillon scellé est conservé par la DD(CS)PP. Dans le cas où cette matrice apicole n'est pas disponible en quantité suffisante, le prélèvement de 50g peut être réalisé en un seul exemplaire. En cas d'impossibilité de collecter 50g, un prélèvement de plus faible quantité est à réaliser. Dans ce cas, il convient de se rapprocher du laboratoire, avant l'envoi, pour identifier les possibilités et les limites de son analyse.

Si nécessaire et pour le diagnostic différentiel, un prélèvement complémentaire de 100 abeilles est effectué pour analyse en vue de la recherche de maladies.

Des prélèvements de nectar frais, de pollen de trappe ou de pain d'abeilles frais sont aussi possibles et leur réalisation reste à l'appréciation de l'investigateur dans les ruchers.

La fiche de prélèvements complétée est contresignée par l'apiculteur. Les prélèvements sont transportés dans une glacière garnie de plaques réfrigérantes avant d'être stocké au congélateur.

Pour plus de détails sur les modalités de prélèvements, se référer à l'annexe V révisée.

Analyse des matrices apicoles prélevées

Dès lors qu'une suspicion d'intoxication est actée, une analyse systématique de matrices apicoles est réalisée pour recherche de substances chimiques. Les molécules à analyser sont identifiées par l'enquête environnementale (cf. point III-A-4). En cas d'absence d'enquête ou d'enquête environnementale non conclusive, des analyses multi-résidus sont systématiquement demandées.

Retour d'information à destination de l'apiculteur

À l'issue de l'enquête sur le rucher, la DD(CS)PP adresse à l'apiculteur un courrier sur le modèle joint en annexe VI, et en transmet une copie à la DRAAF. Ce courrier l'informe de l'état d'avancement de son dossier, des premiers résultats obtenus et lui précise si une enquête environnementale est diligentée et quels sont ses interlocuteurs en DD(CS)PP et DRAAF-SRAL.

III - A –3 L'enquête environnementale

L'enquête environnementale a pour objectif d'identifier les possibilités d'exposition des colonies aux substances chimiques utilisées et ayant pu causer des mortalités (produits phytopharmaceutiques, médicaments, biocides) et d'avoir un retour sur les pratiques agricoles de la zone de butinage afin de détecter les utilisations de produits interdits, les détournements d'usage, les mésusages, les effets non intentionnels et accidents dans le process de fabrication de produits phytopharmaceutiques, biocides et médicaments vétérinaires.

L'enquête environnementale peut comporter deux volets :
- un premier volet associé aux cultures végétales et lié aux produits et pratiques phytopharmaceutiques et de fertilisation des cultures (épandages de lisiers, fumiers…), nommé ci-après « investigation végétale ». La décision de réaliser une « investigation végétale » est prise par la DRAAF en relation avec la DD(CS)PP, notamment lorsque le cas suspect peut contribuer à identifier des infractions aux règles d'application des produits phytopharmaceutiques ou lorsqu'elle semble révéler l'émergence d'une pathologie liée à des substances toxiques. La DRAAF peut décider, à tout moment, de réaliser des enquêtes végétales sur la base des fiches de déclaration des apiculteurs ou des fiches d'investigation. Elle peut aussi les réaliser sur certaines cultures ciblées en cas de doute sur des pratiques culturales ou sur des cultures potentiellement à risque pour les abeilles, le cas échéant sur une zone géographique préalablement identifiée.
- un second volet associé directement aux élevages en tant que source potentielle d'exposition des colonies aux traitements médicamenteux et/ou biocides, nommé ci-après « investigation élevage ». La décision d'investigation du domaine animal relève de la compétence de la DD(CS)PP ou de la DRAAF.

Dans tous les cas, les services coopèrent pour coordonner leurs actions.

La cartographie de la zone d'enquête

Une analyse des pratiques agricoles est réalisée dans la zone de butinage des abeilles (rayon de 3 kilomètres autour du rucher). Ce rayon peut être plus limité en fonction des territoires enquêtés, de la zone de butinage et de la ressource alimentaire et hydrique disponible. Pour l'accomplir, l'enquêteur doit disposer d'une cartographie du parcellaire agricole de la zone comprenant les noms, adresses et téléphones des agriculteurs concernés et les espèces végétales cultivées. Ces éléments sont issus des déclarations PAC de l'année précédente et sont à demander par le DRAAF-SRAL à la Direction Départementale des Territoires (DDT). Pour les cultures et autres sources d'exposition non déclarées à la PAC, les données seront complétées par une enquête sur les territoires. Les DRAAF-SRAL sont donc invités à contacter les DDT pour établir la procédure à mettre en œuvre en cas de nécessité d'enquête de ce type. Les DD(CS)PP disposent des informations utiles pour mener à bien les enquêtes en élevage (localisation, types d'élevage, pratiques d'élevage).

L'enquête végétale proprement dite

Pour répondre aux objectifs, l'enquête végétale conduite par le SRAL, est réalisée par des agents expérimentés en contrôle des pratiques agricoles, directement sur le terrain à la rencontre des professionnels et en suivant la procédure décrite à l'annexe VII. Elle est conduite de façon pédagogique pour comprendre l'origine des mortalités mais de façon de préférence inopinée. Elle vise notamment à identifier si des traitements ou pratiques « à risque » ont été opérés récemment dans l'aire de butinage du rucher, à identifier les produits phytopharmaceutiques utilisés, et les pratiques d'épandage de fertilisants d'origine animale.

En cas de pratiques non réglementaires identifiées et qui peuvent expliquer les mortalités (utilisation de produit interdit, détournement d'usage, non-respect des dispositions réglementaires sur l'utilisation des produits phytopharmaceutiques), des suites judiciaires et administratives appropriées sont engagées.
Lorsque l'enquête environnementale met en évidence la détection ou l'utilisation, par des exploitants agricoles, de produits phytopharmaceutiques non autorisés en France et susceptibles d'avoir été achetés via des réseaux illicites organisés, les SRAL en informent la Brigade nationale d'enquêtes vétérinaires et phytosanitaires (BNEVP).

Des prélèvements contradictoires de végétaux peuvent être réalisés en trois exemplaires et dans les plus brefs délais par des agents habilités et assermentés. Leur analyse chimique permet d'identifier les possibilités d'exposition des colonies aux substances recherchées sur matrices végétales.

Un modèle de procès-verbal de prélèvement de végétaux figure en annexe VIII.

Si des cultures à risque ont été identifiées et/ou des traitements sont suspectés suite à la visite des services de la DD(CS)PP sur le rucher, du vétérinaire missionné ou d'un TSA, l'agent du DRAAF-SRAL doit se rendre sur place sans attendre la réception des documents cartographiques, pour réaliser les prélèvements de préférence moins de 72 heures après l'enregistrement de la déclaration. Les coordonnées du ou des exploitants concernés devront lui être préalablement communiquées. Lors de sa visite, il évaluera la présence d'autres cultures à risque dans la zone de butinage, qui n'auraient pas été préalablement signalées, et effectuera les prélèvements de végétaux adaptés.

Après réalisation, les prélèvements de végétaux sont placés dans une glacière avec des plaques réfrigérantes et mis en congélation dès l'arrivée dans les locaux de la DRAAF.

La méthode de prélèvement et de conservation des échantillons est détaillée dans l'ordre de service de « méthode d'inspection pour le contrôle de la distribution et de l'utilisation des produits phytopharmaceutiques ».

L'enquête élevage proprement dite

Cette enquête vise à identifier une exposition à certains antiparasitaires et biocides toxiques utilisés en élevage. Il est recommandé de la pratiquer en concertation avec les éleveurs sauf si des pratiques illégales sont soupçonnées. Elle consiste à recueillir des informations sur les substances utilisées en élevage ainsi que leurs conditions et périodes d'utilisation.

Le protocole de ce type d'enquête peut s'appuyer sur le modèle figurant en annexe IX.

III – A – 4 L'identification d'autres sources potentielles de produits chimiques

Lors des enquêtes végétales et animales, il est possible de mettre en évidence une source d'intoxication autre qu'agricole. L'exposition peut être d'origine alimentaire (butinage, abreuvement) mais elle peut être passive (ruches exposées aux poussières ou rejets dans l'environnement de substances chimiques ….). Elle peut aussi relever d'un acte de malveillance.

Les expositions d'origine industrielle (à l'exception des industries qui manipulent des produits phytopharmaceutiques) et à partir d'activités non professionnelles ne sont pas couvertes par ce dispositif de surveillance. Le cas échéant et en cas de suspicion d'une origine industrielle, une information pourra être transmise à la Direction Régionale de l'Environnement, de l'Aménagement et du Logement (DREAL) pour suites à donner.

III – A - 5 L'envoi des échantillons et définition des molécules à rechercher

Dès que l'enquête végétale est achevée, la DRAAF décide des suites analytiques toxicologiques qu'il convient de donner à l'enquête et établit une liste de molécules à rechercher, à la fois sur abeilles et sur végétaux.

Pour la recherche de substances d'origine phytopharmaceutique :

- Si l'enquête végétale permet de suspecter une ou plusieurs molécules spécifiques comme cause de la mortalité des abeilles, ces molécules doivent être recherchées prioritairement en mono-résidus, à la fois sur végétaux et sur abeilles. Si la quantité de prélèvement le permet, en complément, une analyse multi-résidus est systématiquement réalisée afin de mettre en évidence des molécules éventuellement non identifiées au cours de l'enquête environnementale.

- Si l'enquête végétale ne permet pas de suspecter une ou plusieurs molécules spécifiques comme cause de la mortalité des abeilles, les analyses multi-résidus sur végétaux doivent être, dans la mesure du possible, réalisées avant l'analyse des matrices apicoles afin de confirmer les déclarations des exploitants et évaluer les possibilités d'exposition des colonies. Les molécules identifiées sur végétaux pourront permettre d'orienter le laboratoire pour les recherches sur matrices apicoles. Dans le cadre d'une analyse multi-résidus sur matrice apicole, il est possible de demander au laboratoire d'abaisser les limites de détection et de quantification sur des molécules ciblées. Le laboratoire répondra molécule par molécule sur sa capacité à abaisser ses limites analytiques.
En l'absence de prélèvements de végétaux, une analyse multi-résidus sur matrices apicoles sera réalisée en orientant si possible le laboratoire sur les molécules identifiées lors de l'examen des registres phytopharmaceutiques.

La demande d'analyse toxicologique est réalisée par la DRAAF auprès du laboratoire référencé en annexe X qui l'informe des choix analytiques retenus (mono-résidus, multi-résidus) et de la liste des substances actives identifiées lors de l'enquête. Après étude et, le cas échéant, acceptation du devis par la DRAAF, les échantillons sont expédiés au laboratoire, sans rupture de la chaîne du froid, par la DD(CS)PP pour la partie «abeilles congelées » et par le DRAAF-SRAL pour la partie « végétaux congelés ». Les fiches de demande d'analyses sur abeilles et sur végétaux figurent respectivement en annexes XI et XII.

La DRAAF informe son homologue de la DD(CS)PP des résultats obtenus.

D'autres matrices apicoles pourront si besoin être prélevées et analysées, en fonction des situations.

Il est rappelé qu'en cas d'impossibilité de réaliser des prélèvements d'abeilles mortes ou moribondes, des investigations telles qu'une enquête végétale restent possibles à l'initiative des services déconcentrés.

Pour la réalisation du diagnostic différentiel dans le rucher ou pour tenir compte de la possibilité des effets synergiques qui peuvent déclencher une MMAA, des analyses pathologiques pour des agents vivants et potentiellement pathogènes bien identifiés peuvent être demandées. Elles sont proposées

par le vétérinaire ou par un agent de la DD(CS)PP compétent en apiculture en prenant en compte ses observations sur les colonies et son diagnostic. Leur prise en charge financière ne sera garantie par les services de l'État (DD(CS)PP, ou DRAAF) qu'à la condition qu'elles soient réalisées pour confirmer ou infirmer une suspicion d'intoxication préalablement validée par le vétérinaire ou un agent de la DD(CS)PP à l'issue de son examen clinique des colonies du rucher. En l'absence de suspicion d'intoxication consolidée, ces analyses ne seront pas financées par l'État mais pourront être réalisées avec une prise en charge financière par l'apiculteur.

III – B Interprétation des résultats

III - B – 1 Notion de DL50

La comparaison des résultats d'analyses sur abeilles mortes ou moribondes avec les Doses Létales 50 (DL50) des substances actives n'est pas un élément suffisant pour exclure la possibilité d'une intoxication. La DL50 est une dose d'exposition et est définie comme étant la dose d'une substance active qui, administrée à une population exposée, entraîne la mortalité de la moitié des individus pendant un temps donné (en général 48H). Elle diffère donc de la concentration en substance active identifiée dans le prélèvement d'abeilles analysé eu égard aux processus de métabolisation (*ante-mortem*) et de dégradation (*post-mortem*) des substances dans cette matrice apicole. Si la concentration retrouvée dans les abeilles est supérieure ou égale à la DL50, il est possible de conclure avec certitude à une intoxication aiguë. Dans le cas contraire, il n'est pas possible d'exclure avec certitude la possibilité d'une intoxication sur la seule base d'un résultat d'analyse.

III - B – 2 Eléments d'interprétation des résultats et conclusions d'enquête

L'enquête toxicologique est un exercice délicat et la conclusion finale d'intoxication doit prendre en compte de nombreux paramètres comme la question des délais entre l'exposition potentielle des abeilles et la réalisation des prélèvements de matrices apicoles (délai dépendant de la fréquence de suivi des colonies par l'apiculteur, de sa réactivité à transmettre sa déclaration et de l'intervention des investigateurs sur le terrain), la qualité du diagnostic différentiel dans le rucher, les résultats de l'enquête environnementale, la chronologie des événements, la qualité des prélèvements, les co-expositions et effets synergiques possibles et les résultats d'analyses sur matrices apicoles et végétales.

IV – ENREGISTEMENT, EXPLOITATION DES RÉSULTATS ET RETOUR DES INFORMATIONS VERS LES APICULTEURS ET LES AUTRES PARTIES PRENANTES AU NIVEAU RÉGIONAL

En l'absence de possibilité d'enregistrement des MMAA sous Sigal, la DD(CS)PP enregistre les déclarations de suspicion qui lui sont signalées dans le fichier fourni en annexe XIII. A terme, des possibilités de saisie dans le logiciel métier Résytal seront étudiées. La DD(CS)PP centralise les résultats des analyses de recherche de pathogènes demandées dans le cadre des différentes visites qu'elle réalise. Elle transmet au SRAL les éléments nécessaires à la réalisation des enquêtes pour suspicion d'intoxication.

Le DRAAF-SRAL est pour sa part destinataire des résultats d'analyses toxicologiques entreprises sur les matrices apicoles et végétales. Il rédige un rapport pour chaque enquête végétale réalisée et le transmet à la DD(CS)PP. Les inspections réalisées chez les agriculteurs et les résultats d'analyses sur végétaux sont enregistrées dans les logiciels métiers Résytal et Geudi.

Chaque intervention sur un rucher donne lieu à la rédaction d'un rapport de diagnostic vétérinaire rédigé par un vétérinaire ou un agent de l'Etat, et destiné aux services instructeurs (DD(CS)PP ; DRAAF).

Sans préjudice des éléments qui pourraient être communiqués à l'apiculteur en cours d'enquête par les services instructeurs, à l'issue des investigations, un courrier est adressé à l'apiculteur afin de lui restituer les résultats et les conclusions d'enquête, accompagné du rapport de diagnostic vétérinaire et des résultats d'analyses des matrices apicoles. La DD(CS)PP et la DRAAF, en lien avec le vétérinaire, se coordonnent pour la rédaction de ce courrier. Il peut être adressé à l'apiculteur soit par la DD(CS)PP soit par la DRAAF en fonction des accords entre services déconcentrés.

Le retour d'information vers les apiculteurs constitue la contrepartie indispensable à leur engagement dans le réseau de surveillance. Ce retour d'information peut être reporté en fonction des besoins de l'enquête et des exigences de confidentialité, notamment en cas de procédures judiciaires. Un retour d'information à destination des agriculteurs enquêtés doit être assuré pour restituer leurs résultats en cas de prélèvement de végétaux et favoriser la bonne acceptation et compréhension du dispositif de surveillance.

Autant que faire se peut, un retour d'information collectif sur les enquêtes menées est réalisé, au niveau régional, auprès des organisations apicoles, des agriculteurs et organisations agricoles.

V - IMPUTATION BUDGÉTAIRE

D'un point de vue comptable, l'État prend en charge les analyses suivantes, imputées sur le BOP 206 :

- S'agissant de la protection des végétaux : sur la sous-action 13 « contrôle des pratiques agricoles de la protection des végétaux », pour la recherche de produits toxiques sur les végétaux et dans les abeilles.
- S'agissant des services vétérinaires : sur la sous-action 20 « gestion des maladies animales», pour la recherche des agents pathogènes dans les abeilles.

Des demandes de délégations spécifiques de crédits peuvent être faites en vue de financer les enquêtes d'ordre toxicologique.

VI - BILAN DU SUIVI ET PHYTOPHARMACOVIGILANCE

Un bilan des déclarations des MMAA et des suites données est effectué tous les ans par les DRAAF à l'aide du tableau joint en annexe XIII (tableau révisé).

Les DRAAF adressent ce tableau de bilan au plus tard le 15 décembre de l'année en cours au référent national en apiculture de la DGAl par voie électronique avec copie à la boite institutionnelle « sdsqpv.dgal@agriculture.gouv.fr » accompagné des rapports en cas d'enquête environnementale sur le terrain. Un bilan national annuel des déclarations et enquêtes sera alors établi. Il contribuera à la phytopharmacovigilance en complément des alertes relatives aux cas groupés transmises en cours d'année.

Chaque année, au moins une réunion des correspondants « abeilles » de chaque DRAAF-SRAL sera organisée par la DGAL. A l'occasion de cette séance, les résultats obtenus seront présentés, un retour d'expérience sera réalisé avec si possible la présentation de cas concrets, les difficultés rencontrées par les agents dans la conduite des enquêtes de terrain seront évoquées et les solutions permettant d'y remédier seront envisagées. Cette réunion contribuera au renforcement du réseau de suivi des troubles des abeilles et facilitera les échanges d'informations entre l'administration centrale et les services déconcentrés sur les sujets apicoles.

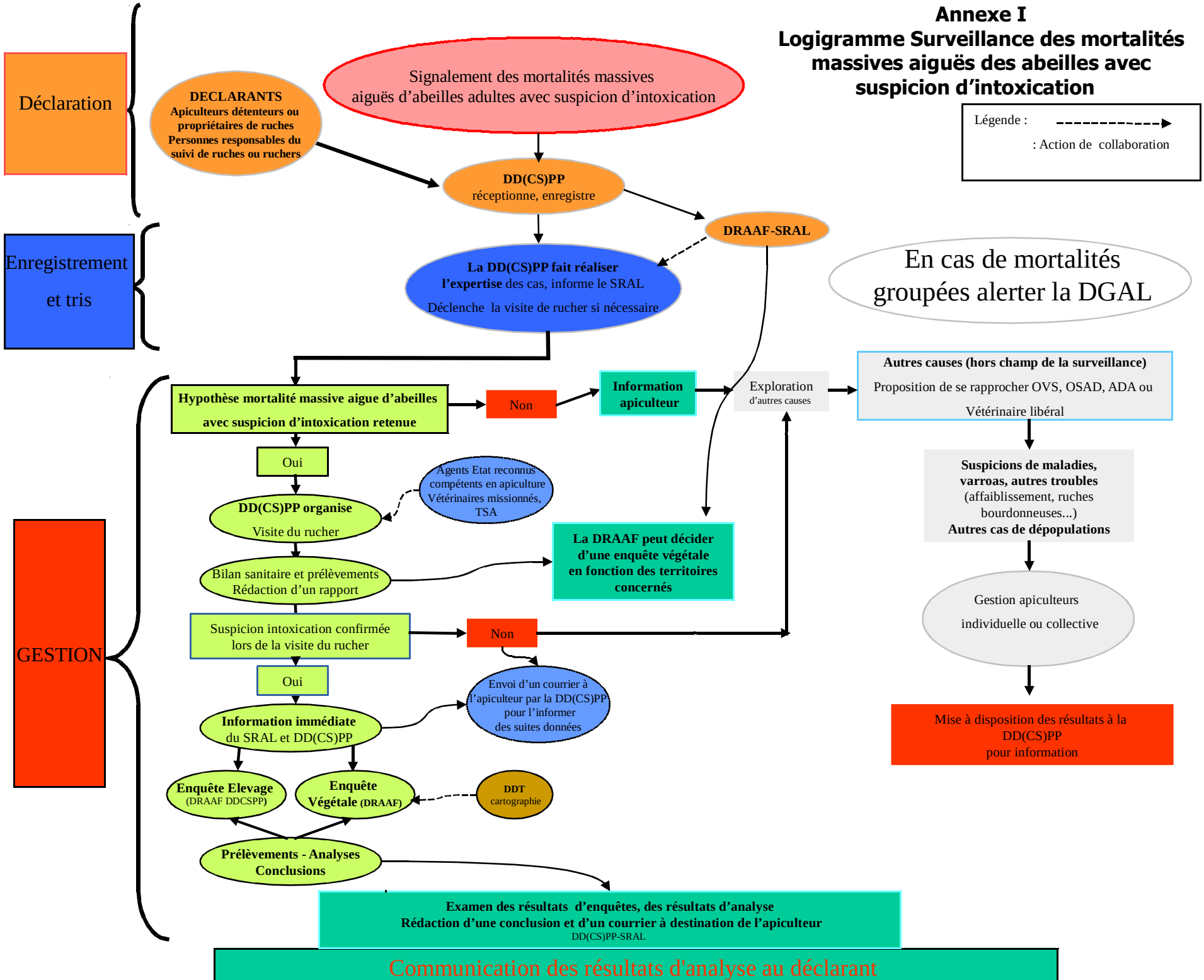
Un bilan national du dispositif sera présenté annuellement au groupe de suivi de la Plateforme ESA et au comité d'experts apicole du CNOPSAV, puis diffusé sur le site internet du ministère et/ou dans des revues apicoles et agricoles à audience nationale.

Je vous remercie de bien vouloir me faire part de toute difficulté dans l'application de la présente instruction.

Le Directeur Général de l'Alimentation

Patrick Dehaumont

Annexe I
Logigramme Surveillance des mortalités massives aiguës des abeilles avec suspicion d'intoxication



Annexe 3

BILAN SANITAIRE DE LA FILIERE APICOLE REUNIONNAISE ET EVALUATION DES RISQUES D'INTRODUCTION D'AGENTS PATHOGENES EXOTIQUES

31 octobre 2013

[MIS A JOUR LE 10 DECEMBRE 2013]

Olivier ESNAULT

GDS Réunion
1, rue du Père Hauck
97418 LA PLAINE DES CAFRES
http://gds974.asso.re/

Sommaire

Sommaire 2
Liste des abréviations 5
Table des figures 6
Index des tableaux 8
Introduction 9
1 Contexte 10
1.1 L'île de la Réunion 11
1.2 L'apiculture réunionnaise 11
1.3 Le contexte sanitaire 12
2 Agents pathogènes ciblés dans cette étude 13
2.1 Les parasites du couvain 14
2.1.1 *Varroa destructor* 14
2.1.2 *Tropilaelaps sp.* 17
2.1.3 Le petit coléoptère des ruches *Aethina tumida* 19
2.2 Les parasites internes et assimilés 21
2.2.1 *Nosema apis et N. ceranae* 21
2.2.2 Les acariens des trachées (*Acarapis sp.*) 22
2.3 Les bactéries 24
2.3.1 *Melissococcus plutonius* 24
2.3.2 *Paenibacillus larvae* 25
2.4 Les virus 26
2.4.1 BQCV 26
2.4.2 CBPV 27
2.4.3 DWV 27
2.4.4 SBV 28
2.4.5 ABPV, IAPV et KBV 28
2.5 Le syndrome d'effondrement des colonies 29
2.6 Les dangers sanitaires de première et deuxième catégories pour les abeilles domestiques 29
3 Bilan sanitaire de la filière apicole 31
3.1 Matériel et méthodes 32

3.1.1 Echantillonnage 32
3.1.2 Mise en évidence des agents pathogènes 32
3.2 Résultats 35
3.2.1 Le syndrome d'effondrement des colonies 35
3.2.2 *Varroa destructor, Tropilaelaps sp., Acarapis sp.* 35
3.2.3 Virus 35
3.2.4 *Nosema apis* et *Nosema ceranae* 36
3.2.5 Loque européenne et loque américaine 37
3.3 Discussion 38
3.3.1 Échantillonnage 38
3.3.2 Acariens ectoparasites 39
3.3.3 Virus 39
3.3.4 Bactéries 40
3.3.5 *Nosema apis* et *N. ceranae* 41
4 Analyse de risque de l'introduction des dangers sanitaires de première et deuxième catégorie pour les abeilles domestiques à l'île de la Réunion et ses conséquences pour les filières apicoles et associées 43
4.1 Matériel et méthodes 44
4.1.1 L'analyse de risque 44
4.1.2 Collecte d'informations 48
4.2 Identification des dangers 49
4.3 Risque d'émission 49
4.3.1 Survie des agents pathogènes 49
4.3.2 Introduction des agents pathogènes par abeilles vivantes 51
4.3.3 Introduction des agents pathogènes par du matériel apicole 62
4.3.4 Introduction des agents pathogènes par des produits de la ruche contaminés 66
4.3.5 Cas particulier d'*Aethina tumida* 70
4.3.6 Conclusions sur le risque d'émission 72
4.4 Risque d'exposition 73
4.4.1 Abeilles vivantes suite à une introduction volontaire 73
4.4.2 Abeilles vivantes suite à une introduction involontaire 77
4.4.3 Matériel 80
4.4.4 Produits de la ruche contaminés 82
4.4.5 Cas particulier d'*Aethina tumida* 84

4.4.6 Conclusions sur le risque d'exposition des abeilles réunionnaises aux agents pathogènes étudiés 84
4.5 Probabilité de survenue du danger 84
4.6 Conséquences 85
4.6.1 Conséquences directes 85
4.6.2 Conséquences indirectes 87
4.7 Estimation des risques 88
4.8 Communication 90
5 Récapitulatif des résultats 91
5.1 Prévalences 92
5.2 Analyse de risque 93
6 Recommandations 94
6.1 Identification des ruchers 95
6.2 Mise en place d'un réseau d'épidémio-surveillance local 95
6.3 Développement de la coopération régionale via une plate-forme d'épidémio-surveillance dédiée au sud ouest de l'océan indien (SWIO) 96
6.4 Renforcement des actions de recherche (épidémiologie) 97
6.5 Renforcement des opérations de communication visant à préserver l'état sanitaire du cheptel apiaire réunionnais 97
6.6 Mise en place d'un plan d'assainissement de certaines maladies ou agents pathogènes ... 97
Bibliographie 99
Annexes 102

Liste des abréviations

Abréviation	Signification
ANSES	Agence nationale de sécurité sanitaire
ASA	Agent sanitaire apicole
CCD	Colony collapse disorder
cDNA	ADN complémentaire
CIRAD	Centre international de recherche agronomique pour le développement
DAAF	Direction de l'alimentation, de l'agriculture et de la forêt
GDS	Groupement de défense sanitaire
LDA39	Laboratoire départemental d'analyses du Jura
LVD	Laboratoire vétérinaire départemental
MDO	Maladie à déclaration obligatoire
MRC	Maladie Réputée Contagieuse
OIE	Organisation mondiale de la santé animale
PCR	Polymerase chain reaction
RT-PCR	Reverse-transcriptase polymerase chain reaction
SAR	Syndicat apicole de la Réunion
SDIS	Service départemental d'incendie et de secours

Table des figures

Figure 1 : Femelle phorétique *Varroa destructor* sur abeille (Source : wikipédia) 14
Figure 2 : Répartition mondiale de la varroose sur la période juin-décembre 2012 (sources WAHID-OIE) 16
Figure 3 : *Tropilaelaps sp*. sur larve *d'Apis dorsata* 17
Figure 4 : Répartition mondiale des infestations à *Tropilaelaps sp.* sur la période juin-décembre 2012 (sources WAHID-OIE) 18
Figure 5 : vue dorsale et ventrale d'*Aethina tumida* adulte. (Photographies de Lyle Buss (gauche) et Josephine Ratikan (droite), University of Florida) 19
Figure 6 : : Répartition mondiale des infestations à *Aethina tumida* sur la période juin-décembre 2012 (sources WAHID-OIE) 20
Figure 7: A : spores de *Nosema ceranae*, B : spores de *N. apis* (l'échelle est de 5 µm) (d'après Fries et al., 2006) 21
Figure 8 : *Acarapis woodi.* En haut : mâle adulte, au milieu : femelle adulte, en bas : œuf. (Source : manuel terrestre de l'OIE 2008) 22
Figure 9 : Répartition mondiale de l'acarapisose sur la période juin-décembre 2012 (sources WAHID-OIE) 23
Figure 10 : : Répartition mondiale de la loque européenne sur la période juin-décembre 2012 (sources WAHID-OIE) 25
Figure 11 : Répartition de la loque américaine sur la période juin-décembre 2012 (sources WAHID-OIE) 26
Figure 12 : Abeille présentant le syndrome de type II de la "maladie noire" (source : http://apivet.eu/) 27
Figure 13 : Répartition mondiale des virus ABPV, IAPV et KBV (d'après de Miranda *et al*., 2010) 28
Figure 14 : Diagramme présentant le nombre de colonies prélevées par communes 32
Figure 15 : Distribution de *Nosema spp*. dans les ruchers espagnols (Martin Hernandez *et al.*, 2012) 42
Figure 16 : Les composantes de l'appréciation du risque selon l'OIE (Toma et al., 2010) 45
Figure 17 : Modèle conceptuel présentant les différents voies possibles d'introductions de *Paenibacillus larvei* et *Tropilaelaps sp.* et *Varroa destructor* via des abeilles vivantes 52
Figure 18 : Séquence générale d'émission par introduction volontaire d'agents pathogènes par abeilles vivantes 55
Figure 19 : Séquence générale d'émission par introduction involontaire d'agents pathogènes par abeilles vivantes 59
Figure 20 : Modèle conceptuel présentant les différents voies possibles d'introductions de *Paenibacillus larvei* et *Tropilaelaps sp*. et *Varroa destructor* via du matériel contaminé 63
Figure 21 : Séquence générale d'émission par introduction involontaire d'agents pathogènes par matériel apicole contaminé 64
Figure 22 : Caractérisation des probabilités intermédiaires et des niveaux de risque d'émission (émissions 7) 66
Figure 23 : Modèle conceptuel présentant les différents voies possibles d'introductions de *Paenibacillus larvei* et *Tropilaelaps sp*. et *Varroa destructor* via des produits de la ruche contaminés67

