

Université de Montréal

***Varroa destructor* chez l'abeille domestique (*Apis mellifera*) : impacts sur
l'hémolymphe et les infections secondaires**

Par
Antoine Cournoyer

Département de pathologie et de microbiologie
Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine vétérinaire
en vue de l'obtention du grade de *Maîtrise ès sciences* (M. Sc.)
en sciences vétérinaires, option pathologie

Novembre 2022

© Antoine Cournoyer, 2022

Ce mémoire intitulé

***Varroa destructor* chez l'abeille domestique (*Apis mellifera*) : impacts sur
l'hémolymphe et les infections secondaires**

Présenté par
Antoine Cournoyer

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Levon Abrahamyan
Président-rapporteur

Marie-Odile Benoit-Biancamano
Directrice

Pascal Dubreuil
Codirecteur

Julie Arsenault
Membre du jury

Résumé

L'abeille domestique (*Apis mellifera*) est un insecte qui contribue à l'agriculture par sa pollinisation. Le taux élevé des mortalités hivernales des colonies est préoccupant depuis des décennies au Canada. Plusieurs facteurs sont impliqués, particulièrement *Varroa destructor*; un parasite qui se nourrit du corps gras de l'abeille. Le développement d'outils adaptés permettrait un meilleur suivi des colonies. Le projet consiste à corrélérer l'infestation de varroa avec les concentrations en sucres sériques et les co-infections (virales et bactériennes). Cette étude compare dans le temps six ruches fortement infestées et six ruches traitées (témoins). Un prélèvement d'hémolymphe a été effectué pour mesurer les concentrations en sucres en utilisant un glucomètre humain préalablement validé. Les concentrations en sucres (glucose et tréhalose) dans l'hémolymphe étaient significativement plus faibles ($p < 0.001$) dans les ruches fortement infestées que les témoins en septembre. L'analyse RT-PCR multiplexe de six virus (DWV A/B, BCQV, KBV, IAPV et ABPV) a démontré que les ruches fortement infestées présentent une infection simultanée virale avec des charges plus élevées que chez les ruches témoins ($p < 0.05$) pour la majorité des virus, sauf pour ABPV. Chez les ruches fortement parasitées, les charges virales pour DWVA et BQCV sont plus élevées en septembre qu'en juillet ($p \leq 0.0001$). *Serratia marcescens* a été seulement détectée dans une ruche infestée et une ruche témoin. Une exposition continue et élevée à varroa occasionne, en automne, une augmentation des charges virales et une diminution des sucres, suggérant une altération de l'immunité, du métabolisme et des réserves. Ces paramètres provoquent une faiblesse et une mortalité des colonies.

Mots clés: *Varroa destructor*, *Apis mellifera*, Abeilles, Virus, Virus des ailes déformées (DWV), Virus de la paralysie aigüe (ABPV), Virus du Cachemire (KBV), Virus israélien de la paralysie aigüe (IAPV), Virus de la cellule royale noire (BQCV), Sucres, Glucose, Tréhalose, Glucomètre, Hémolymphe

Abstract

The European honeybee (*Apis mellifera*) contributes to the agriculture by its pollination; however, the mean overwintering loss rate of colonies over the last decades in Canada is worrisome. *Varroa destructor*, which feeds on the fat bodies of honeybees, is considered one of the most important causes of bee colony declines. The development of adapted diagnostic tools would improve the monitoring of honeybee health. This project aims to correlate the infestation by varroa to the hemolymph sugar concentrations (trehalose and glucose) and bacterial and viral coinfections. Six highly infested and six treated hives were compared over time. Pooled hemolymph of honeybees was collected for sugar concentration measurements using a previously validated portable glucometer. The hemolymph samples were also submitted for bacteriology. Multiplex RT-PCR analyses were performed on pooled honeybees for six viruses: Deformed wing virus A and B (DWV-A/B), Bee Queen Cell Virus (BQCV), Acute Bee Paralysis Virus (ABPV), Kashmere Bee Virus (KBV), Israeli Acute Paralysis Virus (IAPV). The results show that, in September, sugar concentrations in hemolymph were significantly lower in highly infested hives ($p < 0.001$). Infested hives showed markedly higher viral loads ($p < 0.05$), except for ABPV. Viral loads were significantly higher ($p \leq 0.0001$) in September than in July for DWV-A and BQCV. *Serratia marcescens* was only detected in one infested hive and one control. Overall, a continued and severe exposure to varroa leads to increased viral charges and decreased sugar concentrations, suggesting alterations in immunity, metabolism and reserve mobilization. All these parameters contribute to the weakening and mortality of the colonies.

Keywords: *Varroa destructor*, *Apis mellifera*, Honeybee, Honeybee Viruses, Deformed Wing Virus (DWV), Acute Bee Paralysis Virus (ABPV), Kashmere Bee Virus (KBV), Israeli Acute Paralysis Virus (IAPV), Bee Queen Cell Virus (BQCV), Sugar, Glucose, Trehalose, Hemolymph

Table des matières

Résumé.....	3
Abstract	4
Table des matières	5
Dédicace	11
Liste des tableaux	12
Liste des figures	13
Liste des sigles et abréviations	14
Remerciements	15
Introduction générale.....	16
Chapitre 1 - Revue de littérature.....	18
1. Connaissances de base sur l'abeille domestique (<i>Apis mellifera</i>)	18
1.1 Anatomie.....	18
1.2 Cycle de vie	18
1.2.1 Castes chez l'abeille.....	20
1.2.2 Sous-castes chez l'ouvrière	20
1.2.2.1 Vitellogénine.....	21
1.2.2.2 Hormone juvénile III	22
1.2.2.4 Relation entre la vitellogénine et l'hormone juvénile III.....	22
1.2.2.5 Influence des saisons sur le cycle de vie	23
1.3 Hémolymphes.....	24
1.3.1 Sucres.....	26
1.3.1.1 Tréhalose	29
1.3.1.2 Tréhalase.....	30
1.3.1.3 Glucose et fructose	31
1.4 Corps gras.....	32
1.4.1 Distribution du corps gras chez l'abeille	32
1.4.2 Rôles du corps gras chez l'abeille	32
1.4.3 Cellules composant le corps gras	34
1.4.4 Oenocytes.....	35

1.5 Système immunitaire.....	37
1.5.1 Immunité individuelle.....	37
1.5.1.1 Immunité humorale.....	37
1.5.1.2 Immunité cellulaire.....	40
1.5.2 Immunité populationnelle.....	42
2. Agents pathogènes rencontrés chez l'abeille.....	42
2.1 <i>Varroa destructor</i>	42
2.1.1 Généralités.....	42
2.1.2 Évolution.....	43
2.1.3 Anatomie.....	44
2.1.4 Cycle de vie.....	45
2.1.4.1 Phase reproductive.....	47
2.1.4.2 Phase phorétique.....	49
2.1.4.3 Sélection de son hôte.....	51
2.1.5 Capacités d'adaptation.....	52
2.1.6 Impacts connus de <i>Varroa destructor</i> sur l'abeille <i>Apis mellifera</i>	55
2.1.6.1 Les changements physiologiques de l'abeille parasitée.....	55
2.1.6.2 Changements morphologiques de l'abeille infestée.....	56
2.2 Virus rencontrés chez l'abeille.....	58
2.2.1 Génomique des virus.....	58
2.2.2 L'isolement viral chez l'abeille.....	59
2.2.3 Modes de transmission des virus.....	59
2.2.4 Signes cliniques.....	60
2.2.5 Test diagnostique.....	60
2.2.6 Virus des ailes déformées (DWV).....	61
2.2.6.1 Histoire.....	61
2.2.6.2 Transmission.....	61
2.2.6.3 Signes cliniques.....	61
2.2.6.4 Rôle de varroa.....	62
2.2.6.5 Isolement.....	64
2.2.6.6 Génome du virus des ailes déformées (DWV).....	64
2.2.6.6.1 Virus des ailes déformées, génotype A (DWV-A).....	65