Figure 24 : Séquence générale d'émission par introduction volontaire d'agents pathogènes par produits de la ruche contaminés 68
Figure 25 : Caractérisation des probabilités intermédiaires et des niveaux de risque d'émission (émissions 8) 70
Figure 26 : Séquence générale d'évènements nécessaires à l'exposition des abeilles de la Réunion à un agent pathogène transmis par introduction volontaire d'abeille(s) vivante(s) 76
Figure 27 : Séquence générale d'évènements nécessaires à l'exposition des abeilles de la Réunion à un agent pathogène transmis par introduction involontaire d'abeilles vivantes 79
Figure 28 : Séquence générale d'évènements nécessaires à l'exposition des abeilles de la Réunion à un agent pathogène transmis par introduction volontaire de matériel contaminé 81
Figure 29 : Séquence générale d'évènements nécessaires à l'exposition des abeilles de la Réunion à un agent pathogène transmis par introduction de produits de la ruche contaminés 83
Figure 30 : Identification des zones à risque lors d'une introduction accidentelle d'une abeille infestée au niveau du Port. Les zones colorées sont celles qui seront infestées en premier si une introduction se produit à partir du Port 86
Figure 31 : Evolution de tonnages de production de miels de baies roses, letchi et forêt à la Coopémiel entre 2002 et 2012 (source Coopémiel) 87
Figure 32 : Petit déjeuner avec abeilles à gauche, sans abeilles à droite (source http://www.lescompagnonsdumiel.fr/abeille-indispensable.htm) 88

Index des tableaux

Tableau 1 : Synthèse des agents infectieux transmis par *Varroa destructor* 16
Tableau 2 : Dangers sanitaires de première et deuxième catégorie pour les abeilles domestiques 30
Tableau 3 : Prestataires et laboratoires réalisant les analyses sanitaires 33
Tableau 4 : Amorces et tailles de produits PCR attendus 34
Tableau 5 : Prévalences colonie et rucher des acariens parasites 35
Tableau 6 : Prévalences colonie et rucher des virus ciblés sur abeilles d'intérieur 36
Tableau 7 : Prévalences colonie et rucher des virus ciblés sur abeilles butineuses 36
Tableau 8 : Prévalences colonie et rucher de *N. ceranae* et *N. apis* sur abeilles butineuses 36
Tableau 9 : Prévalence colonie et rucher de *M. plutonius* 37
Tableau 10 : Synthèse des prévalences de virus observées par pays d'après différentes études 40
Tableau 11 : Grille d'appréciation pour l'analyse de risque qualitative (ANSES, 2008) 46
Tableau 12 : Synthèse des durées de survie des agents pathogènes identifiés 51
Tableau 13 : Statut sanitaire vis-à-vis de Paenibacillus larvae, Varroa destructor et Tropilaelaps sp. (source WAHID) 56
Tableau 14 : Caractérisation des probabilités intermédiaires et des niveaux de risque d'émission (émission 1 à 4) 58
Tableau 15 : Synthèse des pays à risque et à moins de 15 jours de trajet de la Réunion 60
Tableau 16 : Statut sanitaire vis-à-vis de Paenibacillus larvae, Varroa destructor et Tropilaelaps sp. des différents pays à risque (source WAHID) 61
Tableau 17 : Caractérisation des probabilités intermédiaires et des niveaux de risque d'émission (émissions 5 et 6) 62
Tableau 18 : Nombre de kg de miel importés à la Réunion en 2010, 2011 et 2012 69
Tableau 19 : Synthèse des probabilités d'émission pour *Aethina tumida* 72
Tableau 20 : Synthèse des niveaux de risque associés à chaque émission 73
Tableau 21 : Caractérisation des probabilités intermédiaires et des niveaux de risque d'exposition (Exposition 1) 77
Tableau 22 : Caractérisation des probabilités intermédiaires et des niveaux de risque d'exposition (Expositions 2 et 3) 78
Tableau 23 : Caractérisation des probabilités intermédiaires et des niveaux de risque d'exposition (Exposition 4) 80
Tableau 24 : Caractérisation des probabilités intermédiaires et des niveaux de risque d'exposition (Exposition 5) 82
Tableau 25 : Synthèse des niveaux de risque associés à chaque exposition 84
Tableau 26 : Règles de multiplication des probabilités qualitatives (source ANSES) 84
Tableau 27 : Synthèse des probabilités de survenue du danger pour *P. larvae*, *Tropilaelaps sp.* et *V. destructor* 85
Tableau 28 : Synthèse des niveaux de risque associés aux agents pathogènes 89

Introduction

L'apiculture réunionnaise est très active et doit faire face à un certain nombre de défis pour demain.

Parmi ces grands défis, la maîtrise du sanitaire est un des grands enjeux à venir. En effet, la situation sanitaire mondiale évolue en permanence et en 2010, l'acarien ectoparasite de l'abeille domestique, *Varroa destructor* a fait son apparition à Madagascar.

La relative proximité entre les deux îles a occasionné une prise de conscience majeure de la part des apiculteurs réunionnais. Conscients d'être sur une île isolée aux ressources et à la biodiversité exceptionnelle, cette force peut se révéler être une grande faiblesse en cas d'introduction d'agents pathogènes exotiques.

Finalement, peu de données existent sur l'apiculture réunionnaise. On commence à comprendre la structuration génétique de l'abeille locale, on commence à mieux comprendre les différentes miellées et les contraintes afférentes, mais il n'existe quasiment aucune information sur le domaine sanitaire.

Le GDS Réunion est depuis 2011 un partenaire majeur de la filière apicole. Son implication a permis d'identifier un certain nombre de besoins et d'interrogations en termes de santé animale :

Quels sont les agents pathogènes présents à la Réunion ? Quels sont les niveaux de circulation ? Quels sont les agents pathogènes exotiques qui menacent l'apiculture réunionnaise ? Quelles attitudes et mesures adopter pour se prémunir ?

Initié en 2012, ce travail long et minutieux voit son aboutissement.

L'objectif premier de ce travail est de connaître les prévalences d'un certain nombre d'agents pathogènes bien identifiés. Le second objectif est d'évaluer les niveaux de risque d'introduction d'agents pathogènes exotiques auxquels sont soumis l'île de la Réunion et son apiculture.

Ce travail constituera un « point 0 » important pour la science mais également pour la stratégie sanitaire de la filière.

4 Analyse de risque de l'introduction des dangers sanitaires de première et deuxième catégorie pour les abeilles domestiques à l'île de la Réunion et ses conséquences pour les filières apicoles et associées

Esnault, O. (2013). *Bilan sanitaire de la filière apicole réunionnaise et évaluation des risques d'introduction d'agents pathogènes exotiques. GDS Réunion.*

4.1 Matériel et méthodes

4.1.1 L'analyse de risque

4.1.1.1 Définition

L'analyse de risque est une manière d'organiser les informations disponibles sur un évènement potentiel donné, de les traduire en probabilités en tenant compte d'hypothèses, de la variabilité et de l'incertitude, et d'en déduire logiquement des décisions (Toma *et al.*, 2002). Une autre définition d'Ahl et *al*.,(1993) permet de mettre en évidence les points clés d'une analyse de risque. Selon cet auteur : "l'analyse de risque est une démarche scientifique faite dans le but d'identifier les dangers connus ou potentiels, d'en apprécier les risques, de les gérer et de communiquer à leur propos".

Il existe deux types d'analyse de risque qui utilisent le même protocole mais qui ne qualifient pas le risque de la même façon. Pour l'analyse de risque **qualitative** le risque sera estimé par des mots, tandis qu'avec l'analyse **quantitative** on utilisera des chiffres. Ces deux méthodes se valent, mais la deuxième est plus complexe car il n'est pas toujours possible d'avoir des données numériques fiables. Dans cette étude, seule l'analyse de risque qualitative sera réalisée.

Les accords Sanitaire et PhytoSanitaire (SPS), initiés en 1994 par l'OMC (Organisation Mondiale du Commerce), recommandent une justification scientifique, l'analyse de risque, pour la mise en place de normes commerciales plus restrictives que celles proposées. L'approche doit être cohérente et transparente afin que les pays exportateurs comprennent les restrictions et qu'il n'y ait pas de litiges commerciaux.

4.1.1.2 Identification des dangers

La première étape de l'analyse de risque est de définir le danger. Selon les auteurs, le danger est " tout agent biologique, chimique ou physique pouvant avoir un effet néfaste sur la santé" (Toma *et al.*, 2010). Certains considèrent plus que c'est la maladie qui constitue le danger. Dans cette étude les dangers biologiques considérés seront les dangers sanitaires de première et deuxième catégorie tels que définis dans l'arrêté ministériel du 29 juillet 2013.

Les dangers sanitaires de première catégorie pour les abeilles domestiques sont *Aethina tumida*, *Tropilaelaps clareae*, *Paenibacillus larvae* et le danger sanitaire de deuxième catégorie sera *Varroa destructor*.

Bien que *Paenibacillus larvae* ait été mise en évidence dans le bilan sanitaire de la filière, la diversité des souches induit des impacts cliniques différents. C'est pourquoi, une nouvelle introduction de *P. larvae* pourrait avoir des conséquences sanitaires très importantes et donc une éventuelle introduction d'un génotype différent doit être abordée dans cette partie d'analyse de risque. L'introduction d'une nouvelle sous-espèce sera abordée comme une introduction de la bactérie dans un milieu sain.

Le frelon asiatique *Vespa velutina* qui est considéré comme un danger sanitaire de deuxième catégorie ne sera pas étudié dans ce rapport. Cette espèce prédatrice des abeilles domestiques est originaire d'Asie et est invasive en France métropolitaine. Les dégâts causés par son introduction

sont très importants. A l'heure actuelle, l'espèce est en pleine phase de conquête du territoire et se dissémine de manière très importante. Les premiers individus ont été observés dans le Sud-Ouest et l'espèce a diffusé de manière massive vers le Nord et l'Est de la France. Compte-tenu de ses capacités de dispersion, un envahissement de l'Europe entière voire de l'Afrique du Nord est à craindre.

Compte tenu de son écologie et du manque global de données disponibles, l'analyse de risque de ce danger est très difficilement réalisable et ne sera valable qu'à un instant donné. Par conséquent, ces résultats ne seront pas exploitables ni valorisables par les services de l'Etat (DAAF).

Néanmoins, il existe un autre frelon, *Vespa orientalis*, qui est également prédateur d'abeilles et qui est présent depuis quelques années à Madagascar. Ce prédateur a une aire de répartition assez large depuis le sud-est de l'Europe jusqu'en Asie en passant par l'Afrique du Nord-Est et le Moyen-orient.

Son impact et les stratégies de défense des abeilles domestiques ont été très étudiés notamment à Chypre.

Son impact à Madagascar sur les colonies d'abeilles domestiques est complètement inconnu et selon les dires d'apiculteurs locaux il ne semble pas être une menace importante.

De la même façon que pour *Vespa velutina*, le manque de données fiables et exploitables ne permettra pas la réalisation d'une étude d'analyse de risque.

4.1.1.3 Appréciation du risque

C'est la deuxième étape après la définition du danger. D'après l'OIE, elle se compose de quatre étapes résumées dans la Figure 16 :

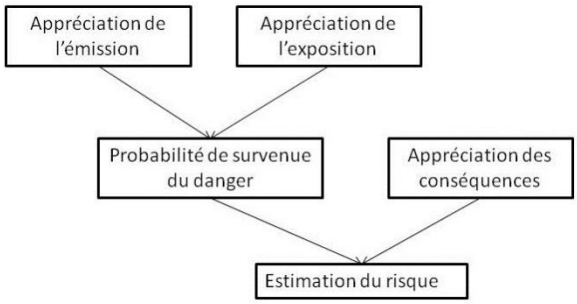


Figure 16 : Les composantes de l'appréciation du risque selon l'OIE (Toma et al., 2010)

Pour évaluer les probabilités prises en compte dans les différents scénarii, nous utiliserons les qualificatifs donnés par L'ANSES (Tableau 11).

Qualificatifs	Borne inférieure	Borne supérieure
Nul (N)	0	
Quasi-Nul (QN)	>0	1/78 125

Minime (M)	1/390 625	1/15 625
Extrêmement faible (EF)	1/78 125	1/3 125
Très faible (TF)	1/15 625	1/625
Faible (F)	1/3 125	1/125
Peu élevé (PE)	1/625	1/25
Assez élevé (AE)	1/125	1/5
Elevé (E)	1/25	1
Très élevé (TE)	1/5	1

Tableau 11 : Grille d'appréciation pour l'analyse de risque qualitative (ANSES, 2008)

4.1.1.3.1 Appréciation de l'émission

L'appréciation de l'émission consiste à définir et quantifier les données permettant d'estimer la probabilité qu'un agent pathogène soit libéré dans l'environnement à partir d'éléments soumis à l'analyse de risque. Pour cela, il est nécessaire de construire des modèles conceptuels résumant les voies d'entrées possibles du parasite. Cela permettra de décrire la séquence d'événements nécessaire à l'introduction du parasite et ainsi d'estimer une probabilité pour chaque élément de la séquence et ensuite une probabilité finale.

4.1.1.3.2 Appréciation de l'exposition

L'appréciation de l'exposition utilise le même protocole que l'appréciation de l'émission sauf que dans ce cas, il est question d'établir la séquence d'événements nécessaires pour que les animaux cibles (les abeilles de La Réunion dans le cadre de cette étude) soient en contact avec les agents pathogènes à partir d'une source définie. Ainsi, il sera possible de donner une probabilité d'exposition après étude de tous les composants de la séquence.

4.1.1.3.3 Appréciation des conséquences sanitaires et économiques

Cette étape, la dernière avant l'estimation du risque, permet de déterminer et de quantifier les effets néfastes associés à l'agent pathogène.

L'appréciation des conséquences doit prendre en compte :

- l'aspect sanitaire
- l'établissement et la propagation de l'agent pathogène
- l'aspect économique : pertes directes pour les apiculteurs, les coûts dus aux moyens de lutte et les pertes dans les domaines associés comme l'arboriculture et le maraîchage.

4.1.1.3.4 Estimation du risque

A la suite des trois étapes énoncées ci-dessus, il est possible de faire une estimation de la probabilité de survenue du danger et de ses conséquences sur la population concernée. Ce risque devra être donné avec un degré d'incertitude et comparé au risque acceptable.

4.1.1.3.5 Incertitude et variabilité

Lors de l'évaluation des probabilités il importe d'évaluer l'exactitude des ces dernières selon la qualité des informations obtenues. Cette incertitude permet de nuancer le poids que les probabilités peuvent avoir dans l'estimation du risque.

Il est également important de prendre en compte la variabilité des probabilités estimées qui peuvent différer selon certains paramètres.

4.1.1.4 Gestion du risque

Après avoir déterminé le risque, il est nécessaire de le gérer, à savoir, mettre en œuvre des mesures permettant de le ramener à un niveau défini comme acceptable.

4.1.1.4.1 Evaluation du risque

L'étape d'évaluation du risque consiste à le comparer au risque acceptable qui doit être défini. Cette notion rejette le risque nul et donc, implicitement, cela suggère qu'il y a toujours un risque, même à bas niveau. Cependant, il est difficile à établir car il dépend de nombreux paramètres. En effet, il faut évaluer pour qui le risque doit être acceptable et comment il est perçu par le public, ce qui est très variable. Néanmoins, d'après ce qu'il est courant de faire, l'évaluation du risque acceptable se base sur l'impact de la maladie sur la population cible, l'état du pays importateur et l'impact économique. En résumé, plus la maladie est virulente, contagieuse et coûteuse, plus le risque acceptable doit être bas.

4.1.1.4.2 Mesure de diminution du risque

Cette étape permet la proposition de mesure de diminution, ou de maitrise du risque. Ce qui sera fait, par la modification de l'arrêté préfectoral N° 0716 de 2 Avril 2003 et la proposition de recommandations aux organismes de gestion et d'organisation de la filière (GDS, ADA, SAR, DAAF), aux services vétérinaires (Laboratoire départemental), aux douanes et bien entendu, aux apiculteurs.

4.1.1.5 Communication du risque

Tout au long de l'analyse, il est bien sûr indispensable de communiquer avec les différents partenaires afin d'avoir le plus d'éléments possibles et une action cohérente par la suite

4.1.2 Collecte d'informations

Avant de commencer la collecte d'informations, il est utile de construire les modèles conceptuels afin de voir quelles informations sont nécessaires et sous quelle forme il est possible de les collecter. Les données seront issues d'entretiens, d'enquêtes terrain et de recherches bibliographiques.

Les principaux fournisseurs d'informations quant à l'introduction des dangers biologiques ciblés par cette étude sur l'île de La Réunion sont :

- Les douanes
- Le Poste d'Inspection aux Frontières (PIF) au Port et Aéroport
- Les responsables de l'apiculture à la DAAF (Direction Alimentation de l'Agriculture et des Forêts, ex DSV)
- L'Association pour le développement de l'Apiculture (ADA)
- Les Agents Sanitaires Apicoles (ASA)
- Le Syndicat Apicole de La Réunion (SAR)
- La Coopémiel (Coopérative des apiculteurs producteurs de miel)
- La chambre d'agriculture
- Le CIRAD, unité 3P (UMR PVBMT CIRAD Réunion St Pierre)
- Les apiculteurs
- L'ANSES

Les apiculteurs étant les principaux interlocuteurs, une grande partie de l'étude consistera à mener une enquête auprès de ces derniers. L'objectif de l'enquête est de savoir s'ils ont des pratiques à risque ou au contraire de protection vis à vis de l'introduction de *Varroa destructor* et de sa dispersion potentielle sur l'île.

Cette enquête centrée sur Varroa a été réalisée entre juin et août 2012.

En 2012, aucune typologie de l'apiculture à La Réunion n'avait été réalisée. De ce fait, il est nécessaire de réaliser une enquête préliminaire renseignant sur la répartition des apiculteurs selon le nombre de ruches qu'ils possèdent. Ils seront ainsi divisés en trois classes :

- Plus de 60 ruches : apiculteurs professionnels ayant droit à des aides et donc pouvant tirer leurs revenus de leur activité apicole.

- Entre 16 et 59 ruches : apiculteurs semi professionnels, pluriactifs qui ne tirent pas leurs revenus uniquement de leur activité apicole

- Entre 1 et 15 ruches : apiculteurs de loisir, avec une production à usage domestique

Les apiculteurs enquêtés sont ceux qui se sont déclarés auprès du GDS et, par conséquent, inscrits dans la base nationale de donnée SIGAL sur la période 2011-2012. Ce premier questionnaire sera réalisé par entretien téléphonique.

Suite à cela, une enquête plus poussée sur les pratiques des apiculteurs et leurs connaissances vis à vis de varroa sera réalisée. Pour cela, un tirage au sort de 100 apiculteurs parmi ceux qui auront

répondu à l'enquête téléphonique sera réalisé. Le choix du nombre d'apiculteurs à enquêter s'est fait selon le temps et le budget disponible.

Préalablement, le questionnaire aura été testé auprès de quelques apiculteurs volontaires.

Les connaissances des apiculteurs sur varroa ont été évaluées sur cinq points : la morphologie et la biologie de l'acarien, les techniques de détection, les moyens d'introduction, l'impact sanitaire et les traitements. L'évaluation des connaissances se décline en 5 modalités : très bonne = 100% de bonnes réponses, bonne=80%, moyenne=50%, faible= 20% et nulle= 0%. Cela permettra d'avoir un aperçu du niveau de connaissance par type d'apiculteurs (professionnels vs semi-professionnels vs loisirs).

4.2 Identification des dangers

Dans cette étude, les dangers biologiques sont les suivants :

- *Varroa destructor*
- *Tropilaelaps sp.*
- *Paenibacillus larvae*
- *Aethina tumida*

4.3 Risque d'émission

V. destructor, *Tropilaelaps sp.*, et *P. larvae* ont des modalités de diffusion et d'émission qui sont relativement semblables, notamment en termes de contamination et de survie dans le milieu extérieur. Par conséquent, les modèles d'introduction étant similaires, seules les probabilités afférentes à la cascade d'évènements varient selon le danger considéré. Ces quatre dangers seront donc toujours appréhendés de manière concomitante.

Par contre, le petit coléoptère des ruches *Aethina tumida* présente des différences notables au niveau de sa biologie qui font que les séquences d'introduction ne seront pas du même type. En effet, le coléoptère adulte n'est pas inféodé strictement à l'environnement direct de l'apiculture (essaim, ruche, matériel apicole…) et fréquente le milieu « extérieur ». On peut notamment le retrouver dans les fruits ou les fleurs issus de pays où il est présent. Par contre, concernant les œufs et les larves du petit coléoptère qui sont strictement inféodés à l'environnement direct de la ruche, les modèles d'introduction sont comparables aux autres agents pathogènes de cette étude.

4.3.1 Survie des agents pathogènes

4.3.1.1 Varroa destructor

La durée de vie de *Varroa destructor* au sein d'une ruche est de 2 à 3 mois en été (Calatayud and Verdu, 1994). Sur une abeille, hors de la colonie, le parasite peut survivre aussi longtemps que son hôte, c'est à dire 3 semaines pour une butineuse en pleine saison d'activité (miellées). Il lui est également possible de survivre encore 3 jours sur le cadavre d'une abeille (De Guzman et al., 1993).

Le matériel peut aussi constituer un refuge pour un ou deux jours selon les conditions extérieures (De Guzman et al., 1993). Mais la survie peut être plus longue en condition humide et chaude par exemple. Un apiculteur tanzanien rencontré a affirmé avoir retrouvé des varroas vivants sur ses cadres, 3 mois après leur sortie des ruches. D'autre auteurs ont également reporté que la survie du varroa était possible sur des fleurs entre 4 et 6 jours, respectivement en condition expérimentale et naturelle (Gromyko, 1982; Hartwig and Jedruszuk, 1987).

4.3.1.2 *Tropilaelaps sp.*

Peu de données sont disponibles sur la durée de vie des acariens *T. clareae* ou *T. koenigerum* qui sont, à la différence de *V. destructor*, strictement inféodés au couvain. En effet, *Tropilaelaps* se nourrissant d'hémolymphe n'est pas capable de percer la cuticule des abeilles adultes. Sa survie sur abeilles adultes est donc très limitée, de l'ordre de 48h maximum.

4.3.1.3 *Paenibacillus larvae*

Les spores de *Paenibacillus larvae* sont extrêmement résistantes dans le milieu extérieur. Elles peuvent résister 35 à 40 ans sous forme d'écaille, résistent plus d'un an dans le miel, à la putréfaction, à la fermentation, à la congélation, pendant 08h00 à 100°C de chaleur sèche, 30 minutes dans du formol à 20%…

Par contre, elles sont très sensibles à l'eau de javel 1.5% et à la soude caustique à une concentration équivalente. Les rayons gammas arrivent à les détruire, de même que 30 minutes à 130°C de chaleur sèche.

La dose infectieuse moyenne (DI_{50}) est estimée à 8,49 spores pour des larves âgées de 24 à 48h00.

4.3.1.4 *Aethina tumida*

Les œufs d'*Aethina tumida* éclosent en 6 jours maximum et la durée des stades larvaires est d'environ un mois maximum. La durée maximale de pupaison (dans le sol) est quant à elle de 12 semaines. Enfin, le stade adulte peut survivre jusqu'à plus de 6 mois dans le milieu extérieur, particulièrement dans des fruits pourris.

4.3.1.5 *Synthèse*

	Durée de survie					
Agent pathogène	**abeilles vivantes**	**abeilles mortes**	**couvain**	**matériel contaminé**	**miel/produits de la ruche**	**autre**
Aethina tumida	ind*	ind*	1 mois	6 jours[1]	ind*	3 à 6 mois[2]
Paenibacillus larvae	dur**	35-40 ans[3]	dur**	35-40 ans	1 an	ind*
Tropilaelaps sp.	2 jours	ind*	ind*	0	0	0
Varroa destructor	dur**	3 jours	2-3 mois	1-2 jours[4]	0	4-6 jours[5]

ind* : indéterminé, ou données manquantes
dur ** : durée de vie de l'hôte
[1] : durée maximale de vie des larves
[2] : 3 mois dans le sol, 6 mois dans des fruits pourris
[3] : écaille loqueuse
[4] : 3 mois a déjà été constaté
[5] : sur des fleurs

Tableau 12 : Synthèse des durées de survie des agents pathogènes identifiés

4.3.2 Introduction des agents pathogènes par abeilles vivantes

Les abeilles vivantes représentent la voie d'introduction la plus importante puisque 4 agents pathogènes sont directement associés à l'abeille vivante (cf. Tableau 12).

On entend par abeille vivante :

- Reine seule
- Paquet d'abeilles (*Le paquet d'abeilles est une grappe d'abeille accompagnée ou non d'une reine. Généralement il pèse 1 kg. Il est utilisé pour le commerce et les échanges entre apiculteurs. Le paquet voyage souvent dans une cage aérée spécifique.*)
- Essaim (*Il peut s'agir d'essaims sauvages ou d'essaims commerciaux*).
- Abeilles isolées

La situation géographique de l'île de la Réunion lui confère un certain isolement. La côte la plus proche est celle de l'île Maurice à environ 200 km et Madagascar est à plus de 800 km.

D'autres îles océaniques comme les Açores, Madère, les Canaries ou les Iles du Cap Vert présentent des populations indigènes d'abeilles domestiques, ce qui signifie que malgré les distances importantes entre les îles (souvent plus de 600 km), une colonisation naturelle de ces îles pourtant isolées par des abeilles est clairement possible (de la Rua *et al.*, 1998,2001, 2006).

Cette voie naturelle possible d'introduction ne sera pas retenue dans notre étude

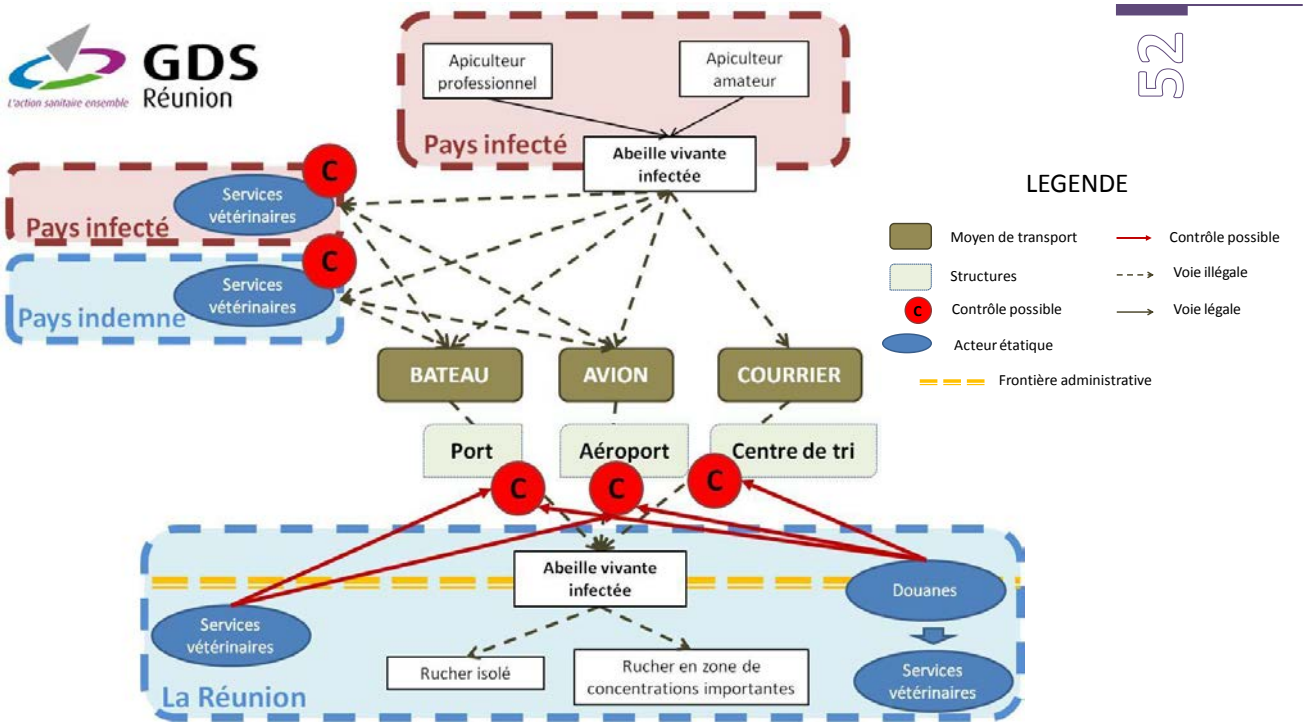


Figure 17 : Modèle conceptuel présentant les différents voies possibles d'introductions de *Paenibacillus larvei* et *Tropilaelaps sp.* et *Varroa destructor* via des abeilles vivantes

Les modalités d'entrée des abeilles sur l'île sont de deux types :

- introduction volontaire d'abeilles vivantes par des personnes ou par courrier. Il s'agira plutôt de reines et de paquet d'abeilles.
- introduction accidentelle d'essaim(s) ou d'abeilles isolées
-

4.3.2.1 Mesures de contrôle et de détection des intrants

L'introduction d'abeilles vivantes à la Réunion est interdite par l'arrêté préfectoral n°0716 du 02 avril 2003.

A l'entrée de l'île, des contrôles par les agents des douanes et des services d'inspections aux frontières sont effectués afin d'éviter l'introduction de marchandises ou d'espèces illégales. Les inspections sont réalisées de façons différentes par points d'arrivées :

- Aéroport : Avant l'embarquement, les passagers et les bagages à mains sont contrôlés systématiquement par des compagnies de sécurité indépendantes pour répondre aux normes de sécurité (métal, liquide, explosifs…). Le contrôle est moins systématique pour les bagages en soute. A l'arrivée à La Réunion, les contrôles douaniers sont ponctuels et peu nombreux. Des traitements insecticides sont réalisés dans les appareils provenant de pays touchés par les maladies vectorielles. De plus, des examens visuels sont réalisés par le personnel naviguant afin de détecter d'éventuels problèmes.
- Port : Les bagages des passagers sont contrôlés systématiquement à l'arrivée.

- Conteneurs : Les conteneurs transportant des produits animaux ou végétaux sont contrôlés par les agents du PIF à raison de 2 sur 3 par lots. Les règles d'échantillonnages sont moindres pour les autres types de conteneurs contrôlés par les douanes.
- Courrier : 3% des courriers arrivés sont tirés au sort et contrôlés par les agents des douanes.

Le système de contrôles et de détection des intrants est particulièrement problématique à la Réunion.

Dans le cas du contrôle des passagers et des bagages à main par le personnel de sécurité dans les aéroports, seuls certains éléments (armes, liquides…) sont particulièrement recherchés. Une reine dans sa grille à reine passera totalement inaperçue. Dans ce cas précis, le niveau de contrôle est très élevé mais le niveau de détection est nul à quasiment nul.

De la même façon, le transport des abeilles doit être déclaré en douanes à l'arrivée. Or, suite aux entretiens menés en 2012, il est apparu que les douanes n'avaient pas connaissance de l'arrêté préfectoral interdisant l'introduction d'abeilles. De ce fait, l'importation des abeilles peut se faire de la plus simple des manières, avec une déclaration de douanes ainsi qu'un certificat vétérinaire si elles sont originaires d'un pays tiers.

Enfin, dernière particularité, les abeilles ont un code douanier spécifique depuis seulement 2012. Auparavant elles faisaient partie d'une catégorie mixte qui regroupait un grand nombre d'insectes. Il est donc impossible de connaître s'il y a eu d'éventuelles introductions par le passé et les fréquences d'introduction.

4.3.2.2 Introduction volontaire

La séquence d'évènements permettant de définir le risque d'émission passera par la modélisation des voies possibles d'introduction de l'agent pathogène ciblé auquel s'ajoutera la probabilité de libération de l'agent pathogène dans le milieu extérieur.

La réalisation de la séquence d'émission dépendra de ces quatre principaux facteurs :

→ Infestation/infection de l'abeille importée
→ Comportement d'importation des apiculteurs réunionnais
→ Survie de l'hôte et de l'agent pathogène
→ Non contrôle de l'hôte et du parasite

La modélisation de la séquence d'émission est présentée en figure 18.

→ **Infestation/infection de l'abeille importée ($P_{IVV}1$ et $P_{IVV}2$)**

L'infestation ou l'infection d'une abeille dépendra du statut du pays d'origine. Comme nous avons pu le voir, à l'exception de *Tropilaelaps sp.*, les agents pathogènes ciblés sont présents dans un très grand nombre de pays. La diffusion de ces agents pathogènes au sein des colonies locales est également très importante. Donc, la probabilité qu'une abeille soit porteuse d'un agent pathogène variera selon le pays et l'agent pathogène ciblé. Globalement, cette probabilité est plutôt élevée.

Les pays à risque sont les pays avec lesquels il y a des échanges avec la Réunion (occasionnels ou fréquents), et, qui ont un statut sanitaire infecté/infesté ou douteux.

Ce sont les moyens de transport qui conditionnent la diversité des échanges avec les pays concernés.

- **Avion**

La Réunion compte deux structures aéroportuaires. La structure la plus importante se trouve à Sainte-Marie (Aéroport Roland Garros) et l'autre à Saint-Pierre (Pierrefonds).

Pour l'aéroport Roland Garros, le nombre total de passagers à débarquer a été de 997 474 en 2012 contre 1 044 974 en 2011. 13 588 mouvements d'avion ont été enregistrés pour 2012 contre 14 530 en 2011. Sur les 2 067 764 passagers ayant transité par l'aéroport, 58% sont originaires de la Réunion et France métropolitaine, 22% de Maurice, 8% de Madagascar, 7% de Mayotte, 2,5% d' « autres OI » (Comores, Seychelles et Afrique du Sud), 1,5% de Thaïlande et 1% d'Océanie (Australie et Nouvelle-Calédonie principalement).

Concernant l'aéroport de Pierrefonds, il a accueilli 540 passagers originaires de la Réunion et 1 501 passagers originaires de Maurice (données arrêtées à septembre 2012, données 2013 non disponibles).

- **Bateau**

Dans le cas des introductions par des passagers, les bateaux du trafic inter-île rallient uniquement l'île Maurice et Madagascar.
En 2011 (données 2012 et 2013 non disponibles), il y a eu 19 escales de paquebots et le passage de 40 590 croisiéristes, 117 escales de la navette inter-îles pour un total de 64 999 passagers.
Des bateaux de croisières accostent également à La Réunion, mais le risque que des passagers en vacances transportent des abeilles est quasiment nul. En conséquence, il ne sera pas pris en considération ici

GDS Réunion
L'action sanitaire ensemble

Séquence générale d'émission par introduction volontaire d'agents pathogènes par abeilles vivantes

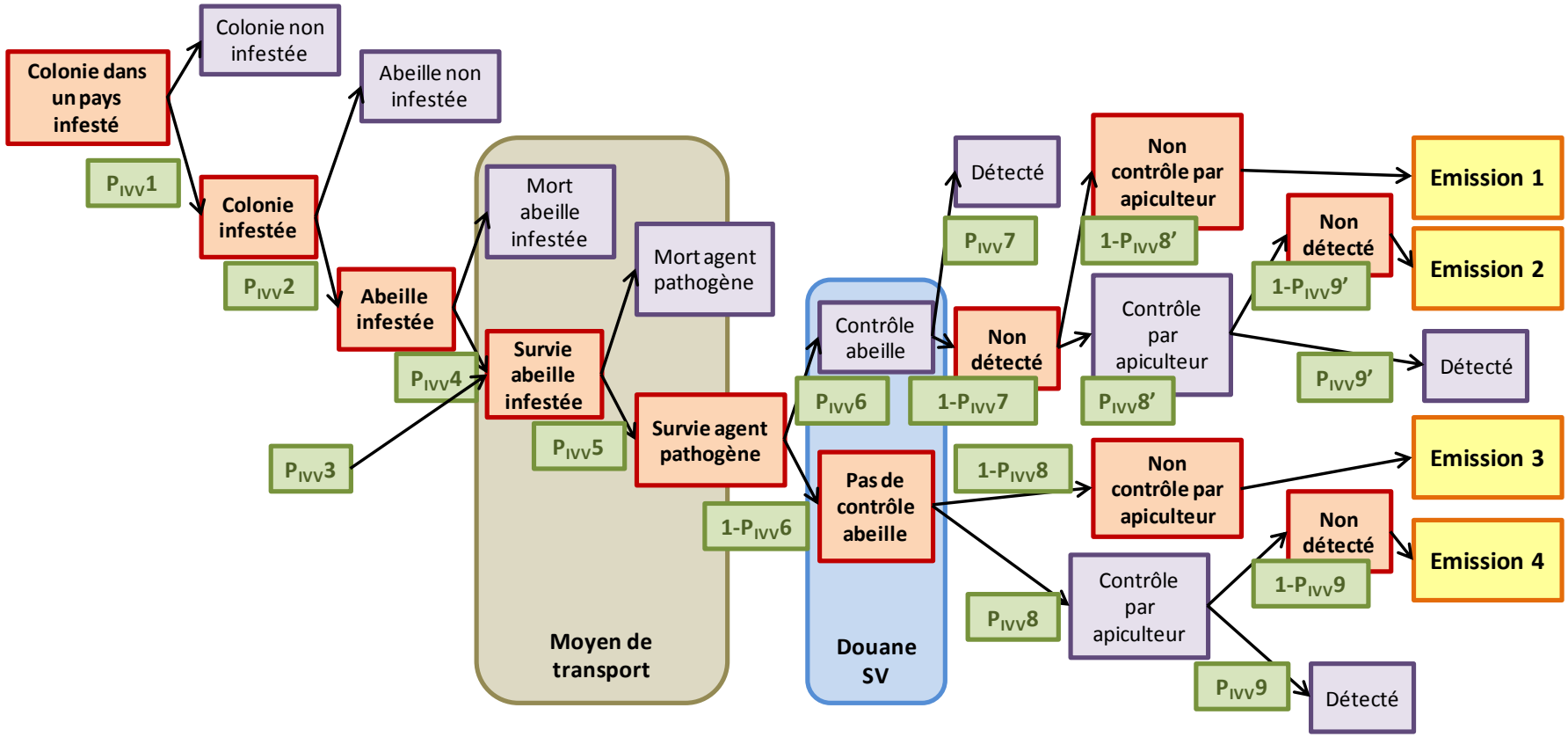


Figure 18 : Séquence générale d'émission par introduction volontaire d'agents pathogènes par abeilles vivantes

- **Courrier**

Les abeilles peuvent également être envoyées par courrier dans des cages à reines ou dans des colis spéciaux. En 2011, 4 398 tonnes de courriers ont été débarqués à La Réunion contre 4 269 en 2012 (données non disponibles pour 2013). Ces colis proviennent principalement de métropole et le temps moyen de traitement est de 7 jours (La Poste). Ceci permet la survie des reines mais pas d'un paquet d'abeilles. Pour les autres pays, comme Madagascar, la qualité du service postal n'est pas la même. De ce fait, les colis mettront plus de temps à arriver à destination ce qui impacte négativement la survie des abeilles. Pour tester cette voie d'entrée, un colis Collissimo© portant la mention « abeilles », accompagné de sa déclaration (détail des marchandises et valeurs) et contenant des cages à reines vides, à été envoyé au GDS courant 2012. Il a été reçu en moins de 4 jours. Ceci démontre que l'acheminement du courrier peut être très rapide, permettant la survie des abeilles, et l'efficacité des contrôles quasiment nulle.

- **Synthèse**

Le tableau ci-après synthétise les statuts sanitaires des différents pays concernés.

Pays	Statut sanitaire rapporté à l'OIE (janvier-juin 2013) vis-à-vis de		
	Paenibacillus larvae	***Varroa destructor***	***Tropilaelaps sp.***
France métropolitaine	Présence de la maladie	Présence de la maladie	Maladie jamais signalée
Madagascar	Aucune information n'est disponible pour cette maladie	Aucune information n'est disponible pour cette maladie[2]	Maladie jamais signalée
Maurice	Maladie jamais signalée	Maladie jamais signalée	Maladie jamais signalée
Afrique du Sud	Aucune information n'est disponible pour cette maladie[1]	Aucune information n'est disponible pour cette maladie[3]	Maladie jamais signalée
Australie	Présence de la maladie	Maladie non signalée durant cette période	Maladie jamais signalée
Nouvelle-Calédonie	Présence de la maladie	Maladie jamais signalée	Maladie jamais signalée
Thaïlande	Aucune information n'est disponible pour cette maladie	Aucune information n'est disponible pour cette maladie[4]	Maladie jamais signalée
Comores	Aucune information n'est disponible pour cette maladie	Aucune information n'est disponible pour cette maladie	Aucune information n'est disponible pour cette maladie
Mayotte	Aucune information n'est disponible pour cette maladie	Aucune information n'est disponible pour cette maladie	Aucune information n'est disponible pour cette maladie

[1] : Au premier semestre 2009, l'Afrique du Sud avait le statut « présence de la maladie », puis du second trimestre jusqu'à fin 2010, « maladie limitée à une ou plusieurs zones » et jusqu'à fin 2012 « maladie suspectée mais non confirmée ». Néanmoins, l'agent pathogène semblerait toujours être présent (M. Allsopp, communication personnelle).
[2] : Bien que *V. destructor* soit présent depuis 2010, la maladie n'a pas été notifiée à l'OIE pour 2013. L'agent pathogène est pourtant toujours présent et en extension (H. Rasolofoarivao, communication personnelle)
[3] : La maladie n'a pas été déclarée à l'OIE en 2013. Pourtant, *Varroa destructor* est bien présent en Afrique du Sud (M. Allsopp, communication personnelle).
[4] : La maladie n'a pas été notifiée à l'OIE en 2013. Néanmoins, le parasite est bien présent sur le territoire.

Tableau 13 : Statut sanitaire vis-à-vis de Paenibacillus larvae, Varroa destructor et Tropilaelaps sp. (source WAHID)

→ **Comportement d'importation ($P_{IVV}3$)**

D'après l'enquête réalisée en 2012, le comportement d'importation est nul. Aucun apiculteur audité n'avait déclaré avoir importé d'abeilles vivantes ni souhaité le réaliser.

Cependant, les comportements individuels restent difficilement quantifiables. Par conséquent, cette probabilité a été majorée de deux niveaux par rapport à « nul », elle est donc « minime ».

→ **Survie de l'hôte et des agents pathogènes ($P_{IVV}4$ et $P_{IVV}5$)**

Les durées de survie des agents pathogènes sont rappelées dans la partie « 4.3.1.6 Synthèse ».

Tous ces moyens de transport sont favorables à la survie de l'abeille.

Le trajet en avion le plus long est le trajet Saint-Denis – Paris et fait environ 11heures de vol. Ce laps de temps est largement suffisant pour assurer la survie des abeilles, que ce soit dans des bagages à main ou en soute, même si la température est légèrement plus fraîche qu'en cabine.

Les trajets en bateaux inter-îles sont réalisés en une vingtaine d'heures. De la même façon, ce temps est largement suffisant pour assurer la survie des abeilles.

Dans le cas du courrier, les délais sont plus longs et seules les reines sont à-même de survivre dans des cages spécifiques. Celles-ci comportent une réserve de nourriture sous forme de sucre candi, ce qui permet à la reine de survivre le temps du transfert. Ces méthodes de transport sont couramment utilisées en Europe entre les différents pays et les taux de mortalités associés sont très faibles. Dans le cadre d'un essaim nu, l'absence de réserve empêche une survie longue.

→ **Non-contrôle de l'hôte et du parasite ($P_{IVV}6$)**

Comme présenté dans la partie « 4.3.2.1. Mesures de contrôle et détection des intrants », la probabilité de contrôle est très élevée mais la probabilité de détection de l'hôte est minime.

La probabilité du contrôle de l'agent pathogène incriminé est encore plus faible, surtout si c'est une bactérie comme *Paenibacillus larvae*. Même *Varroa destructor*, qui est pourtant visible çà l'œil nu, a peu de chance d'être détecté macroscopiquement puisqu'il peut s'intercaler entre les tergites et les sternites de l'abeille.

Les probabilités que le contrôle par l'apiculteur ($P_{IVV}8$ et $P_{IVV}8'$) soit correctement réalisé sont très faible puisque l'apiculteur s'assurera juste du bon état général de l'abeille (souvent une reine). Enfin les probabilités de détection de l'agent pathogène ($P_{IVV}9$ et $P_{IVV}9'$) sont quasiment-nulles pour les agents pathogènes internes et légèrement supérieures pour les acariens ectoparasites.

Les différentes probabilités sont synthétisées dans le tableau XX.

Malgré les lègères variations du risque liées aux modalités de transport (courrier, avion, bateau…), le risque d'introduction et d'émission est globalement **quasi-nul**.

Probabilité	Niveau de risque associé à l'agent pathogène concerné		
	Paenibacillus larvae	*Tropilaelaps sp.*	*Varroa destructor*
$P_{IVV}1$	Elevé	Minime	Très élevé
$P_{IVV}2$	Elevé	Minime	Elevé
$P_{IVV}3$	Minime	Minime	Minime
$P_{IVV}4$	Elevé	Elevé	Elevé
$P_{IVV}5$	Elevé	Elevé	Elevé
$P_{IVV}6$	Minime	Minime	Minime
$P_{IVV}7$	Extrêmement faible	Extrêmement faible	Extrêmement faible
$P_{IVV}8$	Très faible	Très faible	Très faible
$P_{IVV}8'$	Très faible	Très faible	Très faible
$P_{IVV}9$	Quasi-nul	Extrêmement faible	Très faible
$P_{IVV}9'$	Quasi-nul	Extrêmement faible	Très faible
Emission 1	**Quasi-nul**	**Quasi-nul**	**Quasi-nul**
Emission 2	**Quasi-nul**	**Quasi-nul**	**Quasi-nul**
Emission 3	**Quasi-nul**	**Quasi-nul**	**Quasi-nul**
Emission 4	**Quasi-nul**	**Quasi-nul**	**Quasi-nul**

Tableau 14 : Caractérisation des probabilités intermédiaires et des niveaux de risque d'émission (émission 1 à 4)

4.3.2.3 Introduction involontaire

Les abeilles peuvent entrer sur l'île de la Réunion de manière accidentelle (involontaire) via un essaim sauvage (ou échappé d'élevage type essaim de supersédure ou essaim de famine) mais également sous forme d'abeilles isolées qui peuvent s'installer sur un bateau ou un container, ou encore directement dans les soutes d'un avion.

La réalisation de la séquence d'émission dépendra de quatre principaux facteurs :

→ Infestation/infection de l'abeille importée
→ Installation sur un moyen de transport
→ Survie de l'hôte et de l'agent pathogène
→ Non contrôle de l'hôte et du parasite

La modélisation de la séquence d'émission est présentée en figure 19.

→ **Infestation/infection de l'abeille importée ($P_{IVI}1$ et $P_{IVI}2$)**

Les pays à risque sont les pays avec lesquels il y a des échanges avec la Réunion (occasionnels ou fréquents), et, qui ont un statut sanitaire infecté/infesté ou douteux, comme dans le cas des introductions volontaires d'abeilles.

- **Avion**

En 2012, il y a eu 13 588 mouvements d'avion réalisés à l'aéroport de Roland Garros. Les masses de fret débarquées pour l'année 2012 représentent 25 350 tonnes (contre 28 484 en 2011).

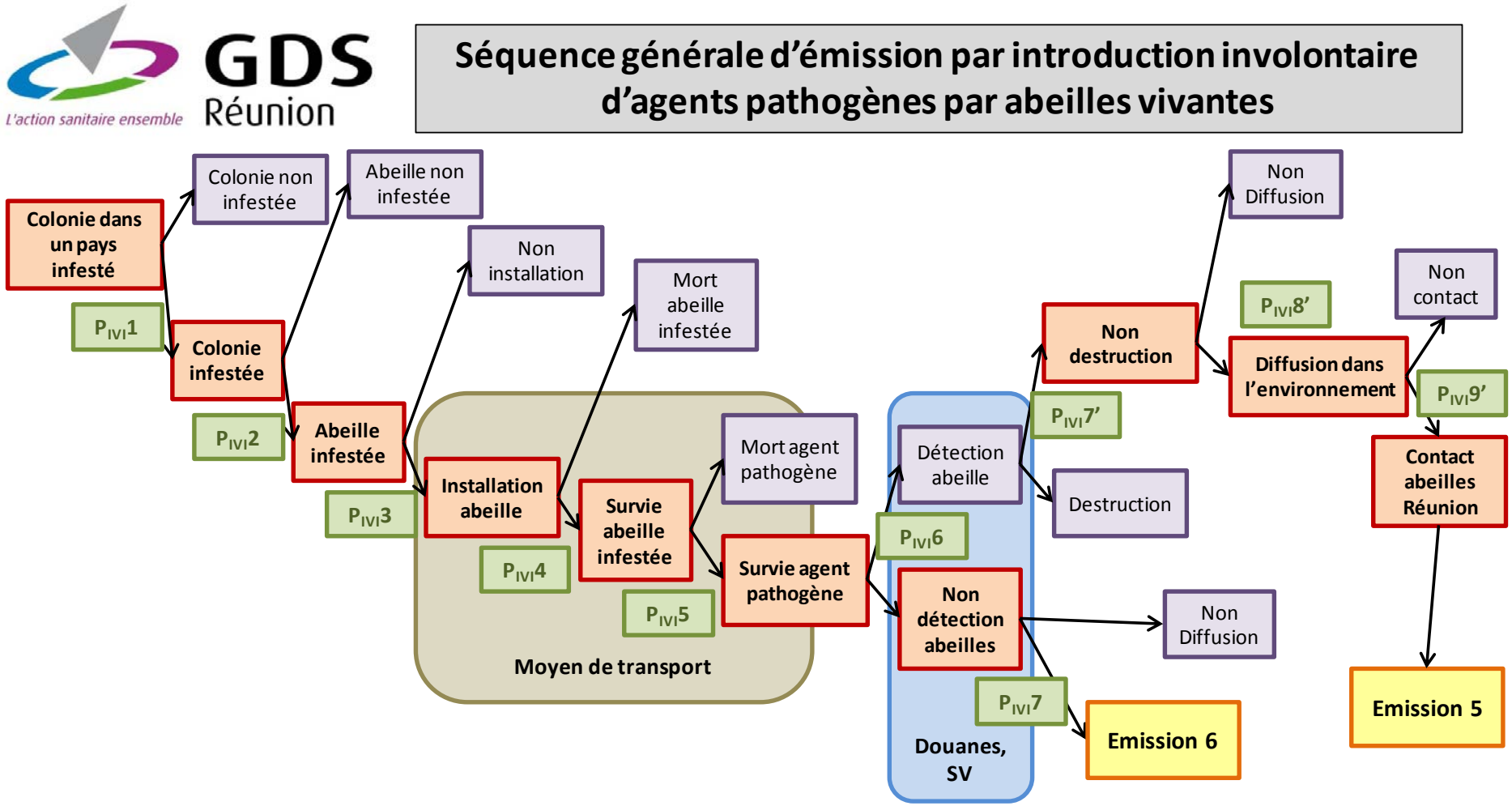


Figure 19 : Séquence générale d'émission par introduction involontaire d'agents pathogènes par abeilles vivantes

A l'aéroport de Pierrefonds, ce sont 2 576 tonnes qui ont débarqué contre 3 314 en 2011. Ce tonnage se subdivise en 805 tonnes intra Réunion (pour 35 mouvements) et 1 771 tonnes en provenance de Maurice (pour 77 mouvements). Les données 2012 ont été arrêtées à septembre 2012 et les données 2013 ne sont pas disponibles.

- **Bateau**

En 2011, 640 bateaux (tous types confondus) ont accosté à La Réunion, dont 153 originaires d'Asie et d'Afrique et 119 de la région Océan Indien. La survie d'un essaim varie entre 7 et 15 jours selon le type d'essaim, les ressources transportées par l'essaim et celles disponibles sur le moyen de transport. En ce qui concerne des abeilles isolées, elle est plus courte, environ 4 jours, et est également fonction des ressources disponibles. Les pays à risque sont donc ceux infestés par le parasite et à moins de 15 jours de mer de La Réunion.

- **Conteneur**

Les origines des conteneurs sont les mêmes que celles des avions et bateaux. Le nombre de conteneurs transitant par bateau a été de 74 891 (dont 67 278 non réfrigérés) soit 3 000 000 de tonnes de marchandises. Le nombre de conteneurs provenant des pays à risque (ceux à moins de 15 jours de bateau) sont de : 7205 (Afrique australe, Océan Indien, Moyen Orient) et 25 667 de la région Asie-Pacifique (Annexe 9). Par avion, le nombre de conteneurs n'est pas disponible, mais 20 473 tonnes de marchandises ont été amenées par fret aérien.

Les pays à risque d'introduction accidentelle d'abeilles sont représentés dans le tableau suivant :

Avion	Bateau
France métropolitaine	Madagascar (20h)
Madagascar	Afrique du Sud (5 à 6 jours)
Ile Maurice	Mozambique (5 jours)
Afrique du Sud	Sultanat d'Oman (7 jours)
Australie	Emirats Arabe Unis (8 jours)
Nouméa	Singapour (10 jours)
Asie du Sud Est	

Tableau 15 : Synthèse des pays à risque et à moins de 15 jours de trajet de la Réunion

Le statut sanitaire des pays identifiés comme étant à risque est présenté sur le tableau suivant :

Pays	Moyen de transport	Statut sanitaire rapporté à l'OIE (janvier-juin 2013) vis-à-vis de *Paenibacillus larvae*	*Varroa destructor*	*Tropilaelaps sp.*
Mozambique	Bateau	Aucune information n'est disponible pour cette maladie[1]	Aucune information n'est disponible pour cette maladie[2]	Aucune information n'est disponible pour cette maladie[3]
Sultanat d'Oman	Bateau	Aucune information n'est disponible pour cette maladie	Aucune information n'est disponible pour cette maladie	Aucune information n'est disponible pour cette maladie
Emirats Arabes Unis	Bateau	Aucune information n'est disponible pour cette maladie	Aucune information n'est disponible pour cette maladie	Aucune information n'est disponible pour cette maladie
Singapour	Bateau	Maladie jamais signalée[4]	Maladie jamais signalée[5]	Maladie jamais signalée[6]

[1] : La proximité géographique avec l'Afrique du Sud où l'agent pathogène est présent fait que la loque américaine est certainement présente.
[2] : La proximité géographique avec l'Afrique du Sud et la Tanzanie (David, communication personnelle) où Varroa destructor est présent
[3] : Jusqu'à présent la maladie n'avait jamais été déclarée jusqu'en 2012 (« maladie jamais déclarée ») et les informations sont manquantes pour 2013
[4] : *Paenibacillus larvei*, compte tenu de sa dispersion mondiale risque d'être présente à Singapour.
[5] et [6] : Singapour est en pleine zone d'origine des deux acariens ectoparasites. Il est donc très fortement probable que ces pays soient infestés. De la même manière, la proximité avec la Malaisie où les parasites ont déjà été observés confortent cette hypothèse.

Tableau 16 : Statut sanitaire vis-à-vis de Paenibacillus larvae, Varroa destructor et Tropilaelaps sp. des différents pays à risque (source WAHID)

→ **<u>Installation sur un moyen de transport</u> ($P_{IVI}3$)**

L'installation des abeilles sur un bateau, un avion ou un conteneur est très aléatoire et considérée comme très faible. Cependant plus le temps de passage à quai, au sol et ouvert est long, plus il y a des chances que des abeilles arrivent, surtout si ces marchandises transportées sont attractives, comme le sucre. Il en va de même pour le départ de ces abeilles. Le risque d'installation dans un avion peut être augmenté par la présence de ruches sur le site aéroportuaire ou encore la nuit puisque les abeilles peuvent être attirées par la lumière des lampadaires et projecteurs.

Au port de La Réunion, le temps moyen de passage à quai est de 620 à 750h, le départ des abeilles du bateau est donc quasiment certain. Les avions, quant à eux, peuvent rester au sol et ouvert environ 2 à 4h. Au chargement, les conteneurs restent généralement ouverts quelques heures. Les abeilles peuvent également être introduites en même temps que les marchandises, comme des fleurs fraiches par exemple. Le parasite à été retrouvé par les agents des douanes de New-York dans des conteneurs de fleurs fraiches venant d'Amérique du Sud. En 2011, 4497 tonnes de fleurs fraiches ont été importées à La Réunion. Mais d'après les agents de contrôles phytosanitaires, la présence d'une abeille est hautement improbable du fait des traitements chimiques et du conditionnement des fleurs (nettoyage et stockage sous plastique).

Globalement, cette probabilité est « extrêmement faible ».

→ **<u>Survie de l'hôte et des agents pathogènes</u> ($P_{IVI}4$ et $P_{IVI}5$)**

La probabilité qu'un essaim survive est plus grande que celle de quelques abeilles à cause du nombre plus important d'individus et des ressources transportées. De la même façon, la survie des agents pathogènes (*Paenibacillus larvei* et *Varroa destructor*) sera favorisée au sein d'un essaim plutôt que sur une abeille isolée. Concernant *Tropilaelaps sp.*, son incapacité chronique à survivre au-delà de 48 heures en dehors du couvain limite énormément sa survie sur abeilles vivantes ou mortes.

La probabilité finale de survie de l'agent pathogène et d'au moins une abeille est globalement estimée à assez élevée. Ces probabilités peuvent minorées dans le cas d'abeilles isolées et majorées dans le cas d'un essaim.

→ **Contrôle et détection de l'hôte et du parasite ($P_{IVI}6$)**

Cette probabilité est très faible. Les contrôles ont été abordés dans la partie concernant les introductions volontaires (4.3.2.2. Introduction volontaire).

La probabilité a été majorée puisque les conteneurs de végétaux sont plus contrôlés que les conteneurs de tout-venant. Cela tient de l'organisation des contrôles (Poste d'Insepection aux Frontières vs. Douanes).

Le risque d'introduction et d'émission par introduction involontaire (ou accidentelle) est globalement **minime**.

Probabilité	Niveau de risque associé à l'agent pathogène concerné		
	Paenibacillus larvae	***Tropilaelaps sp.***	***Varroa destructor***
$P_{IVI}1$	Elevé	Minime	Très élevé
$P_{IVI}2$	Elevé	Minime	Elevé
$P_{IVI}3$	Extrêmement faible	Extrêmement faible	Extrêmement faible
$P_{IVI}4$	Assez élevé	Assez élevé	Assez élevé
$P_{IVI}5$	Assez élevé	Très faible	Assez élevé
$P_{IVI}6$	Très faible	Très faible	Très faible
$P_{IVI}7$	Extrêmement faible	Extrêmement faible	Extrêmement faible
$P_{IVI}7'$	Elevé	Elevé	Elevé
$P_{IVI}8'$	Assez élevé	Minime	Faible
$P_{IVI}9'$	Elevé	Elevé	Elevé
Emission 5	**Minime**	**Quasi-nul**	**Minime**
Emission 6	**Minime**	**Quasi-nul**	**Minime**

Tableau 17 : Caractérisation des probabilités intermédiaires et des niveaux de risque d'émission (émissions 5 et 6)

4.3.3 Introduction des agents pathogènes par du matériel apicole

Les modalités d'introduction des agents pathogènes par du matériel apicole sont présentées dans la figure 20.

Les voies d'introduction de matériel apicole sont les mêmes que pour les introductions volontaires d'abeilles : l'avion, le bateau (conteneur) et le courrier.

L'introduction d'agents pathogènes par du matériel apicole se fera par du matériel apicole contaminé. Le matériel neuf, par définition, n'aura jamais été en contact avec des abeilles. Il ne sera donc pas considéré dans cette étude. Seul le matériel apicole d'occasion est potentiellement porteur d'agents pathogènes.