2.2.6.6.2 Virus des ailes déformées, génotype B (DWV-B)	66
2.2.6.6.3 Virus des ailes déformées, génotypes C et D (DWV-C et DWV-D)	67
2.2.7 Complexe viral AKI	67
2.2.7.1 Virus de la paralysie aigüe (ABPV).....	68
2.2.7.1.1 Histoire	68
2.2.7.1.2 Isolement.....	68
2.2.7.1.3 Transmission	68
2.2.7.1.4 Signes cliniques.....	69
2.2.7.2 Virus du Cachemire (KBV).....	70
2.2.7.2.1 Isolement.....	70
2.2.7.2.2 Signes cliniques.....	71
2.2.7.2.3 Transmission	71
2.2.7.3 Virus israélien de la paralysie aigüe (IAPV).....	71
2.2.7.3.1 Histoire	72
2.2.7.3.2 Signes cliniques.....	72
2.2.7.3.3 Isolement.....	72
2.2.7.3.4 Transmission	73
2.2.8 Virus de la cellule royale noire (BQCV).....	73
2.2.8.1 Isolement	74
2.2.8.2 Signes cliniques	74
2.2.8.3 Transmission.....	74
2.3 Bactéries connues chez l’abeille	75
2.3.1 Microbiome intestinal	75
2.3.2 <i>Serratia marcescens</i>	77
Chapitre 2 – Thème de recherche et innovation	79
2.1 Hypothèse	80
2.2 Objectif.....	80
Chapitre 3 – Article 1 : Validation de l’utilisation du glucomètre chez les abeilles (sous-objectif 1).....	81
3.1 Abstract	82
3.2 Introduction	83

3.3 Material and methods	84
3.3.1 Sample collection	84
3.3.2 Sample preparation	84
3.3.3 Measurement of glucose	85
3.3.4 Accuracy	85
3.3.5 Imprecision	85
3.3.6 Cross-reactions	86
3.3.7 Method agreement	86
3.3.8 Time and temperature storage conditions	86
3.3.9 Trehalose measurement	86
3.3.10 Statistical analysis	87
3.4 Results	87
3.4.1 Accuracy	87
3.4.2 Imprecision	88
3.4.3 Cross-reactions	88
3.4.4 Method agreement	88
3.4.5 Time and temperature storage conditions	89
3.4.6 Trehalose measurement	89
3.5 Discussion	89
3.6 Figures and tables	93
3.7 Supplemental material	99
3.8 Acknowledgments	99
3.9 Footnotes	100
3.10 References	100
Chapitre 4 – Article 2 : Évaluation des taux de sucres sériques et de l’incidence des infections secondaires en fonction la charge parasitaire de <i>Varroa destructor</i> (sous-objectifs 2 et 3)	104
4.1 Abstract	106
4.2 Introduction	107
4.3 Materials and methods	109
4.3.1 Cohort Study	109
4.3.2 Parasitic Load	109

4.3.3 Honeybee Sampling	110
4.3.4 Honeybee Sample.....	110
4.3.5 Sugar Concentrations	110
4.3.6 Bacteriology	111
4.3.7 Virology.....	111
4.3.8 Statistical analysis.....	112
4.4 Results	114
4.4.1 Parasitic Load	114
4.4.2 Sugar Concentrations in Honeybee Hemolymph	114
4.4.3 Bacteriology	114
4.4.4 Virology.....	115
4.5 Discussion	117
4.5.1 General Discussion	117
4.5.2 Parasitic Load Monitoring	117
4.5.3 Sugar Concentrations in Hemolymph.....	118
4.5.4 Bacteriology	119
4.5.5 Virology.....	119
4.6 Conclusion	121
4.7 Figures	122
4.8 Supplementary Materials	127
4.8 Author Contributions	134
4.10 Funding.....	134
4.11 Acknowledgments	134
4.12 Conflicts of Interest.....	134
4.13 Appendix A.....	135
4.14 References.....	136
4.15 Commentaires	145
Chapitre 5 – Discussion	146
5.1 Innovations de ce projet.....	146
5.1.1 Approche méthodologique	146
5.1.2 Innovations rencontrées lors de ce projet.....	147
5.2 Retour sur les résultats	148

5.2.1 Rappel des hypothèses de l'étude	148
5.2.2 Sous-objectif 1 : Validation de l'utilisation du glucomètre chez les abeilles	149
5.2.3 Sous-objectif 2 : Sucres sériques en fonction de varroa	151
5.2.4 Sous-objectif 3 : Corrélation des infections (virales et bactériennes) avec varroa.....	152
5.2.5 Corrélation entre les différents paramètres étudiés et l'évolution temporelle	154
5.2.6 Limites.....	156
5.3 Conclusion et perspectives	161
5.3.1 Conclusion.....	161
5.3.2 Perspectives.....	162
Chapitre 6 – Références bibliographiques.....	164

Dédicace

Je voudrais dédier ce mémoire à ma nièce, Béatrice Quevillon, en gage d'avenir pour notre future génération.