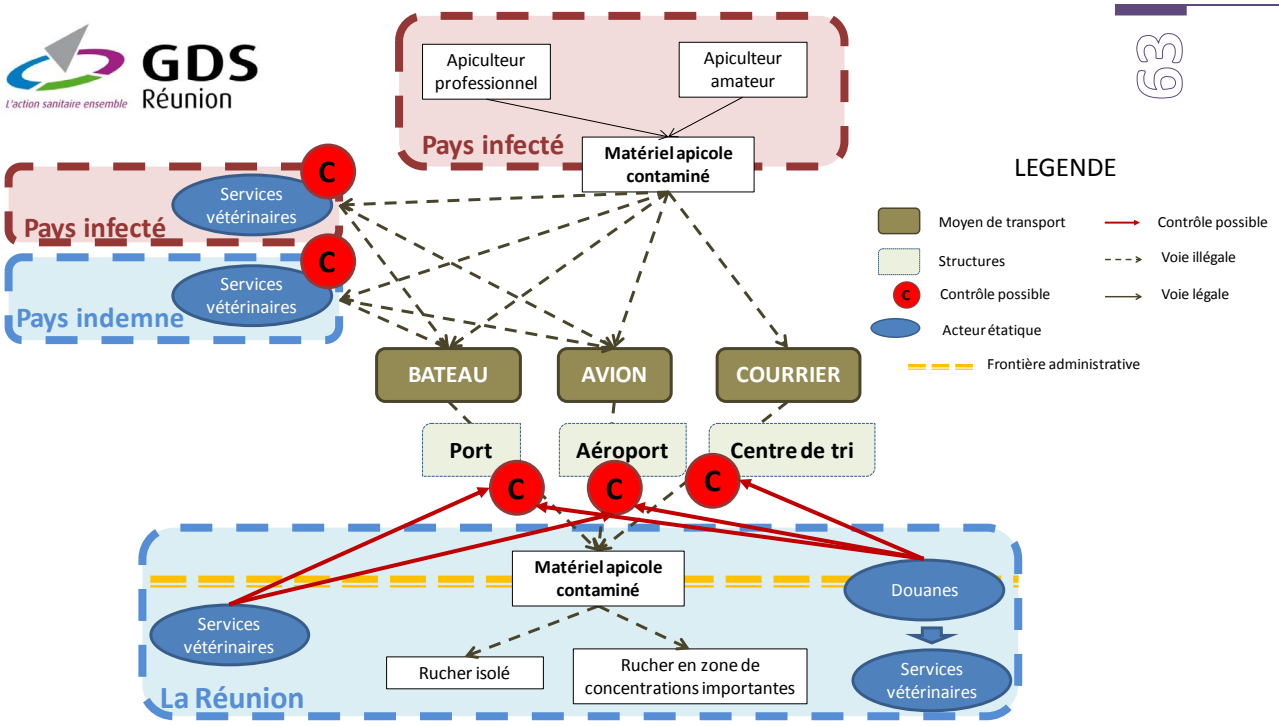


Figure 20 : Modèle conceptuel présentant les différents voies possibles d'introductions de *Paenibacillus larvei* et *Tropilaelaps sp.* et *Varroa destructor* via du matériel contaminé

Parmi le matériel apicole d'occasion, le risque principal est constitué par les composants de la ruche en bois (corps, hausse, plateau, nourrisseur) et surtout par des cadres de cire bâtie. Le matériel en plastique est moins à risque.

Les lève-cadres, l'enfumoir ou encore les combinaisons ou balayettes représentent un risque très faible, tout comme des maturateurs ou des extracteurs.

[*Cas particulier du sirop de nourrissement :*
Le sirop de nourrissement n'est pas vraiment un produit de la ruche et il sera considéré ici comme du matériel. Le sirop de nourrissement est souvent constitué à base d'hydrolysat d'amidon de blé ou de maïs associés à divers composants. Plusieurs sociétés de vente et d'approvisionnement en matériel en proposent de différents types.
Il est déjà arrivé à la Réunion que certains importateurs ont déjà reçu des seaux de sirop de nourrissement avec des abeilles à l'intérieur (P. Faustin, communication personnelle).
Cela est dû au fait que certaines abeilles du pays d'origine aient identifiées une source de nourriture et se soient nourries à la faveur d'un seau percé ou mal fermé. Elles ont pu être ensuite prisonnières dedans ou s'être noyées.
Si bien sûr, les abeilles sont contaminées, il est probable qu'elles aient contaminé le contenu.]

La séquence d'introduction est présentée en figure 21.

GDS Réunion
L'action sanitaire ensemble

Séquence générale d' émission par introduction volontaire d'agents pathogènes par du matériel apicole contaminé

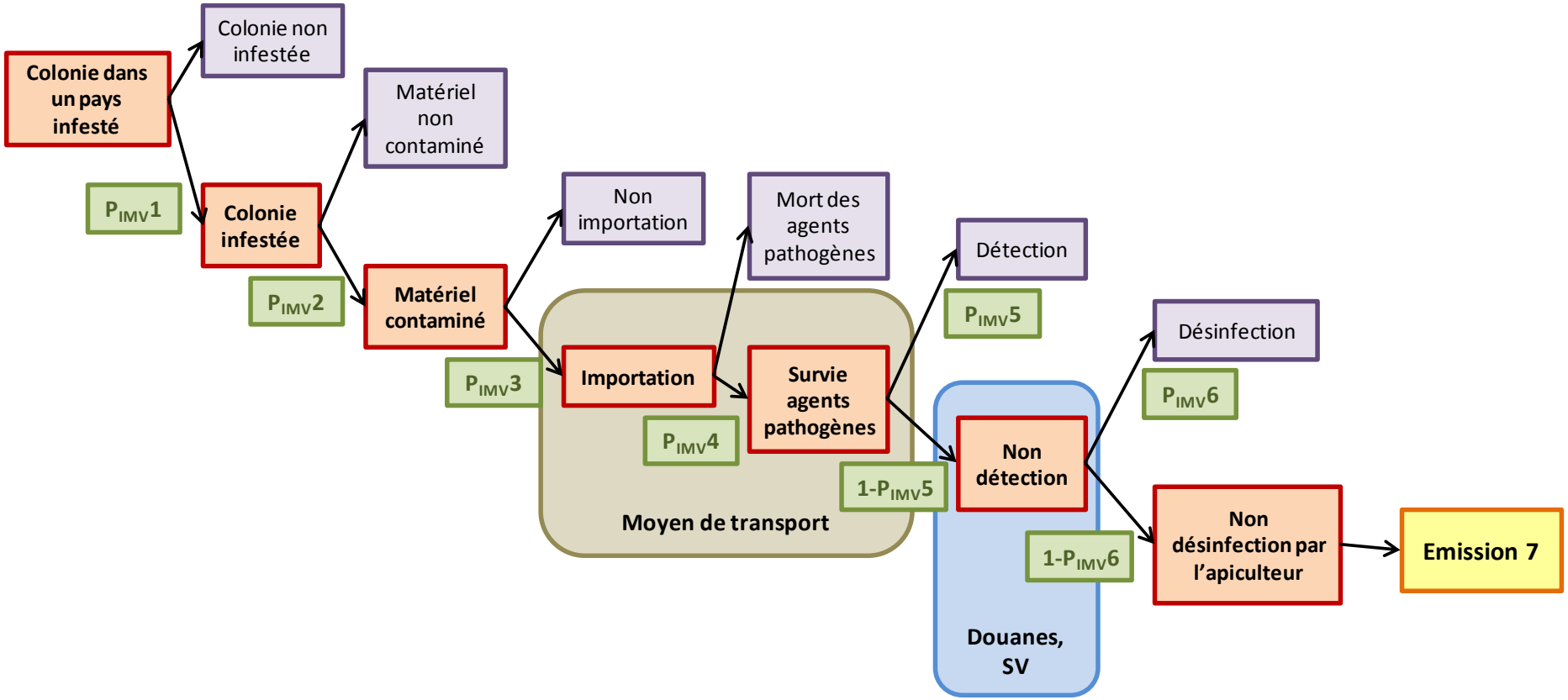


Figure 21 : Séquence générale d'émission par introduction involontaire d'agents pathogènes par matériel apicole contaminé

Les modalités influençant l'introduction d'agents pathogènes par le matériel contaminé sont :

- → Infestation/infection du matériel
- → Importation
- → Survie de l'agent pathogène
- → Absence de contrôles
- → Non désinfection par l'apiculteur

→ **<u>Contamination du matériel apicole d'occasion</u> ($P_{IMV}1$ et $P_{IMV}2$)**

La probabilité que le matériel soit contaminé dépend du statut du pays d'origine et du temps de contact entre le matériel et une colonie contaminée.

→ **<u>Importation</u> ($P_{IMV}3$)**

D'après l'enquête réalisée en 2012, les importations semblent être nulles et les apiculteurs assez sensibles à ce risque. Les apiculteurs professionnels ou semi-professionnels n'ont pas pour habitude d'acheter du matériel d'occasion localement, donc encore moins pour du matériel d'occasion extérieur.

Le pays le plus à risque, puisque réalisant le plus d'échanges avec la Réunion, est la France métropolitaine.

Début 2013, le GDS a reçu plusieurs informations comme quoi un apiculteur métropolitain se serait installé dans le secteur de Saint-Benoît et serait avec du matériel apicole d'occasion qu'il aurait revendu localement. Ces informations ont été relayées auprès de la DAAF et n'ont pu être mises en évidence.

→ **<u>Survie de l'agent pathogène</u> ($P_{IMV}4$)**

Potentiellement, le matériel pourrait être contaminé plutôt par des spores de *Paenibacillus larvae* puisque leur capacité de résistance est exceptionnelle dans le milieu extérieur (30 à 40 ans). *Varroa destructor* ne peut survivre qu'une vingtaine d'heures. *Tropilaelaps sp*. est quant à lui incapable de survivre plus de 48 heures dans du matériel.

$P_{IMV}4$ variera par conséquent de « nul » à « très élevé » en fonction de l'agent pathogène concerné.

→ **<u>Contrôle et détection</u> ($P_{IMV}5$)**

L'arrêté préfectoral n°0716 du 02 avril 2003 (article 19) interdit l'importation de matériel apicole d'occasion.

Le matériel apicole et plus particulièrement les ruches ne disposent pas d'un code douanier spécifique. Par conséquent aucune déclaration de douanes ne sera spécifique « ruche ».

Dans le cadre d'un container constitué par un particulier lors d'un déménagement par exemple, il n'y a quasiment aucune chance que ce matériel pourtant interdit à l'importation soit détecté par les douanes.

Cette probabilité peut-être considérée comme « quasi-nulle ».

→ **Désinfection du matériel ($P_{IMV}6$)**

La probabilité que la désinfection du matériel soit efficace est plus grande pour les deux acariens ectoparasites que pour les spores de *Paenibacillus larvae*.

La désinfection la plus efficace contre *P. larvae* reste le passage de la flamme au chalumeau. Néanmoins, la probabilité qu'une ruche en bois soit convenablement désinfectée est plutôt faible.

Le risque d'introduction et d'émission varie donc de nul à très faible.

	Niveau de risque associé à l'agent pathogène concerné		
Probabilité	***Paenibacillus larvae***	***Tropilaelaps sp.***	***Varroa destructor***
$P_{IMV}1$	Elevé	Minime	Très élevé
$P_{IMV}2$	Très élevé	Minime	Faible
$P_{IMV}3$	Extrêmement faible	Extrêmement faible	Extrêmement faible
$P_{IMV}4$	Très élevé	Nul	Quasi-nul
$P_{IMV}5$	Quasi-nul	Quasi-nul	Quasi-nul
$P_{IMV}6$	Faible	Assez élevé	Assez élevé
Emission 7	**Très faible**	**Nul**	**Nul**

Figure 22 : Caractérisation des probabilités intermédiaires et des niveaux de risque d'émission (émissions 7)

4.3.4 Introduction des agents pathogènes par des produits de la ruche contaminés

On entend par produits de la ruche le miel, le pollen et la cire. La gelée royale n'est pas utilisée en tant que telle en apiculture.

Les modalités d'introduction sont présentées sur la figure 23.

Le miel et le pollen, s'ils ne sont pas destinés au nourrissement des abeilles, peuvent-être importés à la Réunion. Dans le cas contraire, l'article n°19 de l'arrêté préfectoral du 02 avril 2003 interdit son introduction et son utilisation sur l'île.

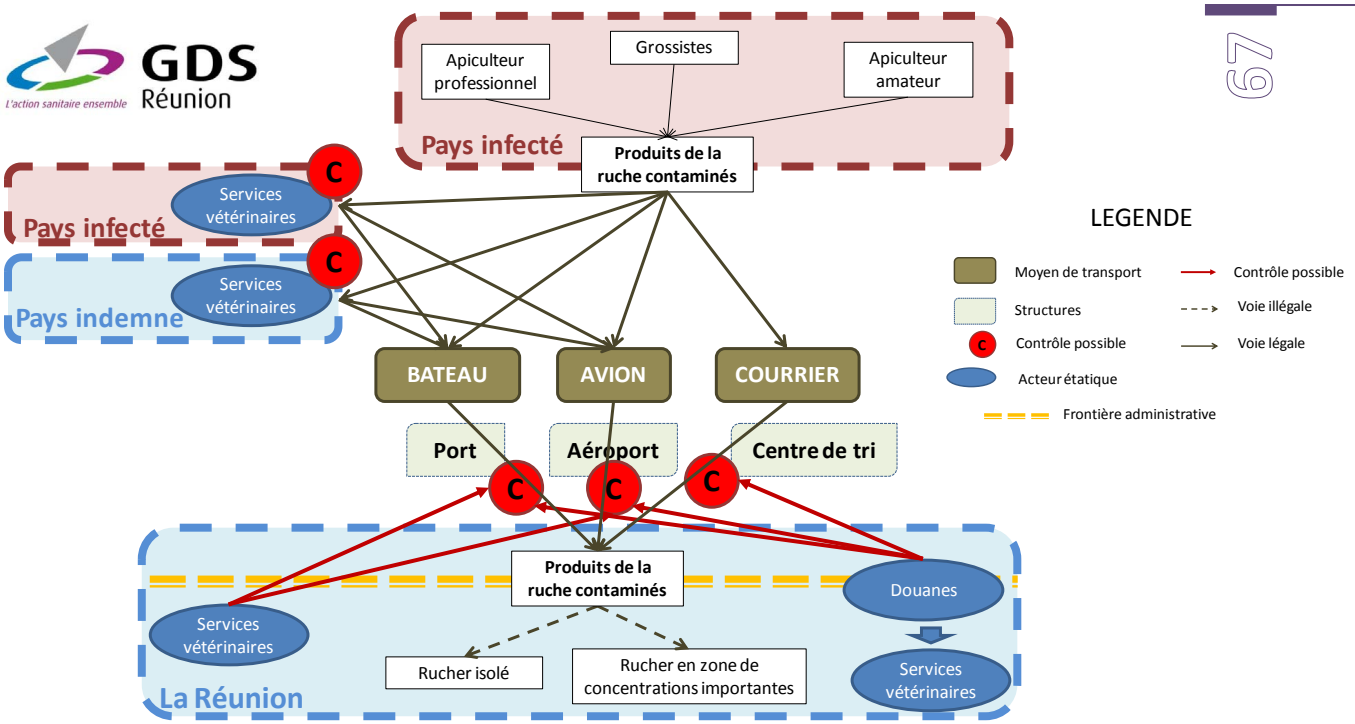


Figure 23 : Modèle conceptuel présentant les différents voies possibles d'introductions de *Paenibacillus larvei* et *Tropilaelaps sp.* et *Varroa destructor* via des produits de la ruche contaminés

La séquence d'introduction est présentée en figure 24.

Les modalités influençant l'introduction d'agents pathogènes par des produits de la ruche contaminés sont :

→ Contamination des produits de la ruche
→ Importation
→ Survie de l'agent pathogène
→ Absence de contrôles
→ Non désinfection par l'apiculteur

→ **<u>Contamination des produits de la ruche</u> ($P_{IPV}1$ et $P_{IPV}2$)**

La contamination des produits de la ruche dépendra essentiellement du statut du pays d'origine. Le seul danger concerné par les produits de la ruche est le bacille de la loque américaine.

→ **<u>Importation</u> ($P_{IPV}3$)**

D'après l'enquête réalisée en 2012, aucun apiculteur n'a déclaré avoir importé du miel ou du pollen dans le but d'effectuer du nourrissement sur ses colonies. Pour le miel et le pollen, cette probabilité est quasi-nulle voire nulle. Les sociétés ou associations vendant du matériel apicole n'importent pas de produits de la ruche pour le nourrissement.

GDS Réunion
L'action sanitaire ensemble

Séquence générale d' émission par introduction volontaire d'agents pathogène par produits de la ruche contaminés

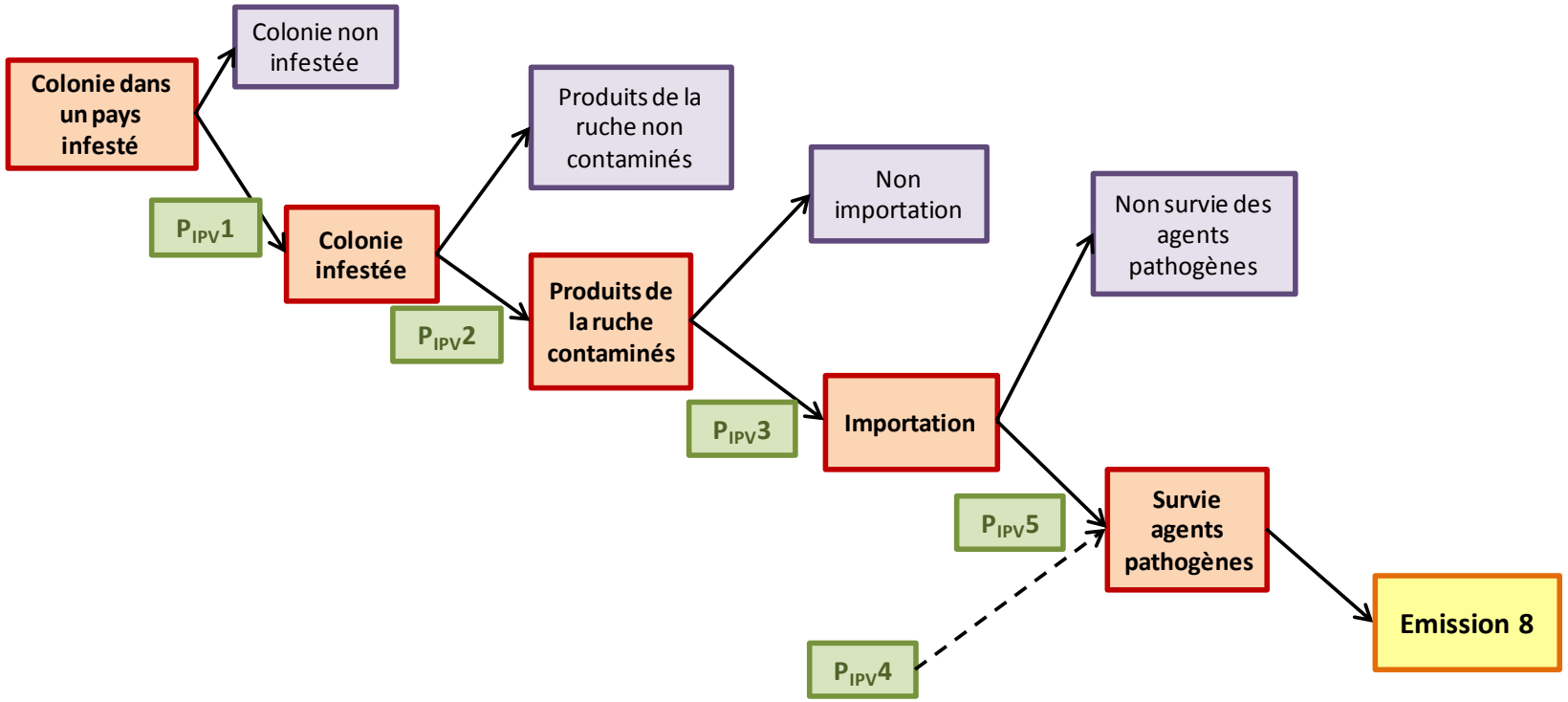


Figure 24 : Séquence générale d'émission par introduction volontaire d'agents pathogènes par produits de la ruche contaminés

Par contre, certains apiculteurs de loisirs, comme cela a été rapporté lors d'une réunion publique organisée par le CIRAD, par méconnaissance effectuent du nourrissement avec du miel acheté dans le commerce.

Or, le miel est potentiellement porteur de spores de *Paenibacillus larvae*.

Le tableau 18 présente les origines du miel importé à la Réunion depuis 2010. 5 pays sont concernés : France, Espagne, Inde, Pays-Bas et USA. Tous ces pays à l'exception de l'Inde ont notifié la présence de loque américaine à l'OIE. Il y a de grandes chances que les miels importés à la Réunion soient porteurs de spores de *P. larvae*.

DOM	LibPaysDOM	NC8	LibNC8	LibPays	VAL IMP 2010	VAL IMP 2011	VAL IMP 2012	QTE IMP 2010	QTE IMP 2011	QTE IMP 2012
RE	Reunion	04090000	Miel naturel	Espagne	-	3 175	24 021	-	582	5 191
RE	Reunion	04090000	Miel naturel	France	427 242	520 089	773 057	132 469	172 550	242 045
RE	Reunion	04090000	Miel naturel	Inde	-	-	1 968	-	-	567
RE	Reunion	04090000	Miel naturel	Pays-bas	-	-	1 059	-	-	180
RE	Reunion	04090000	Miel naturel	Etats-unis	2 677	-	-	451	-	-

Tableau 18 : Nombre de kg de miel importés à la Réunion en 2010, 2011 et 2012

Egalement, à une échelle de risque moindre mais non négligeable, les apiculteurs sont de grands amateurs de miels qu'ils ramènent ou se font offrir des quatre coins du monde et ont très souvent à proximité de leur domicile ou dans leur jardin quelques ruches. Là, les abeilles sont capables d'identifier le pot de miel potentiellement infesté comme étant une source de nourriture.

Le risque que les produits de la ruche soient contaminés est élevé pour *P. larvae* et nul pour les deux acariens ectoparasites.

→ **<u>Contrôles</u> (P_{IPV}4)**

Les douanes n'ayant pas connaissance de l'arrêté préfectoral concernant l'apiculture, il est très peu probable que du miel importé pour le nourrissement des abeilles soit détecté et éventuellement saisi.

De la même façon, le pollen n'a pas de code douanier spécifique et pourrait être identifié via le code n°12129970 (« Noyaux et amandes de fruits et autres produits végétaux - y.c. les racines de chicorée non-torréfiées de la variété 'cichorium intybus sativum' -, servant principalement a l'alimentation humaine, n.d.a. ») ou le n°12129995 (« Noyaux et amandes de fruits et autres produits végétaux servant principalement à l'alimentation humaine, n.d.a. »).

P_{IPV}4 est donc considérée comme quasi-nulle.

→ **<u>Survie de l'agent pathogène</u> (P_{IPV}5)**

Les spores de loque américaine peuvent résister plus d'un an dans le miel et encore plus longtemps dans le pollen.

$P_{IPV}5$ sera donc très élevé pour *P. larvae*.

Probabilité	Niveau de risque associé à l'agent pathogène concerné		
	Paenibacillus larvae	***Tropilaelaps sp.***	***Varroa destructor***
$P_{IPV}1$	Elevé	Minime	Très élevé
$P_{IPV}2$	Très élevé	Nul	Nul
$P_{IPV}3$	Très élevé	Quasi-nul	Très élevé
$P_{IPV}4$	Quasi-nul	Quasi-nul	Quasi-nul
$P_{IPV}5$	Très élevé	Nul	Nul
Emission 8	**Assez élevé**	**Nul**	**Nul**

Figure 25 : Caractérisation des probabilités intermédiaires et des niveaux de risque d'émission (émissions 8)

Le risque d'émission d'agents pathogènes par les produits de la ruche est très variable selon l'agent pathogène ciblé. Cela variera de nul pour *V. destructor* et *Tropilaelaps sp.* à assez élevé pour *P. larvae*.

4.3.5 Cas particulier d'*Aethina tumida*

Le risque d'émission d'*Aethina tumida* est particulièrement difficile à appréhender. Sa biologie particulière fait que seuls les œufs et les larves pour une période de temps limitée sont inféodés à la ruche. L'adulte ne retrouvera la ruche que pour pondre.

A la toute fin du XXème siècle, le petit coléoptère des ruches fut observé pour la première fois dans l'hémisphère nord en Floride (1998). De là, il a colonisé tous les Etats-Unis d'Amérique et en 2002 il fut introduit au Canada, à Manitoba via de la cire d'abeille. Son introduction aux USA n'est pas comprise à l'heure actuelle mais est certainement liée aux activités portuaires de la côte Est.

A l'heure actuelle le parasite n'est pas présent en Europe. Une observation fut constatée en 2004 au Portugal. Des œufs furent retrouvés dans des cages à reine. Des mesures de police sanitaire draconiennes ont permis la destruction et la non diffusion du petit coléoptère des ruches.

Les facteurs d'introduction du parasite sont les suivants :

- Mouvements d'abeilles (particulièrement des reines)
- Mouvements d'hôtes alternatifs (comme les bourdons du genre *Bombus*)
- Commerce de produits apicoles (particulièrement les cires brutes)
- Sol ou compost associé au commerce des plantes
- Import de fruits, particulièrement de fruits tropicaux
- Vêtements d'apiculteurs (combinaisons, vareuses, etc.)
- Mouvements de containers ou de véhicules
- Dispersion naturelle (environ 10 km)

Parmi les pays qui échangent le plus avec la Réunion, deux sont concernés par la présence du petit coléoptère des ruches : l'Afrique du Sud et Madagascar.

[*Remarque :* *la présence d'Aethina tumida est suspectée à Madagascar mais n'a jamais été officiellement confirmée.*]

→ **Mouvements d'abeille :**

Dans ce cas précis, seules les reines encagées sont considérées.

Les principaux pays producteurs de reines de sélection à haute valeur ajoutée sont majoritairement en Europe. Donc si des apiculteurs devaient s'approvisionner en reines, ce serait depuis ce continent. Or, nous avons vu que ces pratiques n'avaient pas lieu chez les apiculteurs.

Le risque d'émission pour cette voie-ci peut être considéré comme « **quasi-nul** » (risque nul majoré en raison des comportements individuels non prévisibles).

→ **Mouvements d'hôtes alternatifs :**

Voie négligeable, ne sera pas prise en compte dans cette étude.

→ **Commerce de la cire :**

La cire importée à la Réunion est originaire de France, où *A. tumida* est absent.

Le risque d'émission liée au commerce de la cire peut être considéré comme « **nul** ».

→ **Import de fruits :**

L'import de fruits peut se réaliser de deux manières : commerce ou via des voyageurs.

L'importation de fruits à la Réunion est régie par un certain nombre de contraintes sanitaires qui font que la survenue du petit coléoptère des ruches est très faiblement probable. La sensibilité de la production fruitière locale face à de nombreux bio-agresseurs fait que les services de l'Etat sont particulièrement vigilants sur les risques d'introductions. Par contre, les échanges de passagers entre les îles de l'Océan Indien (particulièrement Madagascar) sont susceptibles d'introduire *A. tumida* via des fruits ou légumes frais.

Le risque d'émission concernant cette voie particulière est évalué à « **quasi-nul** ».

→ **Vêtements d'apiculteurs :**

Lors de voyages d'études ou de vacances à l'étranger (et particulièrement en zone infestée), les apiculteurs peuvent à la faveur d'une visite de rucher contaminer leurs vêtements. Le petit coléoptère des ruches peut se glisser dans un repli du tissu et être ramené à la Réunion.

Lors d'un voyage organisé par le SAR en Afrique du Sud en 2012 et à Madagascar en 2013, la prise en compte de cette composante sanitaire était majeure de la part des apiculteurs. Le GDS a rédigé une note de bonnes pratiques sanitaires et une des préconisations majeures était de ne pas ramener à la Réunion de tenues apicoles ou de les faire bouillir préalablement avant le retour.

Ce risque d'émission peut être considéré comme « **quasi-nul** ».

→ **Mouvements de containers ou de véhicules :**

Cette voie d'introduction est possible. Le risque d'émission via des mouvements de containers peut être considéré comme « **quasi-nul** ».

→ **Dispersion naturelle**

Le petit coléoptère des ruches peut voler sur de relativement longues distances pour un insecte de cette taille. Sa présence n'étant pas confirmée à Madagascar, cette voie d'exposition ne sera pas considérée.

Emission	Probabilité d'émission
Mouvements d'abeilles	Quasi-nul
Mouvements d'hôtes alternatifs	
Commerce de produits apicoles	Nul
Sol ou compost associé aux plantes	Quasi-nul
Import de fruits	Quasi-nul
Vêtements utilisés d'apiculteurs	Quasi-nul
Mouvements de containers	Quasi-nul
Dispersion naturelle	

Tableau 19 : Synthèse des probabilités d'émission pour *Aethina tumida*

4.3.6 Conclusions sur le risque d'émission

Les niveaux de risque sont plutôt très bas concernant l'émission des agents pathogènes ciblés dans cette étude, mis à part le risque d'émission de *P. larvae* par les produits de la ruche contaminés.

Le tableau 20 présente la synthèse des niveaux de risque associés à chaque agent pathogène

Probabilité	Niveau de risque associé à l'agent pathogène concerné		
	Paenibacillus larvae	*Tropilaelaps sp.*	*Varroa destructor*
Emission 1	Quasi-nul	Quasi-nul	Quasi-nul
Emission 2	Quasi-nul	Quasi-nul	Quasi-nul
Emission 3	Quasi-nul	Quasi-nul	Quasi-nul
Emission 4	Quasi-nul	Quasi-nul	Quasi-nul
Emission 5	Minime	Quasi-nul	Minime
Emission 6	Minime	Quasi-nul	Minime
Emission 7	Très faible	Nul	Nul
Emission 8	Assez élevé	Nul	Nul

Tableau 20 : Synthèse des niveaux de risque associés à chaque émission

Néanmoins, certaines voies sont à considérer avec plus d'intérêts que d'autres en raison des comportements individuels des apiculteurs et sont impossibles à mettre en évidence dans un processus classique d'analyse de risque. Il s'agit des émissions 1 à 4 et 7. Dans ces cas précis, le niveau de risque est proche de 0 (entre très faible et nul), mais une seule introduction suffirait à induire une situation potentiellement catastrophique, particulièrement dans le cas de Varroa.

Plutôt que de rehausser le niveau de risque de manière substantielle, il est plus pertinent de rester sur des probabilités qui restent dans des ordres de grandeur du quasi-nul. En effet, *Varroa destructor* est présent depuis 1983 en France métropolitaine. C'est le pays qui échange le plus avec la Réunion. Si la probabilité d'émission était élevée, le parasite serait déjà rentré sur le territoire réunionnais. Or, il n'en est rien et c'est pourquoi les niveaux de probabilités doivent rester très faibles, ce qui correspond à la réalité du terrain.

Par contre, si le développement de l'apiculture continue de cette manière et à cette vitesse sur l'île, quelques apiculteurs seront tentés par les souches améliorées d'abeilles domestiques européennes pour pallier aux déficits de ressources afin d'avoir des colonies plus productives. Dans ce contexte-là, il serait opportun de rehausser de manière significative les niveaux de risque d'émission des agents pathogènes et particulièrement celui lié à *Varroa destructor*.

4.4 Risque d'exposition

4.4.1 Abeilles vivantes suite à une introduction volontaire

L'exposition des abeilles réunionnaises aux agents pathogènes ciblés va dépendre du type de contact qu'il peut y avoir entre l'abeille importée et les abeilles locales.

La séquence d'évènements nécessaires à l'exposition des abeilles de la Réunion est présentée en figure 26.

Les modalités influençant l'exposition à des agents pathogènes suite à une introduction volontaire d'abeilles sont :

→ Introduction dans la ruche
→ Multiplication de l'agent pathogène
→ Expression de la maladie clinique

→ Détection ou non par l'apiculteur

→ **Introduction de l'abeille dans la ruche ($P_{EVV}1$)**

Dans le cadre d'une introduction volontaire d'abeilles, il s'agira de manière très probable d'une reine que l'apiculteur introduira dans une ruche locale.

$P_{EVV}1$ peut donc être estimée à « très élevée » (niveau de probabilité le plus élevé).

→ **Multiplication de l'agent pathogène ($P_{EVV}2$)**

Une fois l'abeille contaminée introduite, il faut que l'agent pathogène puisse se multiplier.

Dans le cas de Varroa, la femelle fondatrice doit aller dans une alvéole pour commencer à pondre et initier le cycle de reproduction. Cela se produira dans 74% des cas dans le couvain mâle et dans 69% dans le couvain femelle.

Très peu de données sont disponibles concernant *Tropilaelaps sp*. et devraient être similaires à celles de Varroa.

Concernant les spores de loque américaine, moins de 10 spores sont suffisants pour induire la maladie chez des larves âgées de 12 à 36 heures. Quand la larve sera morte et réduite à l'état d'écaille loqueuse, elle sera alors porteuse de millions de spores.

→ **Expression de la maladie clinique et détection ou non par l'apiculteur ($P_{EVV}3$ et $P_{EVV}4$)**

L'expression de la maladie clinique, que ce soit la varroose ou la loque américaine, sera toujours tardive, liée au temps nécessaire au développement suffisant de la population d'agents pathogènes et aura tendance à être très aiguë puisque les colonies n'ont jamais été en contact avec ces agents.

Dans le cas de la varroose, le parasite sera relativement facile à mettre en évidence au bout d'une année, temps suffisant pour que plus de 30% des abeilles soient infestées. Dans le cas d'une infestation rapide sur des cheptels complètement naïfs (comme à la Réunion), la maladie se déclarera de manière aiguë dans les colonies et peu de symptômes seront alors observables. L'apiculteur pourra constater une mort de sa colonie avec la présence de réserves (miel et pain d'abeille).

Concernant la loque américaine, le principe est exactement le même. Tout va commencer par une larve qui va se contaminer, mourir et se transformer en écaille loqueuse chargée de millions de spores. De proche en proche, grâce au travail des ouvrières, la maladie s'étendra au couvain voire même aux ruches d'à-côté.

Enfin, la loque américaine présente quelques similarités symptomatiques avec la loque européenne qui est très présente sur l'île. L'apiculteur pourra se tromper dans son éventuel diagnostic.

Globalement, la probabilité que la maladie clinique s'exprime et soit observable ($P_{EVV}3$) est plus élevée avec les acariens ectoparasites qu'avec *P*. *larvae*. Le temps nécessaire à l'apparition de la forme clinique est quand même souvent relativement long (au moins un an) et fait qu'une détection précoce de l'agent pathogène introduit est impossible ($P_{EVV}4$).

Séquence générale d'évènements nécessaires à l'exposition des abeilles de la Réunion à un agent pathogène transmis par introduction volontaire d'abeille vivante

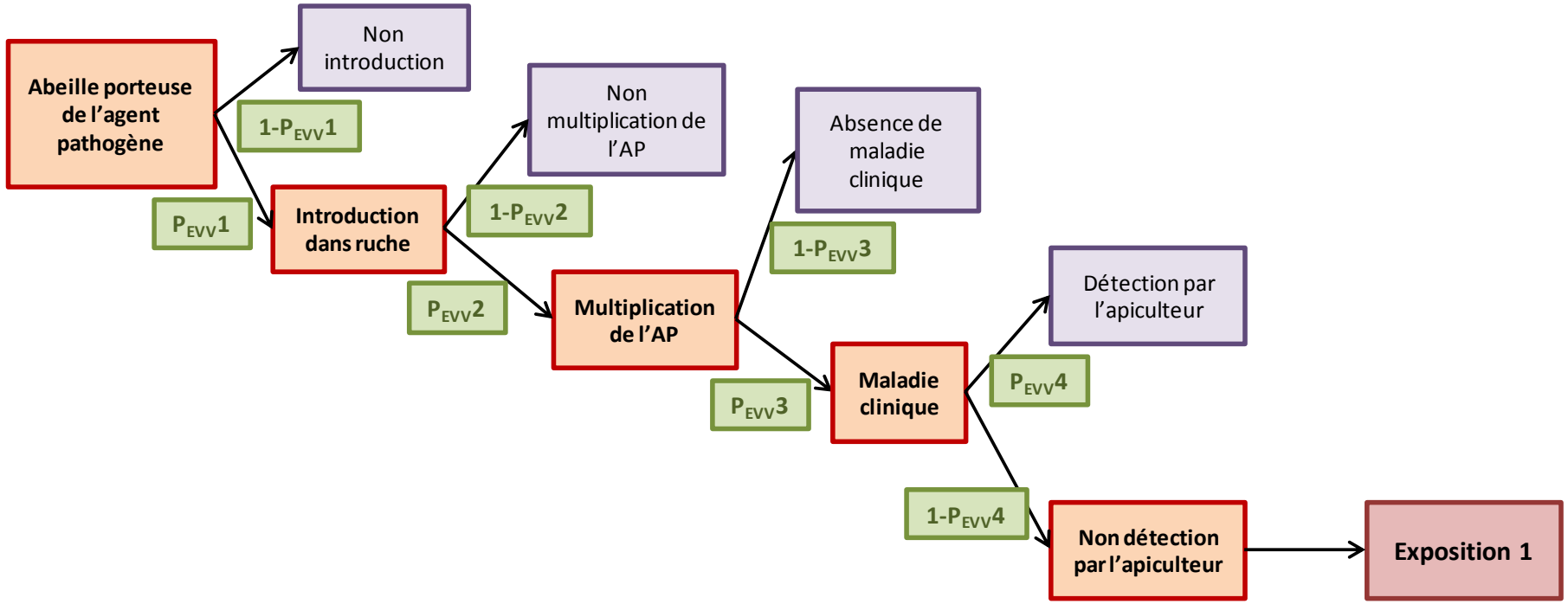


Figure 26 : Séquence générale d'évènements nécessaires à l'exposition des abeilles de la Réunion à un agent pathogène transmis par introduction volontaire d'abeille(s) vivante(s)

Probabilité	Niveau de risque associé à l'agent pathogène concerné		
	Paenibacillus larvae	*Tropilaelaps sp.*	*Varroa destructor*
$P_{EVV}1$	Très élevé	Très élevé	Très élevé
$P_{EVV}2$	Elevé	Elevé	Elevé
$P_{EVV}3$	Assez élevé	Elevé	Elevé
$1-P_{EVV}4$	Très élevé	Très élevé	Très élevé
Exposition 1	**Peu élevé**	**Assez élevé**	**Assez élevé**

Tableau 21 : Caractérisation des probabilités intermédiaires et des niveaux de risque d'exposition (Exposition 1)

4.4.2 Abeilles vivantes suite à une introduction involontaire

La séquence d'évènements nécessaires à l'introduction d'agents pathogènes par des abeilles vivantes suite à une introduction involontaire est présentée en figure 27.

Les modalités influençant l'exposition à des agents pathogènes suite à une introduction volontaire d'abeilles sont :

- → Contact avec les abeilles locales
- → Transmission et multiplication de l'agent pathogène
- → Rôle des colonies sauvages
- → Expression clinique et détection par l'apiculteur

→ **Contact avec les abeilles locales ($P_{EVI}1$)**

Une introduction involontaire (accidentelle) d'abeilles vivantes peut se réaliser sous la forme d'abeilles isolées ou d'essaims voyageant clandestinement via un moyen de transport (avion ou bateau).

Concernant un essaim, s'il a été mis en évidence sur un bateau ou sur un container, il y a de très grandes chances que celui-ci rejoigne un rucher d'apiculteur. En effet, à la Réunion, le SDIS ne capture ni ne détruit les essaims d'abeilles. Les pompiers ont une liste d'apiculteurs fournie par le SAR qu'ils contactent en cas de problèmes. L'apiculteur capturera l'essaim et l'enruchera chez lui.

Pour des abeilles isolées, le niveau de probabilité est beaucoup plus faible. Il faut que les abeilles sortent de leur moyen de transport et identifient des zones potentielles de butinage ou rentrent dans une ruche.

Globalement, cette probabilité a été estimée comme étant « assez élevée ».

→ **Transmission et multiplication de l'agent pathogène ($P_{EVI}2$)**

Varroa et Tropilaelaps ont les capacités de passer très rapidement d'une abeille à l'autre par simple contact entre deux abeilles sur une même fleur au butinage par exemple.

Les spores de loque américaine peuvent également se transmettre via le pollen ou tout autre matériau fréquenté ou utilisé par des abeilles. La transmission sera d'autant plus facile que la charge en spores de l'abeille est forte.

C'est pourquoi $P_{EVI}2$ est plus élevée chez Varroa et Tropilaelaps que chez *P. larvae*.

→ **<u>Rôle des colonies sauvages</u> ($P'_{EVI}3$, $P'_{EVI}4$ et $P'_{EVI}5$)**

A la Réunion, les colonies sauvages ne sont vraiment pas rares (M. Técher, communication personnelle). Il est donc probable qu'un cycle épidémiologique sauvage puisse se mettre en place.

→ **<u>Expression clinique et détection par l'apiculteur</u> ($P_{EVI}4$ et $P_{EVI}5$)**

Concernant la multiplication des agents pathogènes dans des colonies domestiques, ces probabilités sont identiques à celles développés dans le point « 4.4.1. Abeilles vivantes suite à une introduction volontaire » ($P_{EVV}3$ et $P_{EVV}4$).

	Niveau de risque associé à l'agent pathogène concerné		
Probabilité	***Paenibacillus larvae***	***Tropilaelaps sp.***	***Varroa destructor***
$P_{EVI}1$	Assez élevé	Assez élevé	Assez élevé
$P_{EVI}2$	Faible	Elevé	Elevé
$P_{EVI}3$	Faible	Très élevé	Très élevé
$P_{EVI}4$	Assez élevé	Elevé	Elevé
$P_{EVI}5$	Très élevé	Très élevé	Très élevé
$P'_{EVI}3$	Faible	Très élevé	Très élevé
$P'_{EVI}4$	Assez élevé	Elevé	Elevé
$P'_{EVI}5$	Très élevé	Très élevé	Très élevé
Exposition 2	**Très faible**	**Peu élevé**	**Peu élevé**
Exposition 3	**Très faible**	**Peu élevé**	**Peu élevé**

Tableau 22 : Caractérisation des probabilités intermédiaires et des niveaux de risque d'exposition (Expositions 2 et 3)

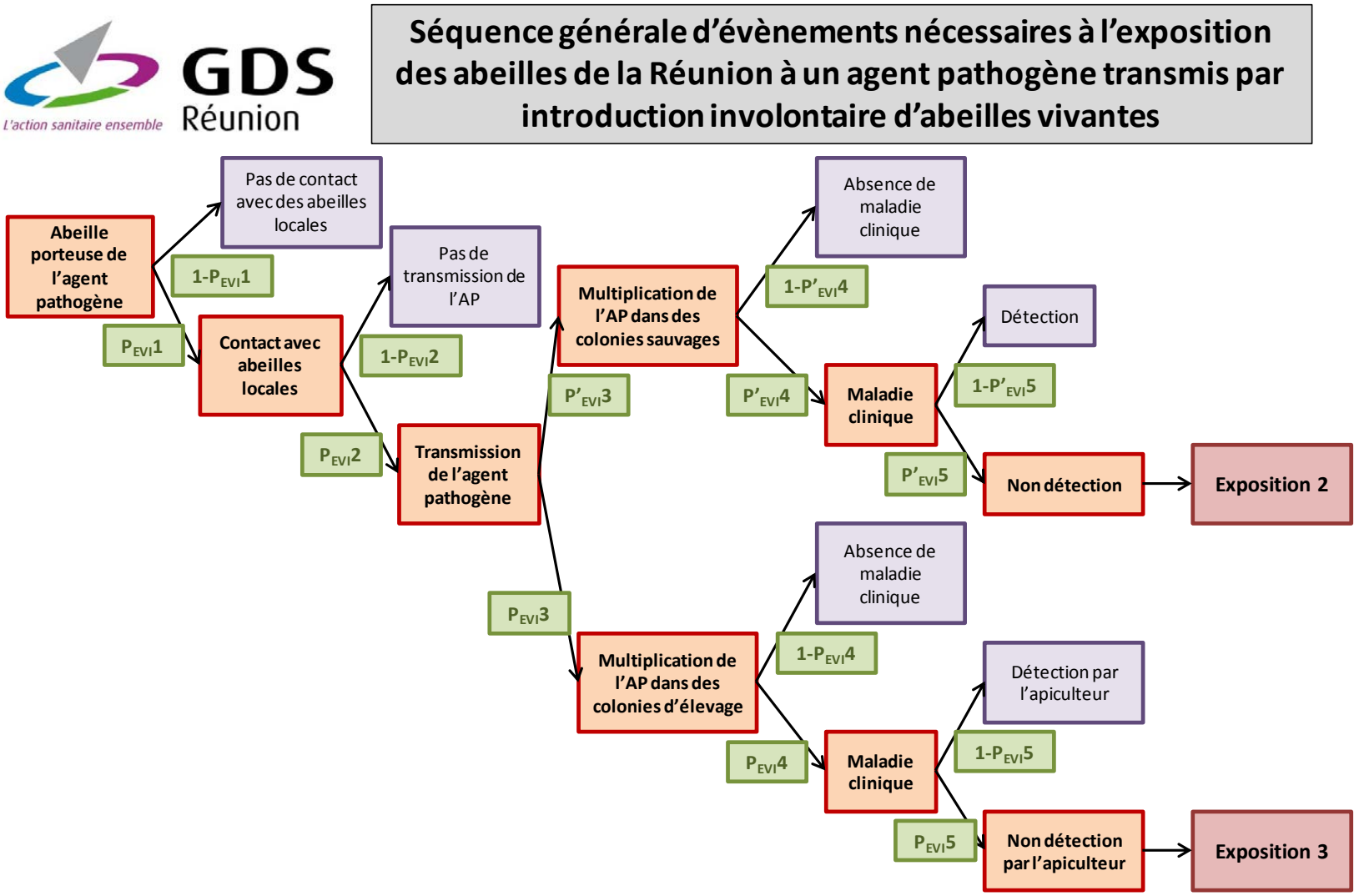


Figure 27 : Séquence générale d'évènements nécessaires à l'exposition des abeilles de la Réunion à un agent pathogène transmis par introduction involontaire d'abeilles vivantes

4.4.3 Matériel

Pour que l'exposition ait lieu via du matériel infecté, il faut que celui-ci soit mis en contact avec des abeilles de la Réunion sans désinfection préalable.

La séquence d'évènements est présentée en figure 28.

Parmi les trois agents pathogènes ciblés, deux n'ont pas de capacités significatives de survie sur du matériel apicole. Seuls les spores de loque américaine peuvent résister très longtemps dans le milieu extérieur et sont à même d'inoculer la maladie.

Probabilité	Niveau de risque associé à l'agent pathogène concerné		
	Paenibacillus larvae	***Tropilaelaps sp.***	***Varroa destructor***
$P_{EMV}1$	Très élevé	Très élevé	Très élevé
$P_{EMV}2$	Très élevé	Nul	Très faible
$P_{EMV}3$	Très élevé	Nul	Très faible
$P_{EMV}4$	Très élevé	Très élevé	Très élevé
Exposition 4	**Assez élevé**	**Nul**	**Très faible**

Tableau 23 : Caractérisation des probabilités intermédiaires et des niveaux de risque d'exposition (Exposition 4)

Séquence générale d'évènements nécessaires à l'exposition des abeilles de la Réunion à un agent pathogène transmis par introduction volontaire de matériel contaminé

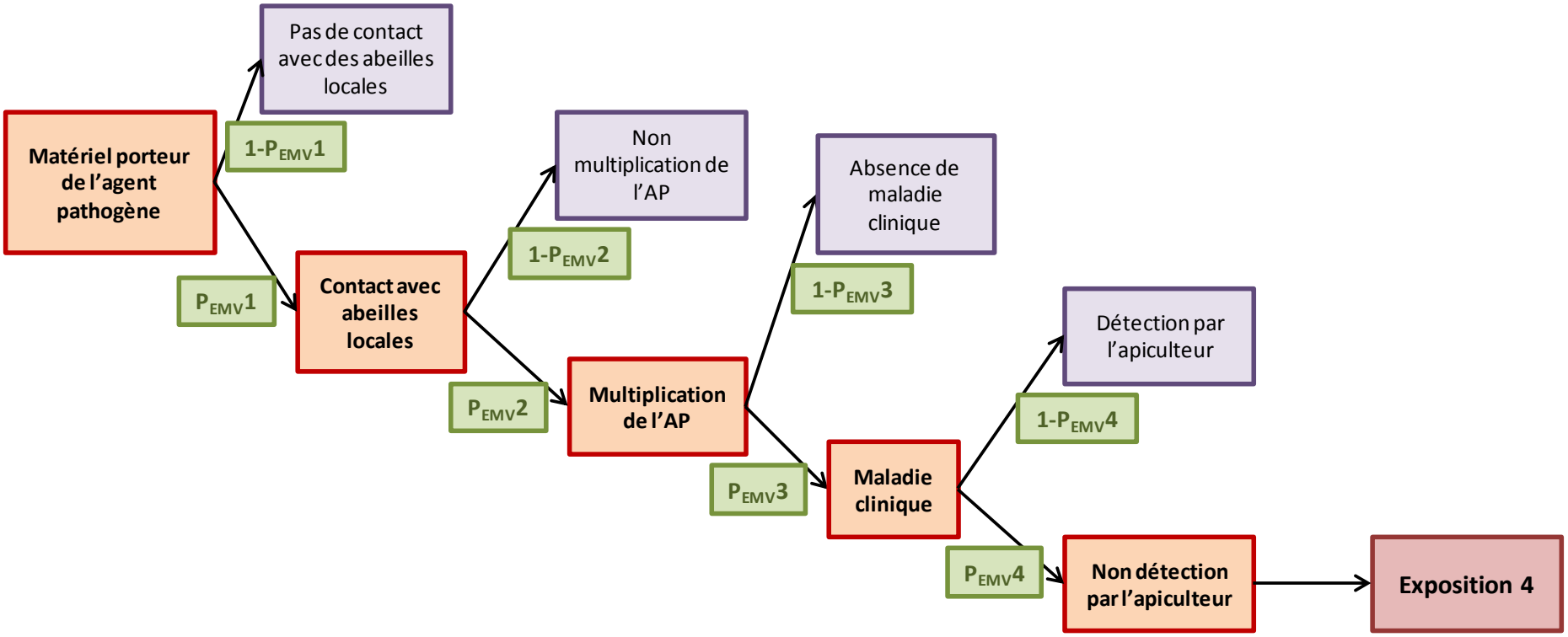


Figure 28 : Séquence générale d'évènements nécessaires à l'exposition des abeilles de la Réunion à un agent pathogène transmis par introduction volontaire de matériel contaminé

4.4.4 Produits de la ruche contaminés

La séquence d'évènements est présentée dans la figure 29.

L'exposition des abeilles locales à des produits de la ruche contaminés peut se faire de manière volontaire par l'apiculteur (il va par exemple nourrir ses abeilles avec du miel ou du pollen d'importation), ou bien, de manière accidentelle, avec des abeilles qui vont aller se nourrir dans un pot de miel importé laissé sur une table ou qui s'est cassé à l'extérieur.

Seul *P. larvae* a des capacités à pouvoir survivre dans le miel et les autres produits de la ruche qui peuvent être potentiellement utilisés en apiculture (miel et pollen).

Concernant la cire, il existe un débat sur la contamination ou non des abeilles via la cire contaminée par des spores de *P. larvae*. La loque américaine étant plutôt répandue en France métropolitaine, la cire gaufrée d'importation représente donc un risque de contenir des spores et de contaminer les abeilles réunionnaises.

Les deux principaux exportateurs vers la Réunion sont les entreprises ICKO (http://icko-apiculture.com/fr/) et THOMAS (http://www.thomas-apiculture.com/). Les deux entreprises ont été contactées afin de pouvoir caractériser leurs pratiques quant à la maîtrise du risque loque. L'entreprise ICKO a été la seule a avoir répondu et le directeur a certifié avoir une méthode brevetée et validée par les services vétérinaires qui neutralise les spores de loque américaine.

Probabilité	Niveau de risque associé à l'agent pathogène concerné		
	Paenibacillus larvae	***Tropilaelaps sp.***	***Varroa destructor***
$P_{EPV}1$	Extrêmement faible	Nul	Nul
$P_{EPV}2$	Elevé	Nul	Nul
$P_{EPV}3$	Elevé	Nul	Nul
$P_{EPV}4$	Très élevé	Nul	Nul
Exposition 5	**Minime**	**Nul**	**Nul**

Tableau 24 : Caractérisation des probabilités intermédiaires et des niveaux de risque d'exposition (Exposition 5)

Séquence générale d'évènements nécessaires à l'exposition des abeilles de la Réunion à un agent pathogène transmis par un ou des produits de la ruche contaminé

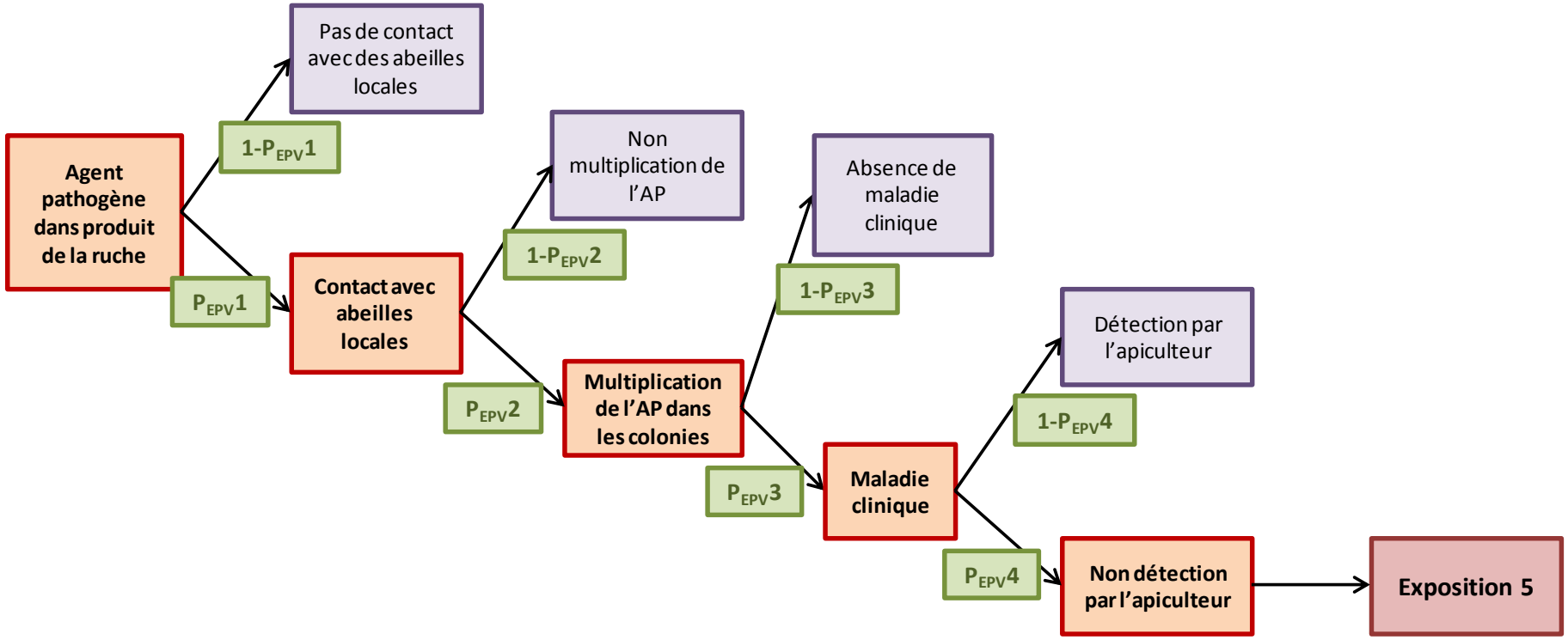


Figure 29 : Séquence générale d'évènements nécessaires à l'exposition des abeilles de la Réunion à un agent pathogène transmis par introduction de produits de la ruche contaminés

4.4.5 Cas particulier d'*Aethina tumida*

Le risque d'exposition des colonies d'abeilles réunionnaises à *Aethina tumida* est **très élevé**. En effet, le coléoptère adulte arrive à identifier certaines molécules odorantes de la colonie d'abeilles et arrive très facilement à trouver une ruche dans laquelle se reproduire.

La très grande densité de ruches à la Réunion contribue à augmenter ce risque de manière très significative.

4.4.6 Conclusions sur le risque d'exposition des abeilles réunionnaises aux agents pathogènes étudiés

Les risques d'expositions varient selon l'agent pathogène de nul à très élevé.

Le risque d'exposition les plus élevés concernent *Aethina tumida* une fois adulte et *Paenibacillus larvae* via le matériel apicole d'occasion.

Probabilité	Niveau de risque associé à l'agent pathogène concerné		
	Paenibacillus larvae	***Tropilaelaps sp.***	***Varroa destructor***
Exposition 1	**Peu élevé**	**Assez élevé**	**Assez élevé**
Exposition 2	**Très faible**	**Peu élevé**	**Peu élevé**
Exposition 3	**Très faible**	**Peu élevé**	**Peu élevé**
Exposition 4	**Assez élevé**	**Nul**	**Très faible**
Exposition 5	**Minime**	**Nul**	**Nul**

Tableau 25 : Synthèse des niveaux de risque associés à chaque exposition

4.5 Probabilité de survenue du danger

La probabilité de survenue du danger se calcule en multipliant le risque d'émission avec le risque d'exposition selon la matrice présentée dans le tableau 26.

✕			PROBABILITE D'EMISSION									
			N	QN	M	EF	TF	F	PE	AE	E	TE
			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
PROBABILITE D'EXPOSITION	N	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	QN	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	M	2	0	1	1	1	1	2	2	2	2	2
	EF	3	0	1	1	1	2	2	2	3	3	3
	TF	4	0	1	1	2	2	3	3	3	4	4
	F	5	0	1	2	2	3	3	4	4	5	5
	PE	6	0	1	2	2	3	4	5	5	6	6
	AE	7	0	1	2	3	3	4	5	6	7	7
	EF	8	0	1	2	3	4	5	6	7	8	8
	TE	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9

Tableau 26 : Règles de multiplication des probabilités qualitatives (source ANSES)

Les probabilités de survenue du danger sont synthétisées dans le tableau suivant :

Voie	Niveau de risque associé à l'agent pathogène concerné		
	Paenibacillus larvae	*Tropilaelaps sp.*	*Varroa destructor*
Introduction volontaire abeille vivante	Quasi-nul	Quasi-nul	Quasi-nul
Introduction involontaire d'abeilles vivantes	Quasi-nul	Quasi-nul	Minime
Matériel apicole d'occasion	Extrêmement faible	Nul	Nul
Produits de la ruche contaminés	Minime	Nul	Nul

Tableau 27 : Synthèse des probabilités de survenue du danger pour *P. larvae*, *Tropilaelaps sp*. et *V. destructor*

Concernant *A. tumida*, sa probabilité de survenue est estimée à « quasi-nul » × « très élevé » = « **quasi-nul** ».

4.6 Conséquences

D'un point de vue sanitaire, les conséquences seront très différentes selon les agents pathogènes mais aboutiront toutes à un affaiblissement des colonies et une baisse significative de la production de miel, voire à son arrêt.

4.6.1 Conséquences directes

D'après les études génétiques effectuées par le CIRAD en 2012 (Techer, 2012), la sous-espèce d'abeilles que l'on retrouve à La Réunion est *Apis mellifera unicolor* qui est très proche de la sous espèce malgache.

Suite à l'arrivée de varroa, une étude réalisée par la faculté des sciences d'Antananarivo, a permis d'évaluer les pertes à Madagascar entre 30% à 98% de colonies mortes dans un rucher infesté (Raveloson, R, Lala H., Professeur à l'université des sciences d'Antananarivo, communication personnelle, Juin 2012). Les conditions retrouvées à La Réunion étant très semblables à celles de Madagascar (même sous-espèce d'abeille et conditions climatiques identiques), il est possible que le même scénario se reproduise sur l'île. En ce qui concerne les essaims sauvages, tous les auteurs sont unanimes (Wendling, 2012), les pertes sont quasiment totales.

D'après Rosenkranz *et al.*, (2006), le taux critique d'infestation dans une ruche est de 30% des abeilles adultes infestées pendant l'été. A partir d'un seul acarien, il faudrait environ 1 an pour atteindre cette valeur (The Food and Environment Research Agency, 2010). Par ailleurs, lorsque le couvain est présent toute l'année, comme c'est le cas à La Réunion, la population de parasite est multipliée par 800 dans l'année (Martin, 1998a). Donc, à partir d'une infestation d'un parasite dans une ruche, les pertes commenceraient environ 1 an après son arrivée. Bien entendu, lors d'une infestation multiple, les symptômes apparaitront plus rapidement.

La vitesse de dispersion de *Varroa destructor* est un élément capital à intégrer dans la démarche. D'après une étude réalisée en Nouvelle Zélande par (Stevenson *et al.*, 2005), avec des colonies faisant des arrêts de couvain, la vitesse de dispersion de *Varroa destructor* est comprise entre 10 et 15km par an. Une autre publication propose 3km par an (De Jong D. *et al.*, 1982b). Les mouvements et les grandes concentrations de colonies aux mêmes endroits lors des miellées favorisent fortement

la dispersion du parasite. Par conséquent, à La Réunion, elle serait grandement facilitée en période de miellées. Les seuls endroits qui pourraient être protégés seraient les cirques (Mafate, Cilaos et Salazie) du fait de leur structure géomorphologique. En effet, ils sont entourés de rempart compris entre 1000 et 3000m d'altitude et les voies d'entrées sont restreintes et difficiles. Cilaos et Salazie, possèdent tout deux, une seule voie d'entrée et Mafate, n'est accessible qu'à pied, il est donc, encore plus protégé. Par ailleurs, la ressource florale est plus limitée car essentiellement constituée par les bois de couleurs (essences endémiques). Les transhumances sont, par conséquent, assez rares dans ces endroits.

A partir des données de vitesses de dispersion disponibles pour les autres pays, et la distance de vol d'une abeille de 3km maximum (Eckert, 1983), il est possible de faire une simulation de la dispersion du parasite à partir d'un point d'entrée. Un recensement des ruches autour du Port montre qu'il existe 11 ruchers à moins de 3km et 12 entre 3 et 5km (Figure 30). Une abeille infestée arrivant sur ces zones pourra donc transmettre rapidement et facilement le parasite aux abeilles de La Réunion. Ces estimations peuvent être également reprises pour les colonies situées autour des aéroports et dans le cadre de mise en place de plan de surveillance.

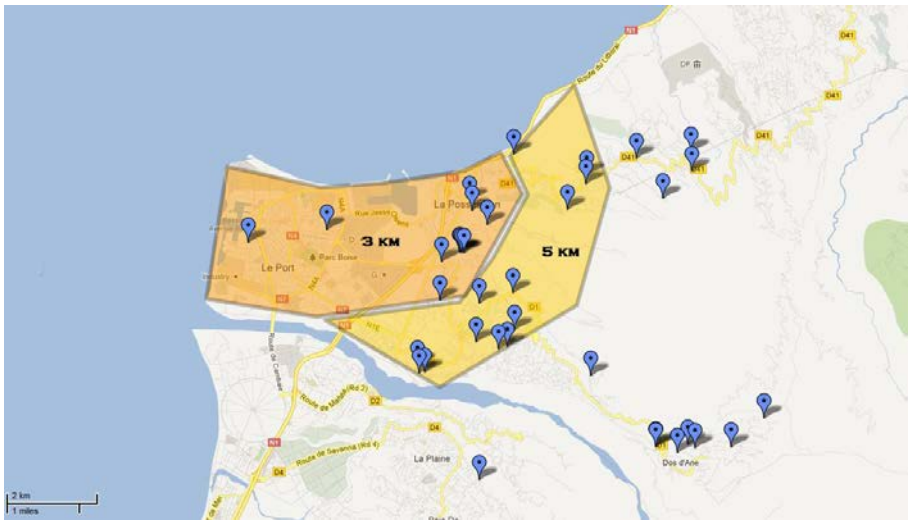


Figure 30 : Identification des zones à risque lors d'une introduction accidentelle d'une abeille infestée au niveau du Port. Les zones colorées sont celles qui seront infestées en premier si une introduction se produit à partir du Port

La Réunion possède une superficie de 2 512 km² (50×72 km). Il est donc possible d'estimer qu'en moins de 2 ans, le parasite serait présent dans toute l'île sans mesures de protections et qu'en moins de 3 ans, 50 à 100% des ruches domestiques de la Réunion pourraient disparaitre et 100% en ce qui concerne les colonies sauvages. Ces pertes impliqueraient également une diminution, voire un niveau de production de miel réduit à néant.

Tout ce raisonnement appliqué à *Varroa destructor* est également valable pour tous les autres dangers qui menacent l'apiculture réunionnaise.

Les scenarii avec *V. destructor* sont les plus faciles à imaginer puisqu'ils ont été très documentés notamment par les néo-zélandais et les hawaïens.

Le miel constitue la principale source de revenus des apiculteurs. L'apparition de varroa ou de tout autre danger sanitaire entrainerait une baisse considérable de leurs revenus. La plupart seraient certainement contraints de cesser leurs activités.

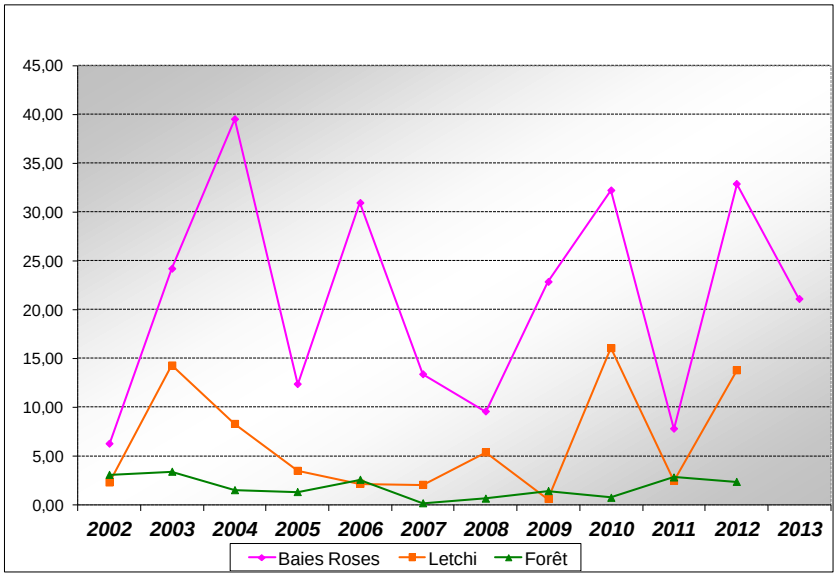


Figure 31 : Evolution de tonnages de production de miels de baies roses, letchi et forêt à la Coopémiel entre 2002 et 2012 (source Coopémiel)

La production moyenne de miel par ruche est d'environ 10kg. Ainsi, les apiculteurs de La Réunion produisent à peu près 120 tonnes de miel sur les 400 consommées annuellement. Cela représente un chiffre d'affaire qui peut être évalué à 1 400 000€.

Ces chiffres constituent une simple estimation avec un prix au kg qui est estimé entre 7 et 12 €/kg.

Les apiculteurs communiquent très peu sur leurs productions (même sous couvert d'anonymat) et il est extrêmement difficile de pouvoir obtenir des données fiables, particulièrement sur les revenus.

En 2013, sur les 232 apiculteurs déclarés, seuls 55 étaient détenteurs d'un NUMAGRIT. Ce numéro n'autorise pas la vente ni le don du miel en dehors du toit familial. Ce qui veut dire que plus de 177 apiculteurs officiellement déclarés tirent un revenu partiel ou total de l'apiculture. Jusque dans les années 2000, c'étaient plus de 500 apiculteurs (professionnels ou loisirs) qui étaient déclarés auprès de l'ex-DSV.

Cela montre à quel point l'apiculture est importante à la Réunion et que sa disparition aurait un impact social et économique très important pour ne pas dire catastrophique.

4.6.2 Conséquences indirectes

La pollinisation par les abeilles est indispensable essentiellement pour les productions de letchis, fraises, melon, haricot et cucurbitacées "lontan". Elle a aussi un impact dans certaines productions pour lesquelles elle aide à obtenir des fruits de meilleure qualité. C'est le cas pour les graines d'oignons, le café, les chouchous (christophine) et les mangues (Deslandes, O., communication personnelle, Juin 2012). Au vu des chiffres de productions qui se comptent en centaine de milliers de tonnes selon la culture, une diminution importante de la pollinisation entrainerait des baisses

colossales d'activités pour les maraîchers, qui déboucheraient sur des pertes financières sévères et un impact important sur l'emploi.

Le manque de données exploitables empêche d'évaluer convenablement les conséquences sur les filières dépendantes de la pollinisation.

Une image forte utilisée par les compagnons du miel pour sensibiliser sur l'importance des abeilles domestiques pour les filières associées illustre de manière certes simplifiée ce concept :

Figure 32 : Petit déjeuner avec abeilles à gauche, sans abeilles à droite (source http://www.lescompagnonsdumiel.fr/abeille-indispensable.htm)

De très nombreux travaux sont en cours, particulièrement à l'INRA d'Avignon sur ces thématiques pour essayer de chiffrer au mieux l'impact économique direct et indirect des abeilles aussi bien en agriculture que sur les écosystèmes sauvages.

En ce qui concerne l'impact sur l'environnement, la disparition des abeilles serait catastrophique pour l'environnement (Ellis, 2008) et particulièrement pour l'environnement et la biodiversité exceptionnelle de la Réunion.

4.7 Estimation des risques

L'estimation des risques consiste en le croisement de la probabilité de survenue du danger et les conséquences.

Comme nous venons de le voir, le niveau de risque associé aux conséquences peut être considéré comme « très élevé » (qualificatif le plus fort).

La synthèse des résultats est présentée dans le tableau suivant :

Danger sanitaire	Niveau de risque
Paenibacillus larvae	Elevé
Tropilaelaps sp.	Peu élevé
Varroa destructor	Assez élevé
Aethina tumida	Assez élevé

Tableau 28 : Synthèse des niveaux de risque associés aux agents pathogènes

Le niveau de risque le plus important concerne le bacille de la loque américaine. En effet, son extrême résistance dans le milieu extérieur en fait un excellent contaminant.

Sa présence quasi-certaine dans la quasi-totalité des miels d'importation participe au maintien de ce niveau de risque élevé. Le matériel apicole d'occasion qui peut être importé en toute bonne foi (un apiculteur qui emménage à la Réunion et qui souhaite emmener une partie de ses ruches avec lui) représente un risque très élevé.

Enfin et c'est spécifique à cette maladie, les vêtements de protection apicole peuvent être contaminés par des spores. Les apiculteurs réunionnais participent à de très nombreux voyages d'étude dans différents pays. Le statut sanitaire des pays n'étant pas toujours connu, il existe toujours un risque de contaminer son propre matériel et de le ramener dans son rucher. C'est le cas de pays comme Madagascar, où peu d'informations sanitaires nous parviennent. De nombreuses associations réunionnaises réalisent des voyages d'étude ou sont impliqués dans des projets de développement. Les échanges peuvent être sanitairement à risque, surtout si on ne connaît pas le statut sanitaire du pays.

Madagascar est également douteux quant au petit coléoptère des ruches. La quantité et la diversité de marchandise transitant entre la Grande Ile et la Réunion sont impressionnantes, que cela soit par du fret classique ou des transports de voyageurs. Les importations de fruits ou de plantes, bien qu'interdites sont quand même fréquentes (des voyageurs ramènent des sacs de fruits par exemple). Ce sont des produits qui sont très à risque de contenir des adultes *A. tumida*. Il n'est pas certain que les traitements insecticides réalisés dans les avions reliant les différentes îles entre elles soient suffisants pour tuer des adultes de petits coléoptères au fond d'une poche plastique.

Le principal risque concernant *V. destructor* est le comportement individuel des apiculteurs. Le pire scénario pour l'apiculture réunionnaise est une introduction de reines infestées par un apiculteur. Le pays qui représente le plus de risque reste la France métropolitaine. L'arrivée de varroa à Madagascar n'augmente pas le risque de manière significative. Le risque principal reste toujours une importation de reines infestées. Les pays ayant le plus de renommées en matière de génétique et de sélection sont les pays européens ou d'Amérique du Nord, zone où est très fortement présent l'acarien. A Madagascar, il n'y a pas de sélection particulière de reines et il serait fortement surprenant que des apiculteurs réunionnais importent des abeilles de là-bas à des vues d'amélioration de leur cheptel.

Le risque relatif à *Tropilaelaps sp*. est clairement sur-évalué. Pratiquement, il reste quasi-nul puisque seule une importation d'abeilles infestées en moins de 48 heures pourrait permettre son introduction. Sachant qu'à l'heure actuelle son aire de répartition est limitée au Sud-Est asiatique, le

risque d'introduction et d'émission reste vraiment très faible. Par contre, les conséquences sanitaires d'un tel fléau sont parfois pires qu'avec varroa (taux de mortalités plus élevés).

4.8 Communication

Tout au long de cette étude d'analyse de risque qui a commencé en avril 2012 pour *Varroa destructor*, des opérations de communication ont été menées. A l'issue de la première analyse de risque, une conférence de presse fut tenue afin de présenter les résultats vis-à-vis de varroa. S'en est suivie une émission de télévision (« par les hauts, par les bas ») diffusée en fin d'année 2012.

Début 2013, une conférence fut organisée à destination des apiculteurs et du grand public lors de la fête de « Miel Vert » organisé à la Plaine des Cafres en janvier. Lors de cette conférence, fut abordé le sujet de la santé de l'abeille et la préservation du statut sanitaire des abeilles réunionnaises.

Au cours de l'année 2013, le GDS a organisé 3 sessions de formations à destination des apiculteurs (professionnels et amateurs). Une trentaine d'apiculteurs ont été formés aux dangers sanitaires de première et deuxième catégorie et particulièrement sur les attitudes à risque à éviter.

Lors de l'assemblée générale du GDS en juin 2013, une plaquette d'information sur la loque américaine fut éditée et distribuée à tous les apiculteurs adhérents présents ce jour-là. Cette plaquette est diffusée largement auprès des apiculteurs lors des visites de terrain.

Enfin, le GDS a entrepris la collecte d'un grand nombre d'échantillons de miel afin de tester les concentrations en spores de *Paenibacillus larvae*. Le technicien, à chaque passage chez les apiculteurs, rappelle les bonnes pratiques sanitaires à avoir.

Les structures encadrantes de l'apiculture à la Réunion (ADA, SAR, Coopémiel) sont très demandeuses d'informations sur le statut sanitaire de l'île. Lors des réunions mensuelles de l'ADA, un point est fait avec le vétérinaire du GDS sur les avancées des études et les remontées de terrain.

5 Récapitulatif des résultats

5.1 Prévalences

Prévalences acariens :

		Varroa	*Tropilaelaps*	*Acarapis sp.*	*Acarapis woodi*
Colonie	Positifs	0	0	18	1
Colonie	Prévalence (%)	0,00%	0,00%	15,65%	0,87%
Colonie	Ecart-type (%)	0,00%	0,00%	6,64%	1,70%
Colonie	n=	114	114	114	114
Rucher	Positifs	0	0	16	1
Rucher	Prévalence (%)	0,00%	0,00%	26,23%	1,64%
Rucher	Ecart-type (%)	0,00%	0,00%	11,04%	3,19%
Rucher	n=	61	61	61	61

Prévalences virus sur abeilles d'intérieur :

	Virus	ABPV	BQCV	DWV	KBV	IAPV	SBV
Colonie	Positifs	18	103	0	0	0	0
Colonie	Prévalence (%)	15,65%	89,57%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Colonie	Ecart-type (%)	6,64%	5,59%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Colonie	n=	115	115	115	115	115	115
Rucher	Positifs	18	55	0	0	0	0
Rucher	Prévalence (%)	29,51%	90,16%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Rucher	Ecart-type (%)	11,45%	7,47%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Rucher	n=	61	61	61	61	61	61

Prévalences virus sur abeilles butineuses :

	Virus	ABPV	BQCV	CBPV	DWV	KBV	IAPV	SBV
Colonie	Positifs	2	102	57	1	0	9	6
Colonie	Prévalence (%)	1,79%	91,07%	50,89%	0,89%	0,00%	8,04%	5,36%
Colonie	Ecart-type (%)	2,45%	5,28%	9,26%	1,74%	0,00%	5,03%	4,17%
Colonie	n=	112	112	112	112	112	112	112
Rucher	Positifs	2	52	36	1	0	8	6
Rucher	Prévalence (%)	3,28%	85,25%	59,02%	1,64%	0,00%	13,11%	9,84%
Rucher	Ecart-type (%)	4,47%	8,90%	12,34%	3,19%	0,00%	8,47%	7,47%
Rucher	n=	61	61	61	61	61	61	61

Prévalences *Nosema sp*. sur abeilles butineuses :

	Agents pathogènes	*N. ceranae*	*N. apis*
Colonie	Positifs	112	1
Colonie	Prévalence (%)	100,00%	0,89%
Colonie	Ecart-type (%)	0,00%	1,74%
Colonie	n=	112	112
Rucher	Positifs	61	1
Rucher	Prévalence (%)	100,00%	1,64%
Rucher	Ecart-type (%)	0,00%	3,19%
Rucher	n=	61	61

Prévalence loque européenne :

	Agent pathogène	*M. plutonius*
Colonie	Positifs	21
Colonie	Prévalence (%)	23,08%
Colonie	Ecart-type (%)	8,66%
Colonie	n=	91
Rucher	Positifs	18
Rucher	Prévalence (%)	33,33%
Rucher	Ecart-type (%)	12,57%
Rucher	n=	54

5.2 Analyse de risque

Synthèse de l'analyse de risque pour chaque agent pathogène considéré :

Danger sanitaire	Niveau de risque
Paenibacillus larvae	Elevé
Tropilaelaps sp.	Peu élevé
Varroa destructor	Assez élevé
Aethina tumida	Assez élevé

6 Recommandations

[*Les recommandations s'inspirent pour partie du code sanitaire pour les animaux terrestres (OIE), chapitre 4.14. :* http://www.oie.int/fr/normes-internationales/code-terrestre/acces-en-ligne/?htmfile=chapitre_1.4.14.htm
Toutes les recommandations éditées au chapitre 4.14 du code terrestre pourraient être reprises dans cette partie.]

6.1 Identification des ruchers

Dans les années 2000, l'ex-DSV a enregistré plus de 500 apiculteurs sur l'île de la Réunion. Depuis 2010, cette mission d'enregistrement a été déléguée aux GDS au niveau national. Contrairement auparavant, la déclaration s'est accompagnée d'un coût nouveau pour les apiculteurs : l'adhésion au GDS et pour ceux qui ne le souhaitaient pas, une facturation de l'enregistrement.

Depuis 2010, le GDS enregistre entre 200 et 300 apiculteurs, professionnels ou amateurs. Le suivi des adhésions a mis en évidence le fait qu'un certain nombre d'apiculteurs se sont déclarés une fois et n'ont pas renouvelé leur déclaration. Celle-ci est pourtant obligatoire et doit être réalisée une fois par an.

L'identification des unités épidémiologiques est capitale pour la gestion des maladies animales. Plus personne en France n'imagine désormais un bovin sans ses boucles d'oreille d'identification. Il doit en être la même chose pour les ruchers et les colonies d'abeilles.

Cette notion d'identification est primordiale dans la gestion des risques liés au contexte sanitaire local.

L'identification des colonies prend tout son sens dans les grands plans d'assainissement mais également en cas de survenue d'un danger sanitaire grave pour la mise en œuvre de prophylaxies et faciliter les services de l'Etat.

De gros moyens, notamment en termes de communication doivent être déployés sur toute l'île pour toucher un maximum d'apiculteurs afin qu'ils se déclarent ou mettent à jour leur déclaration de ruchers.

Ces actions pourraient être menées de manière synchrone avec les partenaires du GDS au sein de la filière apicole.

6.2 Mise en place d'un réseau d'épidémio-surveillance local

Ce travail contribue à démontrer la fragilité de l'île de la Réunion vis-à-vis des introductions d'agents pathogènes extérieurs. La situation épidémiologique interne soulève également de nombreuses interrogations.

Le réseau d'épidémio-surveillance pourrait être structuré autour de deux pôles majeurs :

- → Surveillance des introductions d'agents pathogènes exotiques
- → Surveillance des mortalités et des épisodes cliniques sur l'île

Parmi les acteurs disponibles, les ASA (environ une dizaine) pourraient jouer un rôle central. Les ASA ont un mandat sanitaire et visitent un certain nombre de ruchers dans les secteurs qui leur ont été attribués.

Les autres acteurs disponibles sont un technicien de la chambre d'agriculture, un technicien du GDS et un vétérinaire spécialisé.

L'animation du réseau reviendrait par nature au GDS qui se chargerait de faire le relai auprès de la DAAF en cas de suspicion ou de mise en évidence de maladies réglementées. Le GDS serait la structure pivot qui pourrait également faire le lien entre les apiculteurs, les organismes de recherche associés comme le CIRAD ou l'ANSES ou encore les organismes techniques comme l'ADA.

Les modalités de l'organisation sont bien évidemment à discuter et rien ne pourrait être mis en place sans l'aval des partenaires, des institutions et des financeurs.

L'outil indispensable au bon fonctionnement du réseau est un laboratoire vétérinaire départemental totalement opérationnel et capable de diagnostiquer rapidement les maladies des abeilles.

→ **Surveillance des introductions d'agents pathogènes exotiques**

Cette partie pourrait exister sous la forme de ruchers sentinelles qui seraient déployés sur les sites identifiés comme étant à risque (port de la Pointe des Galets, aéroport Roland Garros et aéroport de Pierrefonds). Comme nous avons pu le voir dans la partie analyse de risque, le principal risque pour la Réunion est le comportement individuel des apiculteurs. Des ruchers sentinelles pourraient être placés dans chaque commune et faire l'objet d'un suivi particulier. Les agents pathogènes ciblés sur ces ruchers sentinelles seraient *Varroa destructor*, une souche différente de *Paenibacillus larvae* et le petit coléoptère des ruches.

→ **Surveillance des mortalités et des épisodes cliniques sur l'île**

En fonction du contexte épidémiologique du moment ou en fonction des remontées du terrain des ASA ou techniciens, un ciblage de certaines pathologies pourrait être réalisé dans le temps (épisodes de nosémose, loque européenne…) et proposer un accompagnement sanitaire et technique aux apiculteurs. L'organisation de formations pourrait également être un excellent moyen de toucher un certain nombre d'apiculteurs et de diffuser des messages spécifiques. Enfin, la mise à jour régulière d'un site internet dédié et la publication d'un bulletin périodique permettrait de faire vivre ce réseau et d'impliquer durablement les apiculteurs.

6.3 Développement de la coopération régionale via une plate-forme d'épidémio-surveillance dédiée au sud ouest de l'océan indien (SWIO)

Le statut sanitaire des îles voisines, particulièrement Madagascar, n'est pas parfaitement connu. Le déploiement d'un réseau à la Réunion pourrait être l'occasion de proposer aux pays partenaires de la zone (Maurice, Rodrigues, Seychelles, Madagascar, Comores, Mayotte, Afrique du Sud…) la mutualisation de données sanitaires.

Ce type de réseau de santé animale existe déjà. C'est le réseau AnimalRisk animé par le CRVOI (CYROI) et qui va fusionner dans les jours à venir avec le réseau SEGA de santé humaine.

La santé des abeilles n'est pour l'instant pas prise en compte dans ce réseau mais une intégration serait souhaitable pour une meilleure protection sanitaire des différents cheptels d'abeille du SWIO.

6.4 Renforcement des actions de recherche (épidémiologie)

Ce premier état des lieux nous a offert quelques réponses mais surtout beaucoup de questions à développer dans le futur.

L'épidémiosurveillance associe à la fois l'épidémiologie de terrain et les questions de recherche. L'un ne va pas sans l'autre.

Des efforts de recherche concernant l'épidémiologie des agents pathogènes de l'abeille domestique dans un contexte insulaire tropical, en l'absence de *Varroa destructor* et de CCD doivent être entrepris. Ce travail doit pouvoir bénéficier d'appuis financiers solides et pérennes pour que ces travaux de recherche soient menés dans la plus grande facilité.

L'objectif de tels travaux est de comprendre le plus finement possible le contexte épidémiologique local afin de pouvoir proposer des outils et des voies d'amélioration pour les apiculteurs.

6.5 Renforcement des opérations de communication visant à préserver l'état sanitaire du cheptel apiaire réunionnais

Un effort majeur doit être entrepris par la profession pour communiquer notamment aux aéroports sur les dangers et risques pour l'abeille locale. Des messages sonores aux aéroports ou bien des posters rappelant les produits et les conduites à risque pourraient être affichés dans les zones de transit.

L'objectif de telles actions est de sensibiliser au maximum les apiculteurs mais également le grand public aux spécificités de l'abeille réunionnaise et les menaces qui pèsent sur elle.

6.6 Mise en place d'un plan d'assainissement de certaines maladies ou agents pathogènes

Comme nous l'avons vu, certains agents pathogènes semblent présents en très faible nombre. C'est le cas particulier de *Paenibacillus larvae* et de *Nosema apis*.

Des plans d'assainissement ou d'éradication pourraient être mis en place pour éliminer ces agents pathogènes et permettre ainsi à la Réunion d'obtenir un statut indemne.

Ce type de plan existe dans d'autres filières animales (STC bovin par exemple).

La mise en route d'un tel plan nécessite évidemment l'adhésion de tous les secteurs de la profession mais également des pouvoirs publics.

MISE A JOUR DU BILAN SANITAIRE DE LA FILIERE APICOLE REUNIONNAISE ET EVALUATION DES RISQUES D'INTRODUCTION D'AGENTS PATHOGENES EXOTIQUES, mis à jour le 10 décembre 2013

Mercredi 28 janvier 2015

Deux éléments majeurs ont conduit à la mise à jour du document remis à la DAAF en octobre 2013 :

- La fin de nos travaux sur la diversité des virus à l'île de la Réunion qui nous permet de conclure de manière définitive sur les virus présents à la Réunion
- La mise en évidence de *Varroa destructor* à l'île Maurice en août 2014 qui augmente de manière significative le risque pour l'apiculture réunionnaise

Olivier ESNAULT, vétérinaire au GDS Réunion

MISE A JOUR - GDS Réunion

3 Bilan sanitaire de la filière apicole

3.2 Résultats

3.2.1 Le syndrome d'effondrement des colonies

Compte tenu du contexte scientifique actuel, il est plus approprié de parler de mortalités aiguës (Chauzat *et al.*, 2014) plutôt que de syndrome d'effondrement des colonies (CCD – Colony Collapse Disorder).

Dans les deux années suivant la réalisation de l'étude du bilan sanitaire de la filière apicole réunionnaise, aucun cas de mortalité aiguë ne fut détecté pour la période 2013-2014 (Aymé, 2014).

3.2.2 *Varroa destructor*, *Tropilaelaps sp.*, *Acarapis sp.* et *Aethina tumida*

La même étude (Aymé, 2014) n'a pas montré la présence de :

- *Varroa destructor*

- *Tropilaelaps sp.*
- *Aethina tumida*

A ce jour, l'île de la Réunion est donc indemne de ces 3 parasites.

3.2.3 Virus

Les travaux conjoints réalisés en partenariat entre le GDS Réunion, le CIRAD et l'ANSES ont conclu à la présence de seulement deux virus sur les sept recherchés.

Les séquençages de chaque produit PCR concernant les virus DWV, IAPV et ABPV ont montré que les précédents positifs étaient en réalité de faux positifs.

Seuls BQCV et CBPV sont présents dans le cheptel apiaire réunionnais.

Autant les sept virus recherchés dans cette étude (CBPV, ABPV, IAPV, KBV, SBV, DWV et BQCV) sont très fréquemment observés en Europe ou en Asie (Tentcheva *et al.*, 2004, Choe *et al.*, 2012, Granberg *et al.*, 2013), autant des tableaux atypiques de diversité virale ont été mis en évidence en Afrique (Strauss *et al.*, 2013, Muli *et al.*, 2014).

Ces données virologiques viennent encore illustrer la fragilité du cheptel local vis-à-vis d'agents pathogènes exotiques.

	BQCV – B (ANSES)	BQCV – I (GDS / CIRAD)	CBPV (ANSES)
Prévalence colonie (%)	91,07	89,57	50,89
Ecart-type (%)	5,28	5,66	9,26
Prévalence rucher (%)	86,67	90	56,67
Ecart-type (%)	8,6	7,59	12,54

MISE A

4 Analyse de risque de l'introduction des dangers sanitaires de première et deuxième catégorie pour les abeilles domestiques à l'île de la Réunion et ses conséquences pour les filières apicoles et associées

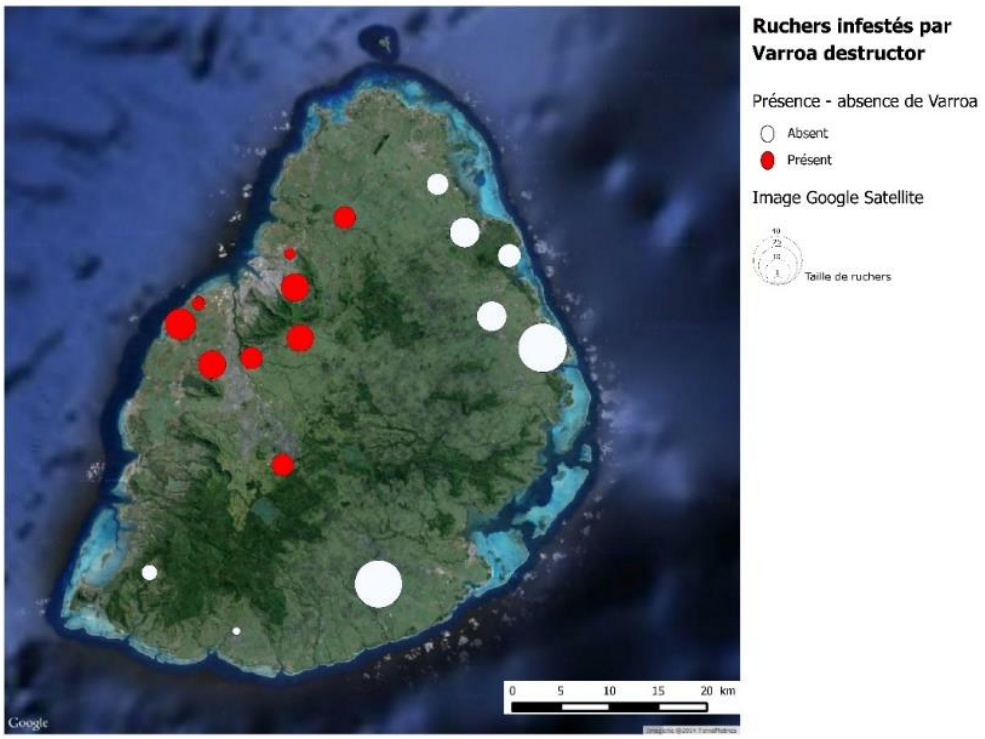
GDS Réunion

4.5 Probabilité de survenue du danger

L'introduction récente de *Varroa destructor* sur l'île voisine augmente significativement toutes les probabilités dans les différentes séquences de risque.

En septembre 2014, *V. destructor* était présent sur la partie centrale de l'île Maurice et notamment toute la zone de Port-Louis.

Compte tenu de la proximité géographique des deux îles (moins de 150 km de côte à côte), une introduction accidentelle d'abeilles parasitées est plus probable.



Carte : présentation des statuts sanitaires des ruchers visités vis-à-vis de *V. destructor* réalisés en septembre 2014

Voie	Niveau de risque associé à l'agent pathogène concerné		
	Paenibacillus larvae	*Tropilaelaps sp.*	*Varroa destructor*
Introduction volontaire d'abeille vivante	Quasi-nul	Quasi-nul	**Minime**
Introduction involontaire d'abeilles vivantes	Quasi-nul	Quasi-nul	**Faible**
Matériel apicole d'occasion	Extrêmement faible	Nul	Nul
Produits de la ruche contaminés	Minime	Nul	Nul

Tableau 1 : Synthèse des probabilités de survenue du danger pour *P. larvae*, *Tropilaelaps sp.* et *V. destructor*

MISE A JOUR - GDS R

4.7 Estimation des risques

L'estimation finale du niveau de risque vis-à-vis de l'introduction de Varroa destrutor à l'île de la Réunion est donc majorée, ce qui fait que désormais le niveau de risque de l'introduction du parasite est à un niveau élevé et que des mesures de prévention durables et efficaces doivent être prises.

Danger sanitaire	Niveau de risque
Paenibacillus larvae	Elevé
Tropilaelaps sp.	Peu élevé
Varroa destructor	**Elevé**
Aethina tumida	Assez élevé

Tableau 2 : Synthèse des niveaux de risque associés aux agents pathogènes

Références bibliographiques

AYMÉ, A. 2014. *Synthèse des connaissances sur l'apiculture réunionnaise et enjeux pour la filière.* DVM Veterinary, Paul Sabatier.

CHAUZAT, M.-P., LAURENT, M., RIVIÈRE, M.-P., SAUGEON, C., HENDRIKX, P., RIBIÈRE-CHABERT, M. & PATHOLOGY UNIT, H. 2014. A pan-European epidemiological study on honeybee colony losses 2012-2013. 30.

CHOE, S. E., NGUYEN, L. T., NOH, J. H., KOH, H. B., JEAN, Y. H., KWEON, C. H. & KANG, S. W. 2012. Prevalence and distribution of six bee viruses in Korean Apis cerana populations. *J Invertebr Pathol,* 109**,** 330-3.

GRANBERG, F., VICENTE-RUBIANO, M., RUBIO-GUERRI, C., KARLSSON, O. E., KUKIELKA, D., BELAK, S. & SANCHEZ-VIZCAINO, J. M. 2013. Metagenomic detection of viral pathogens in Spanish honeybees: co-infection by Aphid Lethal Paralysis, Israel Acute Paralysis and Lake Sinai Viruses. *PLoS One,* 8**,** e57459.

MULI, E., PATCH, H., FRAZIER, M., FRAZIER, J., TORTO, B., BAUMGARTEN, T., KILONZO, J., KIMANI, J. N., MUMOKI, F., MASIGA, D., TUMLINSON, J. & GROZINGER, C. 2014. Evaluation of the Distribution and Impacts of Parasites, Pathogens, and Pesticides on Honey Bee (Apis mellifera) Populations in East Africa. *PLoS One,* 9**,** e94459.

STRAUSS, U., HUMAN, H., GAUTHIER, L., CREWE, R. M., DIETEMANN, V. & PIRK, C. W. 2013. Seasonal prevalence of pathogens and parasites in the savannah honeybee (Apis mellifera scutellata). *J Invertebr Pathol,* 114**,** 45-52.

TENTCHEVA, D., GAUTHIER, L., ZAPPULLA, N., DAINAT, B., COUSSERANS, F., COLIN, M. E. & BERGOIN, M. 2004. Prevalence and seasonal variations of six bee viruses in Apis mellifera L. and Varroa destructor mite populations in France. *Appl Environ Microbiol,* 70**,** 7185-91.

MISE A JOUR - GDS Réunion

Annexe 4

Des abeilles et des hommes

De l'apicueillette à l'apiculture

Les plus anciennes traces de contact entre les hommes et les abeilles remontent au Néolithique où des traces de cires d'abeilles ont été mises en évidence dans des restes de poteries à travers l'Europe (Roffet-Salque *et al.*, 2015). Des gravures rupestres en Espagne ont montré au début du Néolithique (avant la sédentarisation de l'homme) des hommes entourés d'abeilles et pratiquant l'apicueillette en récoltant du miel dans une colonie sauvage (Dams and Dams, 1977).

Dans l'Egypte Antique (-2 500 ans avant JC), il n'y avait pas de ruches à proprement parler mais les égyptiens proposaient des abris dans des poteries aux abeilles (Crane, 1975, Crane, 2013). Par ailleurs, les abeilles étaient représentées sur un grand nombre de bâtiments et de monuments. A la même époque, dans la péninsule arabique, l'apiculture était déjà pratiquée (Alqarni *et al.*, 2011) et fut vantée jusque dans l'Antiquité. Blinos en 79 disait : « La richesse de l'Arabie Fertile (Arabia Felix) dépassait celle du monde entier, parce que son territoire possédait des jungles parfumées, des mines d'or, ses terres étaient irriguées et il était produit en quantité du miel et de la cire ». Les romains pratiquaient une apiculture rudimentaire (Crane, 1994) et qui s'étendit jusqu'au Moyen-Âge (Kritsky, 2017). A cette époque le miel était consommé en très grandes quantités (Allsop and Miller, 2007) et c'est à cette période que les premières hausses sont mentionnées par Pietro de Crescenzi dans son traité d'agronomie (*Ruralium commodorum opus*) rédigé entre 1304 et 1306. Mais c'est à partir du XVIIème siècle que l'apiculture va réellement se moderniser avec la démocratisation des hausses. Au XIXème siècle, preuve du dynamisme de la filière apicole, deux courants s'opposaient farouchement : les fixistes adeptes des ruches en paille et les mobilistes pionniers de l'apiculture moderne. C'est pendant cette période que fut également inventé l'extracteur, les cadres mobiles ou encore l'enfumoir à soufflet. De nombreux modèles de ruches virent le jour : Dadant, Dadant-Blatt, Layens, Voirnot, WBC etc. C'est en 1851 que le révérant Lorenzo Lorraine Langstroth (1810-1895) créa la première ruche Langstroth.

L'homme s'est toujours déplacé emmenant avec lui des abeilles : « Comme le chien, les abeilles ont toujours accompagné l'homme dans ses plus grandes migrations, et certains des nouveaux colons dans chaque partie du Nouveau Monde ont emmené avec eux des ruches et des abeilles » (Crane, 1975).

L'exploitation des colonies sauvages ou domestiquées fournissait à l'homme de la cire, du miel en quantités qui était souvent fermenté en hydromel et du couvain que certaines populations consommaient. Mais dans cette longue histoire qui lie l'homme à l'abeille, l'invention la plus improbable vient de Cléopâtre (-69 ; -30 avant J.C.) qui utilisait des boîtes remplies d'abeilles qu'elle

utilisait en tant que stimulateur sexuel externe, produisant un effet similaire à un vibromasseur (Miletski, 2009). Autrement dit le premier « sextoy » était né.

Figure 1: représentation picturale de scènes d'apicueillette en Espagne(datation estimée entre -8 000 et -2 000 avant J.C.) : a: La Araña; b:Dos Aguas; c : Los Trepadores (Dams and Dams, 1977)

La symbolique de l'abeille

Depuis la nuit des temps l'abeille fascine l'homme avec ses symboliques multiples. C'est un être merveilleux puisque ses ailes produisent un chant et elle sublime le parfum des fleurs en miel.

Innombrable, organisée laborieuse et disciplinée l'abeille serait une autre fourmi, qui, comme elle, est symbole des masses soumises à l'inexorabilité du destin. Au demeurant, la ruche est plus comparée à un joyeux atelier qu'à une sombre usine. D'ailleurs en passant par la porte basse, elle part de l'ombre vers la lumière effectuant ainsi un voyage symbolique. Elles sont le lien entre la terre et le ciel, entre le Nadir et le Zénith.

En ancienne Egypte, l'abeille était considérée comme née des larmes de Rê le dieu solaire tombées sur la terre. Platon quant à lui affirmait que les âmes des hommes sobres se réincarnaient en abeilles. C'est aussi un symbole christique qui par son miel symbolise la douceur et la miséricorde et qui par son dard exerce sa justice en tant que Christ-juge. Souvent présentée sur les tombeaux de différentes civilisations, c'est un symbole de résurrection puisqu'elle semble renaître après les trois mois d'hiver où elle semble disparaître[1].

Sur le plan social elle symbolise le maître de l'ordre et de la prospérité. Elle s'apparente aux héros civilisateurs qui établissent l'harmonie et la sagesse.

Ces symboles furent utilisés par Napoléon 1er.

Dans son désir de remonter aux sources carolingiennes et même mérovingiennes et de « sauter » ainsi par-dessus les Capétiens, Napoléon Ier cherche de nouveaux symboles en 1804. Le Conseil d'État entend Cambacérès et Lacuée proposer les abeilles, « une république qui a un chef », ayant un aiguillon mais produisant du miel, emblème de travail pour Ségur.

Symbole d'immortalité et de résurrection, les abeilles sont choisies afin de rattacher la nouvelle dynastie aux origines de la France. En effet, des abeilles d'or (en réalité des cigales) avaient été découvertes en 1653 à Tournai dans le tombeau de Childéric Ier, fondateur en 457 de la dynastie mérovingienne et père de Clovis. Elles sont considérées comme le plus ancien emblème des souverains de la France. Lors de son couronnement, en 1804, Napoléon Ier apparut avec un manteau brodé de 1500 abeilles d'or. L'insecte, devenu emblème de l'Empire avec l'aigle, remplaça la fleur de lys. L'abeille figure dans la symbolique d'État française de 1804 à 1814, durant les Cent-Jours et enfin sous Napoléon III (1852-1870)[2].

[1] Dictionnaire des symboles, mythes, rêves, coutumes, gestes, formes, figures, couleurs, nombres, Jean Chevalier et Alain Gheerbrant, Robert Laffont/Jupiter, 1982.

[2] Séverine Boullay, "L'archéologie mérovingienne à travers les siècles," in *L'Histoire à la BnF*, 06/03/2017, https://histoirebnf.hypotheses.org/185

Figure 2: à gauche, abeille (qui serait en réalité une cigale) issue du trésor de Childéric 1er ; à droite : portrait de Napoléon 1er dans sa robe de couronnement pourpre ornée de 1500 abeilles d'or par Robert Lefèvre (1755-1830). Sources respectives : Bibliothèque Nationale de France et Museum of Fine Arts de Boston

De nos jours, l'abeille reste au cœur de rites sociaux et spirituels majeurs. En Espagne par exemple, lors d'un enterrement, les enfants imitent le bourdonnement des abeilles. Cela symbolise les abeilles qui accompagnent l'âme du défunt dans sa dernière demeure céleste.

ALLSOP, K. A. & MILLER, J. B. 2007. Honey revisited: a reappraisal of honey in pre-industrial diets. *British Journal of Nutrition,* 75**,** 513-520.

ALQARNI, A. S., HANNAN, M. A., OWAYSS, A. A. & ENGEL, M. S. 2011. The indigenous honey bees of Saudi Arabia (Hymenoptera, Apidae, Apis mellifera jemenitica Ruttner): Their natural history and role in beekeeping. *ZooKeys***,** 83-98.

CRANE, E. 1975. *Honey: a comprehensive survey*.

CRANE, E. 1994. Beekeeping in the World of Ancient Rome. *Bee World,* 75**,** 118-134.

CRANE, E. E. 2013. *The world history of beekeeping and honey hunting*, Routledge.

DAMS, M. & DAMS, L. 1977. Spanish rock art depicting honey gathering during the Mesolithic. *Nature,* 268**,** 228.

KRITSKY, G. 2017. Beekeeping from Antiquity Through the Middle Ages. *Annual Review of Entomology,* 62**,** 249-264.

MILETSKI, H. 2009. A history of bestiality. *Bestiality and Zoophilia Sexual Relations with Animals.* Oxford: Berg

ROFFET-SALQUE, M., REGERT, M., EVERSHED, R. P., OUTRAM, A. K., CRAMP, L. J. E., DECAVALLAS, O., DUNNE, J., GERBAULT, P., MILETO, S., MIRABAUD, S., PÄÄKKÖNEN, M., SMYTH, J., ŠOBERL, L., WHELTON, H. L., ALDAY-RUIZ, A., ASPLUND, H., BARTKOWIAK, M., BAYER-NIEMEIER, E., BELHOUCHET, L., BERNARDINI, F., BUDJA, M., COONEY, G., CUBAS, M., DANAHER, E. M., DINIZ, M., DOMBORÓCZKI, L., FABBRI, C., GONZÁLEZ-URQUIJO, J. E., GUILAINE, J., HACHI, S., HARTWELL, B. N., HOFMANN, D., HOHLE, I., IBÁÑEZ, J. J., KARUL, N., KHERBOUCHE, F., KIELY, J., KOTSAKIS, K., LUETH, F., MALLORY, J. P., MANEN, C., MARCINIAK, A., MAURICE-CHABARD, B., MC GONIGLE, M. A., MULAZZANI, S., ÖZDOĞAN, M., PERIĆ, O. S., PERIĆ, S. R., PETRASCH, J., PÉTREQUIN, A.-M., PÉTREQUIN, P., POENSGEN, U., JOSHUA POLLARD, C., POPLIN, F., RADI, G., STADLER, P., STÄUBLE, H., TASIĆ, N., UREM-KOTSOU, D., VUKOVIĆ, J. B., WALSH, F., WHITTLE, A., WOLFRAM, S., ZAPATA-PEÑA, L. & ZOUGHLAMI, J. 2015. Widespread exploitation of the honeybee by early Neolithic farmers. *Nature,* 527**,** 226.

Annexe 5

????

Caractérisation de l'apiculture réunionnaise : chiffres-clés, pratiques et typologie

par Olivier ESNAULT[1], Jai SINELLE[2], Henri BEGUE[3], Sandrine LESQUIN[2], Bernard REYNAUD[2], Hélène DELATTE[2]

1 GDS Réunion, 1 rue du Père Hauck, 97418 LA PLAINE DES CAFRES
2 CIRAD UMR PVBMT, CIRAD 3P, 7, chemin de l'IRAT, Ligne Paradis 97410 SAINT-PIERRE
3 ADA Réunion, 17 rue Maximin Lucas, 97425 LES AVIRONS

Nous souhaitons remercier tous les apiculteurs ayant participé à l'enquête et également Bernard Xavier, technicien GDS, pour sa précieuse contribution aux enquêtes téléphoniques. De même, un grand merci pour l'aide à la construction du questionnaire de départ à Cécile Ferrus, Anne-Laure Douteau, Benjamin Basso et Julien Vallon de l'ITSAP. Cette étude a été financée par le projet RITA-CIOM (APITROP), le CIRAD, la Région Réunion et le GDS.

Introduction

L'île de la Réunion est une petite île d'origine volcanique située dans le sud-ouest de l'Océan indien, à environ 850 km à l'est des côtes malgaches et à 250 km au sud-ouest de l'île Maurice. L'île mesure une centaine de km dans son axe le plus long et environ 80 km de largeur. Malgré sa petite taille, l'île offre une grande diversité de reliefs, avec deux massifs volcaniques, dont un encore en activité (Piton de la Fournaise). Le point culminant de l'île est le Piton des Neiges (3 069 m d'altitude). L'île fait partie des cinq plus importants *hots-pots*[1] de biodiversité parmi les 25 recensés à l'échelle mondiale [1]. Au patrimoine mondial de l'UNESCO pour ses cirques et pitons, cet environnement exceptionnel est protégé par un parc national qui couvre 42 % de la surface de l'île.

Le climat est de type tropical avec deux saisons principales : une saison chaude et humide et une saison froide et sèche. Dans les Hauts de l'île la température peut descendre en juillet et août sous les 0 °C.

1 – Endroit à la surface de la planète qui a une activité volcanique régulière.

La filière apicole est en plein développement sur l'île. Ces dernières années, les apiculteurs professionnels et semi-professionnels ont atteint un niveau annuel de production d'environ 200 tonnes pour 274 apiculteurs déclarés [2]. Les trois miellées emblématiques de l'île sont la miellée de baies roses (mars-avril), la miellée de forêt (toute l'année selon les secteurs) et le letchi (août-septembre). Malgré tout, les besoins locaux ne sont pas couverts et en 2012, il y eut l'importation de plus de 248 tonnes de miel (chiffres douanes, 2013). Pour répondre à ces objectifs de production, la filière s'organise et se structure de plus en plus.

Pour cela, cinq organismes sont impliqués dans la filière :

• L'ADA Réunion : (Association pour le Développement de l'Apiculture - 70 adhérents en 2013) assure le développement de la filière auprès des apiculteurs professionnels et semi-professionnels. Elle a un technicien.

• Le GDS Réunion : le Groupement de Défense Sanitaire est impliqué au sein de la filière depuis 2011 à travers la mission d'identification des ruchers (274 adhérents en 2013). Un vétérinaire et un technicien assurent les missions d'épidémio-surveillance, de formation et de conseil auprès des apiculteurs.

• Le SAR : le Syndicat Apicole de la Réunion (environ 150 adhérents), outre ses fonctions principales, réalise de nombreuses actions de communication auprès des apiculteurs et du grand public.

• La COOPEMIEL : c'est la seule coopérative de l'île et elle est basée dans le sud de l'île à Saint-Joseph (47 adhérents en 2013).

• Le CIRAD : (Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement) intervient sur plusieurs problématiques de recherche en collaboration avec la filière et le GDS : la diversité génétique et l'écologie des abeilles, la diversité des pollens mellifères et l'épidémiologie des agents pathogènes de l'abeille.

L'apiculture tropicale est peu étudiée et celle de la Réunion n'y fait pas exception. À l'heure actuelle, les différents acteurs de la filière apicole manquent de données et de chiffres-clés.

Matériel et méthodes

Les niveaux de production des trois principales miellées ont été collectés auprès de la COOPEMIEL. La coopérative a pu fournir des données fiables et exploitables depuis 2001.

D'autres données plus spécifiques, relatives aux miellées de baies roses de 2011 et 2012, ont été recueillies auprès de certains adhérents de l'ADA. Les chiffres-clés identifiés sont les suivants : nombre de ruches, quantité de miel produite, le rendement (défini comme le ratio de la quantité de miel produite sur une miellée par le nombre de colonies mises sur cette même miellée), le rendement moyen (défini comme la moyenne de rendement de tous les apiculteurs) et la production moyenne par ruche (défi-

Rucher de ruches bourbon montées sur 2 corps.

nie comme la quantité de miel produite sur une miellée par le nombre de ruches total de l'apiculteur). Ces données ont ensuite été ventilées selon une sectorisation géographique (nord, est, ouest, sud, les quatre grandes régions de l'île).

Concernant les données relatives à la typologie, les critères définissant les classes d'apiculteurs ont été définis de la façon suivante :

- apiculteurs de loisirs : moins de 60 ruches ;
- apiculteurs semi-professionnels : plus de 60 ruches et ne vivant pas exclusivement de l'apiculture (doubles actifs, retraités…) ;
- apiculteurs professionnels : plus de 60 ruches vivant exclusivement de l'apiculture.

Les critères nationaux (apiculteurs producteurs familiaux 1 à 30 ruches, apiculteurs pluriactifs 31 à 150 ruches et professionnels avec plus de 151 ruches) n'ont pas été retenus [3], notamment sur la base des critères d'éligibilités aux régimes d'aides publiques qui sont différents entre la Réunion et la métropole (dès 60 colonies contre plus de 150 pour la métropole).

Pour l'obtention des données relatives à l'étude des différents itinéraires techniques, une première enquête téléphonique a été réalisée auprès de 200 apiculteurs. L'objectif de cette première enquête est de catégoriser les apiculteurs en deux sous-populations : les apiculteurs professionnels (vivant uniquement de l'apiculture) et ceux ne vi-

vant pas uniquement de l'apiculture (loisirs et semi-professionnels).

Le questionnaire comportait quatre grandes parties correspondant aux techniques de multiplication du cheptel, à la récolte (utilisation de matériel et techniques employées), les pratiques de nourrissement et la sélection.

Parmi les 200 apiculteurs, 62 ont été échantillonnés au sein de deux sous-populations. La première correspond à 40 apiculteurs qui ont été enquêtés avec un premier questionnaire de 175 questions. Ce groupe a ensuite été complété par un échantillon de 22 apiculteurs enquêtés par un questionnaire allégé de 38 questions. Ces 38 variables retenues correspondent aux variables exploitables issues du premier questionnaire (qui comptait 175 variables).

Le jeu de données utilisé sur les itinéraires techniques et les pratiques a fait l'objet d'une Analyse Factorielle Multiple (AFM) suivie d'une Classification Ascendante Hiérarchique (ACH). L'AFM a permis d'étudier les ressemblances entre apiculteurs et les liaisons entre les différentes variables. La CAH a permis de synthétiser encore plus l'information contenue dans le jeu de données, en déterminant des classes d'apiculteurs et de dégager ainsi une typologie. Les analyses ont été réalisées grâce au logiciel R avec le package FactoMineR [4].

Résultats

Récolte et analyse des chiffres clés

La production globale de la COOPEMIEL (fig. 1) est très variable selon les années. Les amplitudes sont très fortes avec un minimum recensé en 2002 de 11,6 tonnes de production et le maximum en 2004 avec 49,3 tonnes. Le nombre de colonies affectées à la production n'est connu que depuis 2004. De la même façon, on peut constater une certaine variabilité des effectifs avec un minimum de 2 030 ruches en production pour les années 2005 et 2006 et un maximum avec 3 158 colonies en 2012.

Fig. 1 : Évolution du nombre de ruche (n =) et de la production globale de miel (tonnes) de la COOPEMIEL.

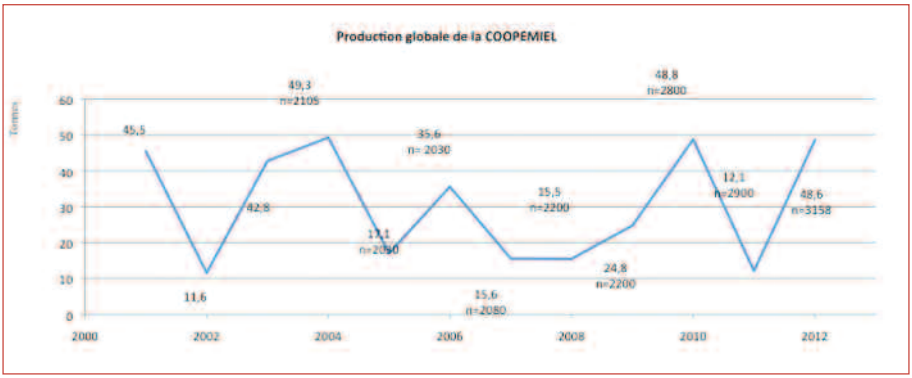
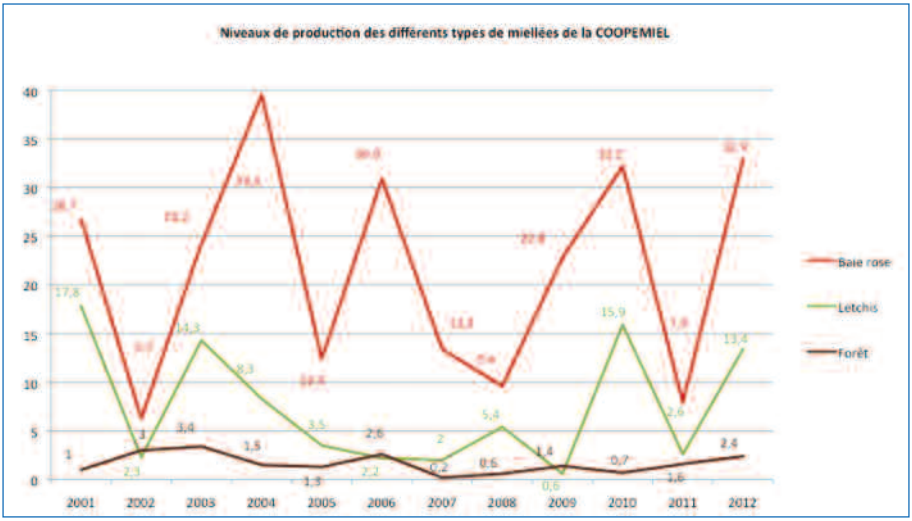


Fig. 2 : Évolution des trois miellées (tonnes) de la COOPEMIEL (34 adhérents en 2001, 45 adhérents en 2012).



L'essentiel de la production de la COOPEMIEL, comme de l'ensemble de la profession, est le miel de baies roses (*Schinus terebinthifolius*) (fig. 2). Les quantités produites sont extrêmement variables d'une année à l'autre. Sur ces trois dernières années, la production passe de 32,2 tonnes en 2010 à 7,9 tonnes (diminution d'un facteur 4,1) pour atteindre un niveau de production équivalent en 2012 (32,9 tonnes).

La seconde production est le miel de letchi. Les tonnages sont beaucoup moins importants que pour le miel de baie rose. Les niveaux de production semblent encore plus irréguliers que pour ce dernier avec des années particulièrement peu propices (2005 à 2009) où même le miel de forêt a réussi à dépasser le miel letchi en termes de production.

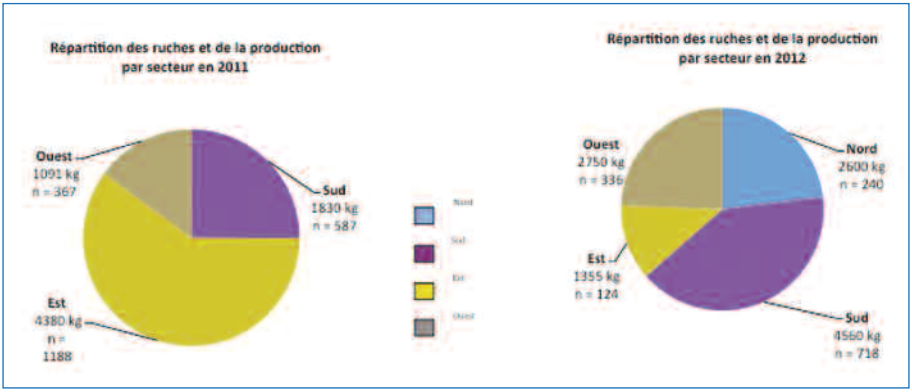
Néanmoins, la production de miel de forêt est anecdotique en regard des deux autres miellées et semble être en légère progression ces dernières années (passage de 0,7 tonne en 2010 à 2,4 tonnes en 2012).

Analyse des miellées 2011 et 2012 de baie rose par secteur géographique

La quantité globale de miel de baie rose produite a été très largement supérieure en 2012 qu'en 2011 (fig. 3). En effet, en 2012, ce sont plus de 11 tonnes de miel qui ont été produites contre 7 301 kg en 2011.

Les secteurs géographiques n'ont pas eu les mêmes rendements non plus. En 2012, le sud représentait 40,48 % de la production contre seulement 25,07 % en 2011. En 2011, l'est de l'île a fourni quasiment les trois-quarts de la production globale (73,01 %) et le nord n'a pas connu de production.

Fig. 3 : Nombre de ruches (n) et production de miel de baie rose (kg) suivant les secteurs en 2011 (25 apiculteurs) et 2012 (15 apiculteurs) des adhérents de l'ADA.



Les rendements constatés par ruche étaient sensiblement équivalents selon les secteurs géographiques en 2011. L'est avait les rendements les plus forts avec 3,7 kg/ruche et l'ouest le plus bas avec 3 kg/ruche.

En 2012, les rendements ont été très largement augmentés. L'est a obtenu les rendements les plus forts avec 10,9 kg/ruches, suivis par le nord (10,8) et l'ouest (8,2). Le sud, bien qu'étant le secteur ayant produit le plus de miel, a les rendements mesurés les plus faibles avec seulement 6,4 kg par colonie.

Étude des itinéraires techniques et typologiques des apiculteurs réunionnais

La pré-enquête téléphonique auprès de 200 apiculteurs a permis de faire un premier état des lieux des pratiques apicoles sur l'île (tab. 1). Sur ces 200 apiculteurs enquêtés, on a pu recenser 18 professionnels vivant exclusivement de l'apiculture. L'autre catégorie regroupe les apiculteurs de loisirs (ne dégageant souvent pas ou très peu de revenus) et les semi-professionnels (dégageant un revenu de l'apiculture mais ayant une autre source de revenus).

Pour les apiculteurs ne vivant que de l'apiculture, 55,5 % récoltent d'autres produits de la ruche contre 18 % chez les apiculteurs ne vivant pas ou pas uniquement de l'apiculture. De même les professionnels pratiquent quasiment tous la transhumance (89 %).

Étude des itinéraires techniques et typologie des apiculteurs réunionnais

La pré-enquête téléphonique auprès de 200 apiculteurs a permis de faire un premier état des lieux des pratiques apicoles sur l'île. Sur ces 200 apiculteurs enquêtés, on a pu recenser 18 professionnels vivant exclusivement de l'apiculture. L'autre catégorie regroupe les apiculteurs de loisirs (ne dégageant sou-

Tab. 1 : Pratiques et type de productions des apiculteurs.

	Apiculteurs transhumants	Apiculteurs éléveurs	Uniquement miel	Miel + pollen[1]	Miel + propolis[1]	Miel + cire[1]	Miel + gelée royale[1]	Miel + pollinisation[1]
Apiculteurs ne vivant que de l'apiculture (n = 18)	16	13	8	4	1	3	0	4
Apiculteurs ne vivant pas ou pas uniquement de l'apiculture (n = 182)	53	21	150	21	16	11	3	10
Total (n = 200)	**69**	**34**	**158**	**25**	**17**	**14**	**3**	**14**

1 : un apiculteur peut être comptabilisé dans plusieurs colonnes.

Tab. 2 : Caractéristiques des exploitations enquêtées.

		Nombre d'apiculteurs[3]
Productions[1]	Miel	62
	Pollen	14
	Propolis	8
	Cire	9
	Gelée royale	2
Type de ruches[2]	Bourbon sur 1 corps	41
	Bourbon sur 2 corps	16
	Langstroth	11
	Dadant	3
	Autre	3
Emplacements	1 emplacement	12
	2 à 10 emplacements	19
	11 à 20 emplacements	6
	plus de 21 emplacements	3
Nombre de colonies	1 à 10 ruches	10
	11 à 59 ruches	11
	60 à 150 ruches	26
	plus de 150 ruches	15
Transhumance	Pratiquent la transhumance	35

1 : un apiculteur peut avoir plusieurs types de production
2 : un apiculteur peut avoir plusieurs types de ruches
3 : n=62

Tab. 3 : Techniques de multiplication du cheptel.

			Nombre d'apiculteurs[1]
Les différentes techniques de multiplication du cheptel		Achat de reine ou d'essaims ? Essaimage naturel uniquement Essaimage artificiel uniquement Essaimage artificiel et naturel	7 6 18 13
Essaimage naturel	Périodes	Février Mars Avril Septembre Octobre Novembre	41 16 11 3 3
Essaimage artificiel	Périodes	Janvier Février Mars Avril Septembre Octobre Novembre Décembre	16 16 16 14 18 31 31 29
	Pratiques	Division de la ruche Prélèvement de cadres dans plusieurs ruches différentes Superposition de deux corps avec du couvain puis séparation des deux corps pour créer deux essaims Autre technique	25 13 2 1

1 : n = 40 apiculteurs

vent pas ou très peu de revenus) et les semi-professionnels (dégageant un revenu de l'apiculture mais ayant une autre source de revenus).

Pour les apiculteurs ne vivant que de l'apiculture, 55,5 % récoltent d'autres produits de la ruche contre 18 % chez les apiculteurs ne vivant pas ou pas uniquement de l'apiculture. De même les professionnels pratiquent quasiment tous la transhumance (89 %) (Tab. 1).

À l'issue de cette pré-enquête, 62 apiculteurs ont été enquêtés. Parmi ces apiculteurs, on retrouve 18 apiculteurs de loisir (29,03 %), 30 semi-professionnels (48,39 %) et 14 professionnels (22,58 %).

La moyenne d'âge de l'échantillon est de 50,5 ans.

La totalité des apiculteurs réunionnais oriente leur production sur le miel. La production de pollen frais est la

deuxième activité. La production de gelée royale est pour l'instant vraiment anecdotique (3,23 %). 14,51 % des apiculteurs produisent eux-mêmes leur cire et parfois peuvent la vendre à d'autres apiculteurs (Tab. 2).

La ruche bourbon traditionnelle est la ruche majoritaire sur l'île (74,19 %). C'est une petite ruche contenant 10 cadres. Ce type de ruche n'est pas complètement standardisé, les mesures variant d'un apiculteur à l'autre. Elle mesure environ 51 cm de long pour 42 cm de large et 20 cm de hauteur. Sa faible hauteur ne permet pas de stocker de grandes quantités de réserves et 39,02 % des apiculteurs utilisant des ruches bourbon les utilisent sur deux corps.

Plus de la moitié des apiculteurs pratiquent la transhumance à la Réunion (56,45 %). Les professionnels sont quasiment tous transhumants (88,88 %).

Les techniques de multiplication du cheptel sont assez variables et dépendent beaucoup du niveau de technicité des apiculteurs (Tab. 3).

Tab. 4 : Techniques de renouvellement des reines.

		Nombre d'apiculteurs[1]
Renouvellement artificiel		22
Causes de renouvellement	Reine défaillante	15
	Systématiquement	4
	Les deux	3
Fréquence	Tous les ans	2
	Tous les 2 ans	6
	Tous les 3 ans	2
	Aléatoire	13
Technique	Introduction de reines	13
	Introduction de couvain avec des cellules royales naturelles déjà bâties	5
	Introduction de cadres de couvain avec juste des larves de moins de 3 jours	3
	Autres	3
État d'introduction	Cellules artificielles	9
	Reines vierges	4
	Reines fécondées	3
	Cellules naturelles	1
Origine des reines	De l'élevage	10
	D'un autre élevage	2
	Les deux	1
Marquage des reines		9

1 : n = 40 apiculteurs

Tab. 5 : Techniques d'élevage des reines.

		Nombre d'apiculteurs[1]
Élevage		15
Commercialisation		1
Périodes	Octobre	8
	Novembre	9
	Décembre	10
	Janvier	8
	Février	6
Utilisation de cadres à mâles		3
Greffage		14
Technique du starter		4
Type d'éleveuse	Deux corps superposés	9
	Un corps de ruche	5
	Autre	3

1 : n = 40 apiculteurs

Certains apiculteurs vont se contenter d'acheter des essaims (17,50 %) alors que la quasi-totalité des apiculteurs va pratiquer la division pour multiplier son cheptel (95 %). La technique de division la plus utilisée est la division simple de la colonie en 2 ou 3 autres colonies (65,79 %). Les meilleurs mois au cours desquels les apiculteurs réalisent les essaimages artificiels sont les mois d'octobre et novembre (77,50 %) alors que l'essaimage naturel se fait plutôt en mars-avril. Les essaimages artificiels sont réalisés quasiment toute l'année à l'exception des mois froids (mai à août).

Plus de la moitié (55 %) des apiculteurs enquêtés renouvelle de manière artificielle leur reine quand ils estiment qu'elle est défaillante (mauvaise ponte, mauvaises rentrées de nectar ou pollen). Seuls 10 % d'apiculteurs réforment d'office leurs reines, peu importe l'état de la ponte ou de la colonie (tab. 4).

Parmi les apiculteurs qui renouvellent de manière active leurs reines, la majorité (59,09 %) introduit des reines plutôt que des cadres de couvain avec des larves de moins de 3 jours. La plupart élèvent eux-mêmes leurs reines.

Globalement, il existe très peu de producteurs de reines sur l'île (2 apiculteurs connus), et parmi ceux-ci, seul un apiculteur commercialise ses reines (parmi ceux enquêtés) (tab. 5).

Il est à noter que l'usage de cadres à mâles n'est pas très répandu (7,50 %). Les meilleures périodes pour réaliser l'élevage de reines (37,50 % des apiculteurs) sont les mois d'octobre, novembre et décembre.

L'accessoire le plus utilisé pour la récolte du miel est la balayette (69,35 %) largement devant le chasse-abeilles (20,97 %) (tab. 6). 40,32 % des apiculteurs n'utilisent aucun matériel spéci-

Tab. 6 : Techniques de récolte de miel.

		Nombre d'apiculteurs[1]
Matériel de récolte	Balayette	43
	Rien (secouant les cadres)	25
	Chasse-abeilles	13
	Souffleur	3
	Autre	3
Rendement annuel par ruche	1-5 kg	5
	6-10 kg	11
	11-15 kg	15
	16-20 kg	8
	21-25 kg	5
	26-30 kg	3
	31 kg ou plus	4
	nsp	11

1 : n = 62 apiculteurs

fique (hors enfumoir) pour récolter les cadres de miel.

Les niveaux de production en miel sont très variables d'un apiculteur à l'autre puisque les niveaux varient de moins de 1 à 5 kg à plus de 31 kg par ruche. Ces données ont été les plus difficiles à obtenir car les apiculteurs ne notent pas tous les niveaux de production de leurs ruches et n'en donnent qu'une estimation.

Le nourrissement constaté lors de carences en ressources est pratiqué par une très grande majorité d'apiculteurs réu-

Tab. 7 : Pratiques de nourrissement.

		Nombre d'apiculteurs[1]
Carences en pollen	Constatées	17
Type de nourrissement	Stimulation/spéculation	5
	Carences	17
	Stimulation et carences	10
	Pas de nourrissement	8
Quantité de nourrissement lors des carences	1-10 l/ruche/an	17
	> 11 l/ruche/an	10
Quantité de nourrissement de spéculation	1-10 l/ruche/an	11
	> 11 l/ruche/an	5
Type de nourrisseurs utilisés	Nourrisseur couvre-cadres	17
	Nourrisseur d'entrée	13
	Nourrisseur cadres	2
	Autres	7

1 : n = 40 apiculteurs

Tab. 8 : Variables significatives de la typologie.

Classe[1]	Nombre d'apiculteurs	Ensemble de variables	Variable significative	Cla/Mod[2]	Mod/Cla[3]	Global[4]
1	19	Description de l'apiculteur	Apiculteurs de loisirs	78	77	29
		Description exploitation	Pas de transhumance	56	79	44
			Nb d'emplacement = 1	67	53	24
			Nb de colonies = 1-10	70	37	17
		Élevage / sélection des reines	Absence de sélection des reines	87	68	24
			Pas d'observation des colonies	89	42	15
			Pas de suivi des souches de reines	49	89	56
		Multiplication du cheptel	Pas de réunions de colonies faibles	59	84	44
			Pas d'essaimage artificiel	89	42	15
			Pas de remérage des colonies	56	79	44
			Pas de greffage	45	95	65
			Pas d'élevage de reines	45	95	65
			Essaimage naturel	50	53	32
		Pratiques de nourrissement	Pas de nourrissement de stimulation	64	95	45
			Pas de nourrissement lors de carences	65	58	27
		Récolte de miel	Production de miel (estimée) = 6-10 kg	64	37	18
			Pas d'utilisation du chasse-abeilles	37	95	79
2	4	Description de l'apiculteur	Apiculteurs professionnels	21	75	23
		Description exploitation	Nombre de colonies = 151 et +	27	100	24
			Langstroth	25	75	19
			Nombre d'emplacements + 11-20	33	50	10
		Élevage / sélection des reines	Observations chiffrées des colonies	40	100	16
			Suivi des souches	15	100	44
		Multiplication du cheptel	Greffage	18	100	35
			Élevage de reines	18	100	35
			Utilisation de cadres à mâles	50	50	6
		Pratiques de nourrissement	Pas de nourrissement de stimulation	14	100	45
		Récolte de miel	Production de miel = 21-25 kg	80	100	8
			Utilisation du chasse-abeilles	23	75	21

Classe[1]	Nombre d'apiculteurs	Ensemble de variables	Variable significative	Cla/Mod[2]	Mod/Cla[3]	Global[4]
3	39	Description de l'apiculteur	Apiculteurs semi-professionnels	87	67	48
		Description exploitation	Transhumance	80	72	56
			Nombre de colonies = 60-150 ruches	85	56	42
			Nombre d'emplacements = 02-10	78	74	60
		Élevage / sélection des reines	Sélection des souches	79	95	76
			Observations d'ensemble des colonies	77	85	69
			Suivi des souches	78	54	44
		Multiplication du cheptel	Réunion des colonies faibles	86	77	57
			Essaimage artificiel	72	97	85
			Remérage	78	69	56
		Pratiques de nourrissement	Nourrissement de stimulation	97	85	55
			Nourrissement de carences	74	85	73

1 : Les couleurs de la classe correspondent aux projections sur le plan factoriel de la figure 4.

2 : Pourcentage d'apiculteurs présents dans la classe concernée respectant la variable x par rapport au total des apiculteurs de l'échantillon respectant la variable x.

3 : Proportion d'apiculteurs dans la classe concernée respectant la variable x.

4 : Proportion d'apiculteurs de l'échantillon total respectant la variable x.

nionnais (72,58 %). Le nourrissement spéculatif est également répandu et est pratiqué par 54,84 % des apiculteurs.

Les quantités de nourrissement apportées aux colonies sont très variables selon les apiculteurs (tab. 7).

Enfin, le matériel principal utilisé pour le nourrissement est le nourrisseur couvre-cadres utilisé par 42,50 % des apiculteurs et le nourrisseur d'entrée (32,50 %).

Une Analyse Factorielle Multiple a été réalisée sur les groupes de données. L'AFM est utilisée lorsqu'un tableau de données est structuré en groupes et est donc patriculièrement utile pour les questionnaires. Six groupes ont été définis à savoir :

- apiculteurs (exemples de variables utilisées : âge, statut...),
- exploitation (ex. : production de miel, type de ruches...),
- techniques de multiplication du cheptel (ex. : essaimage, élevage ou achat de reines...),
- pratiques de récolte du miel (ex. : utilisation de la grille à reine ou du chasse-abeilles...),
- pratiques de nourrissement (ex. : nourrissement de carence, type de nourrissement...),

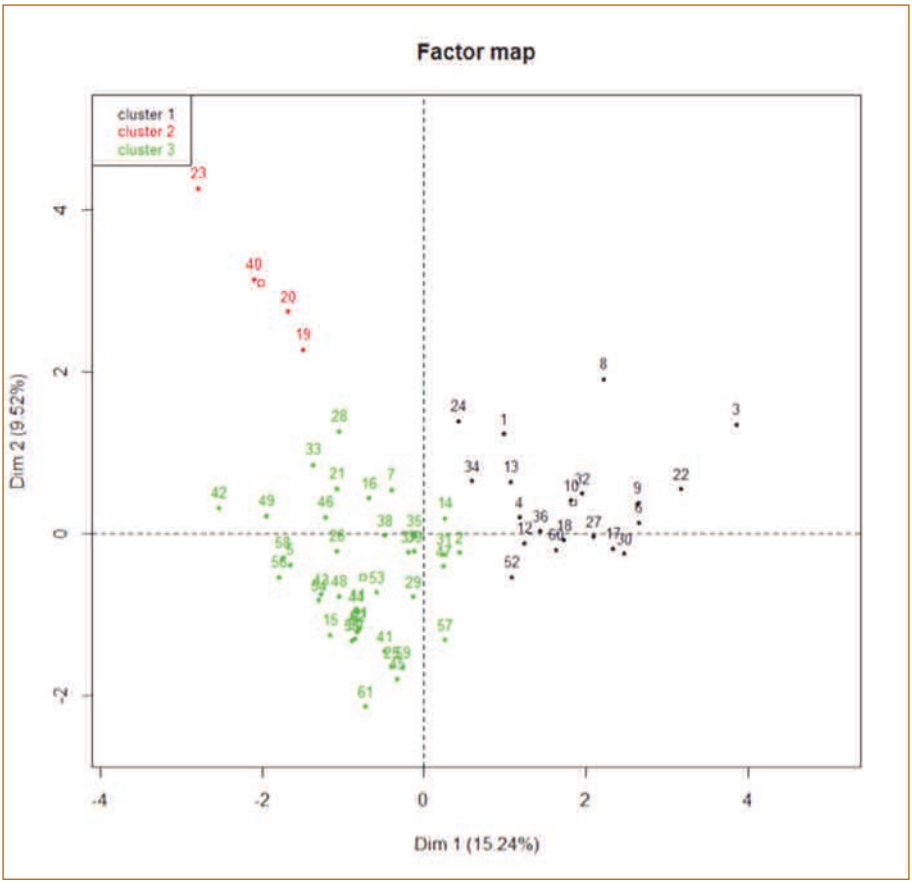


Fig. 4 : Représentation de la structuration des apiculteurs selon les résultats de l'analyse multifactorielle.

- pratiques de sélection (ex. : testage des reines, caractères de sélection...).

Cette méthode permet de générer un nouvel espace dans lequel il est possible de représenter les apiculteurs (et éventuellement de dégager des groupes d'apiculteurs) et les variables (et ainsi d'étudier les liaisons entre les variables). Cette représentation est visible sur la fig. 4.

Afin de synthétiser encore plus l'information, une Classification Ascendante JHiérarchique (CAH) a été réalisée sur les coordonnées des apiculteurs selon les axes de l'AFM. Les axes choisis restituent 95 % de l'information. Ces résultats sont présentés dans le tableau 8.

La première classe est définie principalement par le statut de loisirs de ces apiculteurs qui possèdent peu de ruches

(1 à 10) et ne transhument pas. Globalement, ces apiculteurs ne sont pas très techniques (pas d'élevage de reines, aucun nourrissement, pas d'utilisation du chasse-abeilles, tab. 8).

La deuxième classe est assez particulière avec seulement 4 apiculteurs qui la constituent. Pour cette classe, il s'agit d'apiculteurs professionnels avec une certaine technicité. L'utilisation de cadres à mâles concernant les techniques de multiplication du cheptel ou encore l'utilisation du chasse-abeilles ou les forts niveaux de production des colonies ont été des facteurs discriminants importants.

La troisième classe d'apiculteurs est définie plutôt par des apiculteurs semi-professionnels avec un nombre de ruches compris essentiellement entre 60 et 150 ruches avec un nombre de ruchers compris entre 2 et 10. Les apiculteurs de cette classe suivent leurs colonies de manière concrète, pratiquent une sélection des souches sans pour autant réaliser de l'élevage de reines.

Discussion

Récolte et analyse des chiffres clés

La principale difficulté de récolte des données relatives aux miellées et aux rendements est due à un certain tabou de la part des apiculteurs qui ne communiquent quasiment aucune donnée fiable et interprétable sur leurs niveaux de production. Cette absence de données précises est problématique pour l'ADA qui a des difficultés à pouvoir fournir des données pertinentes. C'est pourquoi ce

Abeille réunionnaise (*Apis mellifera unicolor*) sur fleur de petit mahot (*Dombeya ferruginea*).

sont les données globales de la COOPEMIEL qui ont été utilisées dans la première partie de ce travail. Il est à noter quand même que la coopérative n'est pas en mesure de fournir des données individuelles pour ses adhérents.

L'importance des miellées

Sur l'ensemble des miellées enregistrées depuis 2001 à la Coopémiel, le tonnage varie d'un minimum de 11,6 t en 2002 à un maximum de 49,3 t en 2004. Depuis 2001 la production de baie rose est chaque année supérieure aux autres miellées.

Le « baie rose » n'est pas un arbre indigène de la Réunion. Il a le statut de plante exotique [5] et fait partie des 100 espèces les plus envahissantes au monde [6]. Cette espèce est présente sur une grande partie de l'île car elle a colonisé les ravines, les terres agricoles à

l'abandon ainsi que les anciennes coulées volcaniques [7]. On la trouve dans les milieux naturels et semi-naturels [7]. Cette grande répartition et donc cette forte disponibilité de la ressource peuvent expliquer la forte production de miel sur l'île.

Pour la coopérative, la production de miel « toutes fleurs » ou miel de forêt est anecdotique avec des années sans production et d'autres avec des niveaux plus importants mais qui restent fortement en deçà des niveaux de production de miel de letchi ou de baie rose (maximum de 3,6 t produites en 2006). Ces niveaux faibles pour cette miellée peuvent s'expliquent par un très faible intérêt de ces miellées intermédiaires de la part des apiculteurs livrant à la coopérative. Les miels de forêt [comme le miel de Tan Rouge (*Weinmannia tinctoria*)] sont beaucoup mieux valorisés en vente au détail qu'en gros à la coopérative.

L'hétérogénéité des rendements

Concernant l'étude détaillée des rendements, sur les 70 apiculteurs adhérents de l'ADA, seulement 25 et 15 apiculteurs ont donné des éléments pour les miellées de baies roses respectives de 2011 et 2012.

Les hétérogénéités sont très marquées entre les secteurs géographiques et entre apiculteurs.

Les variations de rendements moyens observées entre les secteurs de l'île (N, S, E, O) peuvent aller de 6,4 kg de baie rose/ruche dans le sud jusqu'à 10,9 kg/ruche dans l'est.

Face au faible nombre de données recensées, ces chiffres sont à relativiser. Néanmoins, les données 2011 et 2012 ont tendance à montrer (comme les données synthétisées de la coopérative depuis plusieurs années) des hétérogénéités temporelles importantes. Différentes causes peuvent expliquer ces hétérogénéités.

Certains facteurs climatiques, comme les sécheresses plus ou moins importantes qui peuvent survenir dans le Sud ou bien les fortes pluviométries du début d'année liées à la saison cyclonique peuvent jouer un rôle important. Les alternances de floraison qui sont connues chez le letchi ou le baie rose peuvent occasionner des niveaux de production particulièrement bas. Les miellées peuvent également être légèrement décalées dans le temps (la miellée de letchis 2012 a commencé en juillet au lieu de fin août). Les colonies ne sont pas toujours opérationnelles pour démarrer les miellées. Cela est dû à des pratiques différentes des apiculteurs. Certains ne souhaitent pas ou peu pratiquer le nourrissement, ne pratiquent pas de transhumance et par conséquent, il peut arriver que les colonies soient vraiment faibles en début de certaines miellées et incapables de stocker suffisamment de miel.

Enfin, une pluviométrie continue pendant les miellées (comme ce fut le cas pour la miellée de letchis de 2011 ou la miellée de baie rose de 2013) occasionnera des récoltes beaucoup plus faibles.

Ces niveaux très hétérogènes sont une des difficultés majeures de la filière et particulièrement de la coopérative. Le développement d'un guide de bonnes pratiques ou d'un plan de sélection de reines aux caractères marqués de production est les pistes envisagées par la filière pour tenter de lisser les niveaux de production.

Trophallaxie entre deux abeilles réunionnaises (*Apis mellifera unicolor*).

Étude des itinéraires techniques et typologie

La pré-enquête réalisée auprès de 200 apiculteurs a permis de montrer que la quasi-totalité des apiculteurs réunionnais se consacre à la production de miel. Néanmoins, les apiculteurs professionnels se diversifient plus que les autres en produisant pour certains de la gelée royale ou du pollen. De plus en plus d'apiculteurs professionnels semblent également se destiner à une production propre de cire afin de s'affranchir de la contrainte de l'importation (observation personnelle).

Le faible nombre d'apiculteurs professionnels vivant exclusivement de l'apiculture est un élément remarquable de cette pré-enquête, puisqu'ils ont été seulement 18 recensés. La majorité des apiculteurs réunionnais ont pour la quasi-totalité un autre revenu que l'apiculture. Ces données observées sont différentes des données métropolitaines puisqu'en France, il y a 91 % d'apiculteurs familiaux (contre 50,5 % à la Réunion), 5 % de pluriactifs (39,5 % à la Réunion) et 4 % de professionnels (10 % à la Réunion) [3]. Ces données montrent une population divisée en quasiment deux parties égales : les apiculteurs de loisirs et les professionnels au sens large (50,5 % et 49,5 % respectivement).

Avec seulement 273 apiculteurs déclarés en 2013 [sur une population estimée à 500 apiculteurs (données DAAF, 2008)], la part des apiculteurs de loisirs est clairement sous-estimée. Les apiculteurs professionnels ont besoin d'être déclarés pour pouvoir toucher des aides structurelles, ce qui n'est pas le cas des apiculteurs de loisirs. Ces apiculteurs de loisirs détenant quelques ruches évoluent parfois loin des circuits d'information diffusés par des structures comme le GDS ou le Syndicat Apicole de la Réunion.

L'échantillonnage réalisé pour l'enquête de typologie présente plusieurs points à préciser. Parmi les 62 apiculteurs enquêtés, 10 n'ont pas été tirés au sort et ont été intégrés à l'enquête sur la base du volontariat. Cela occasionne une perte de représentativité de l'échantillon. De la même façon, les apiculteurs professionnels ont été surreprésentés avec 14 des 18 professionnels recensés qui ont été enquêtés. Enfin le biais de sélec-

tion occasionné par la sous-déclaration des apiculteurs de loisirs dans la population initiale est également à intégrer.

Le premier élément marquant issu de cette enquête de typologie est la moyenne d'âge observée plutôt élevée. Comme en métropole, la moyenne d'âge indique une population vieillissante avec peu d'installation de jeunes apiculteurs. L'âge moyen estimé à 51 ans environ est quand même plus jeune que celui de métropole (plus de 61 ans) [3].

Concernant les ruches utilisées, il existe un certain nombre d'évolutions qui sont en train de se produire chez les apiculteurs réunionnais. La ruche locale (ruche bourbon) voit son utilisation modifiée. De plus en plus d'apiculteurs l'utilisent sur deux corps (au lieu d'un seul). Cela permet à la grappe d'abeilles de mieux se déployer au sein de la ruche. Cela permet également le stockage de plus grandes quantités de réserves et d'éviter le recours au nourrissement par l'apiculteur. La ruche langstroth se développe de plus en plus sur l'île. La ruche dadant, très peu utilisée, ne semble pas convenir aux apiculteurs. Cette ruche de grande taille nécessite en effet un temps important de « remplissage » ou d'occupation des cadres par les abeilles qui ne convient pas nécessairement aux apiculteurs.

À la Réunion, plus de la moitié des apiculteurs pratiquent la transhumance. La grande diversité géographique et bioclimatique est responsable de cet état de fait. Les apiculteurs suivent les floraisons qui se succèdent dans les différents secteurs de l'île aussi bien pour la production de miel que pour bénéficier de pollinées importantes pour stimuler la ponte des reines et fournir de nouveaux essaims.

Les meilleures périodes pour pratiquer l'essaimage artificiel sont les périodes allant de septembre à octobre après la miellée de letchis. À cette période de l'année, les bois de couleurs (forêts indigènes) sont en fleurs et très riches en pollen. Les mois de janvier à février sont évités principalement en raison des mauvaises conditions climatiques (période cyclonique et pluviométrie très abondante).

Les techniques d'élevages de reines ne sont pas maîtrisées par tous les types d'apiculteurs. Les techniques de greffage et d'élevage sont plutôt maîtrisées par les professionnels alors que les apiculteurs de loisirs ne semblent pas concernés par ces pratiques. La quasi-totalité des apiculteurs (95 %) multiplie son cheptel en pratiquant de simples divisions. Parmi ces apiculteurs, essentiellement les professionnels intégreront de jeunes reines issues de leur élevage.

Malgré tout, plus de la moitié des apiculteurs (62,5 %) déclarent effectuer une sélection de leurs souches. Les principaux caractères recherchés sont la productivité en miel, la douceur, l'hygiénisme et la qualité de la ponte. Néanmoins, seulement 40 % des apiculteurs effectuant la sélection se baseront sur des critères quantifiés et rigoureusement observés. Parmi ces apiculteurs sélectionneurs, seuls quelques professionnels

(4,84 %) utilisent la voie mâle dans le processus de sélection en utilisant les cadres à mâles pour saturer les zones de reproduction avec leurs propres mâles.

Entre les pratiques stressantes pour les abeilles (récoltes de tous les cadres de miel sur les ruches bourbon) et la disparition de certaines ressources nectarifères, les apiculteurs sont très souvent obligés d'apporter une supplémentation aux colonies. En effet, 72,58 % des apiculteurs pratiquent le nourrissement sur l'île.

Les pratiques sont quant à elles très variables d'un apiculteur à l'autre. Autant les apiculteurs reconnaissent des périodes de carences en nectar et pratiquent un nourrissement de carence, autant le nourrissement spéculatif n'est pas réalisé de manière courante. Ce type de nourrissement doit être remis en perspective selon les objectifs de l'exploitation. Le nourrissement spéculatif est vraiment destiné à stimuler la ponte de la reine environ un mois avant la miellée afin d'avoir une colonie avec une population importante de butineuses. Les apiculteurs de loisirs, moins soumis à des exigences de rentabilité par rapport aux professionnels, peuvent délaisser ou ne pas appliquer cette pratique.

Les périodes où le nourrissement est nécessaire pour les colonies sont très variables selon les secteurs géographiques de l'île (différences Hauts/Bas et Est/Ouest). Les facteurs influençant le nourrissement sont climatiques (température, pluviométrie) et écologiques (floraison ou non des espèces nectarifères).

En effet, une des caractéristiques de l'apiculture réunionnaise est l'absence globalement constatée de suivi rigoureux au sein du rucher. Le registre d'élevage et le cahier de miellerie, bien qu'obligatoires, ne sont pas toujours utilisés et correctement remplis. Les structures impliquées dans la filière comme le GDS ou l'ADA ont un rôle majeur à jouer dans l'encadrement et l'accompagnement technique des apiculteurs.

Conclusion

Cette étude a permis de collecter pour la première fois un certain nombre de données relatives à l'apiculture réunionnaise.

Les apiculteurs réunionnais se consacrent majoritairement à la production de miel. La miellée principale est la miellée de baies roses qui se déroule de mars à avril. Les rendements de production pour toutes les miellées sont très inégaux selon les années et selon les secteurs géographiques de l'île.

La population d'apiculteurs est une population vieillissante avec une moyenne d'âge supérieur à 50 ans. La moitié de la population est constituée d'apiculteurs de loisirs (50,50 %) et l'autre moitié de professionnels et semi-professionnels (49,50 %).

La Réunion offre une grande diversité de pratiques aux apiculteurs.

Les alternances de floraison rendent très commune la pratique de la transhumance. Malgré tout, il existe des périodes constatées de carences en nectar

et qui nécessitent un recours au nourrissement artificiel.

Quelques éleveurs professionnels pratiquent l'élevage de reines. Malgré cela, les apiculteurs sélectionnent quasiment tous leurs colonies selon différents critères. Les principaux critères retenus sont la productivité et la douceur.

Enfin, les outils comme le cahier de miellerie ou le registre d'élevage, bien qu'obligatoires, ne sont pas suffisamment répandus ni vulgarisés auprès des apiculteurs. Ce travail important doit être poursuivi par des structures comme l'ADA et le GDS.

Références citées

1. Myers N. *et al.*, Biodiversity hotspots for conservation priorities. Nature, 2000. 403 (6772) : p. 853-8.

2. GDS Réunion, Rapport d'activité 2013 - GDS Réunion. 2013. p. 250.

3. FranceAgriMer, *Audit économique de la filière apicole française*, L.S.d. FranceAgriMer, Editor. 2012, FranceAgriMer. p. 215.

4. Team R.C., *R : A language and environment for statistical computing*. 2013, R Foundation for Statistical Computing : Vienna, Austria. p. http://www.R-project.org/.

5. RÉUNION L., *Plantes exotiques envahissantes : Méthodes de lutte mises en œuvre par l'Office National des Forêts à La Réunion*. Invasive Alien Species and Terrestrial Ecosystem Rehabilitation in Western Indian Ocean Island States, 2003 : p. 34.

6. Lowe S. *et al.*, *100 of the world's worst invasive alien species : a selection from the global invasive species database*. 2000 : Invasive Species Specialist Group Aucklan, New Zealand.

7. Cadet L. J. T., *La végétation de l'Île de la Réunion : étude phytoécologique et phytosociologique*. Saint-Denis-de-la-Réunion : Imprimerie Cazal 312 p. Illus., maps. Includes plant lists. Geog, 1980. 5.

Annexe 6

NIVEAU	VARIABLE	EXEMPLES
RUCHER	ID échantillon	
	Date	
	Lieu	
	Coordonnées GPS	
	ID apiculteur	
	Type de ruche	Langstroth, Bourbon, TBH…
	Nombre de ruches	
COLONIE ECHANTILLONNEE	Type de ruche	Langstroth, Bourbon, TBH…
	Nombre de corps	
	Type de fond	Fonds plein en bois, plastique aéré….)
	Support	Pneu, Support bois…
	Disposition	Alignées, isolées…
	Grille à reine	
	Sous-espèces d'abeilles	
	Origine	
	Modalités de renouvellement des reines	Renouvellement naturel, élevage de reines…
	Activité de la colonie	
	Nombre de cadre de couvain / Cadres total	
	Nombres de cadre de réserves / cadres total	
	Taille réserve au dessus du couvain sur le cadre du milieu	
	Transhumance	
	Source de nourriture	Nourrissement, miellée…
	Age du matériel apicole (caisses)	
PRATIQUE APICOLE	Statut professionnel	
	Date début activité apicole	
	Nombe de ruchers actuels	
	Nombre de colonies actuelles	
	Nombre de colonies l'année précédente	
	Obtention des colonies	
	Renouvellement des colonies	
	Achat d'abeilles	Oui, non
	Quels critères inflençant	
	Rythme de renouevllement des cires	
	Origine des cires	Achat, auto-production, abeilles…
	Méthodes de désinfection du lève cadre	
	Méthodes de désinfection du matériel apicole	
	Problèmes sanitaires année dernière	
	Problèmes sanitaires cette année	