Liste des tableaux

Tableau 1. Concentrations en sucres (tréhalose, glucose et fructose) dans l'hémolymphe de l'abeille rapportées dans la littérature.	29
Tableau 2. Comparaison du corps gras de l'insecte ainsi avec le foie et les adipocytes des mammifères.....	35
Tableau 3. Résumé des connaissances sur les hémocytes connus chez les insectes de l'ordre des Hymenoptera.	41

Liste des figures

Figure 1. Durée du développement de l'abeille selon les castes, en nombre de jours (j.).	19
Figure 2. Système circulatoire ouvert de l'insecte.	25
Figure 3. Forme moléculaire (projection de Haworth) des différents sucres circulant dans l'hémolymphe de l'abeille.	26
Figure 4. Corps gras de l'abeille.	33
Figure 5. Processus immunitaire de mélanisation dans l'hémolymphe de l'insecte.	39
Figure 6. Anatomie de <i>Varroa destructor</i> ; aspect dorsal (a), de face (b) et ventral (c). ...	45
Figure 7. Les différentes phases de la vie de varroa : œuf, protonymphe, deutonymphe, préadulte et adulte.	46
Figure 8. Le cycle de vie de varroa se divise en deux phases : phase phorétique et reproductive.	47
Figure 9. Deux acariens <i>Varroa destructor</i> en phase phorétique attachés sur l'abdomen d'une abeille.	50
Figure 10. Fluctuation de la population d'abeilles et de varroas dans une ruche au courant d'une année.	54

Liste des sigles et abréviations

ABPV : *Acute bee paralysis virus* (virus de la paralysie aigüe)

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

ASVCP : *American Society for Veterinary Clinical Pathology*

BQCV : *Bee queen cell virus* (virus de la cellule royale noire)

CAPA : *Canadian Association of Professional Apiculturists* (Association canadienne des professionnels en apiculture)

CI : *Confidence interval* (intervalle de confiance)

CRSAD : Centre de recherche en sciences animales Deschambault

CV : *Coefficient variation* (coefficient de variation)

DWV : *Deformed wing virus* (virus des ailes déformées)

DWV-A : *Deformed wing virus* (virus des ailes déformées, variant A)

DWV-B : *Deformed wing virus* (virus des ailes déformées, variant B)

DWV-C : *Deformed wing virus* (virus des ailes déformées, variant C)

DWV-D : *Deformed wing virus* (virus des ailes déformées, variant D)

FRQNT : Fonds de recherche du Québec en nature et technologies

KBV : *Kashmir bee virus* (virus du Cachemire)

IAPV : *Israeli acute paralysis virus* (virus israélien de la paralysie aigüe)

MAPAQ : Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec

PCR : Polymerase Chain Reaction (réaction de polymérase en chaîne)

qPCR : : Quantitative Polymerase Chain Reaction (réaction de polymérase en chaîne quantitative)

RT-qPCR : Reverse-Transcriptase quantitative PCR (transcriptase inversée)

RI : *Reference interval* (intervalle de référence)

SD : *Standard deviation* (écart-type)

Remerciements

Je tiens à remercier tous les gens qui m'ont soutenu dans ce parcours académique fortement enrichissant.

Je remercie tout d'abord ma directrice, Dre Marie-Odile Benoit-Biancamano, qui m'a donné la chance de participer à ce projet et de m'initier au monde de l'apiculture.

Je remercie les différents professeurs et professionnels qui ont contribué à l'avancement et la concrétisation de ce projet ; Dr Pascal Dubreuil, Dre Annie Deschamps, Dre Liza Bau-Gaudreault, Pr Levon Abrahamyan, Laurence Plamondon et tous les techniciens de laboratoire.

Je remercie ma famille, mes parents, ma grand-mère et mes amis pour leur soutien moral et financier. Je remercie ma mère et Mihindou Mbina pour leur temps consacré à la correction du mémoire.

Introduction générale

Que ce soit par leur structure sociale complexe, la production de miel ou la pollinisation des fleurs, les abeilles ont toujours fasciné les humains. Le Canada compte près de 10 000 apiculteurs et 800 000 ruches, qui génèrent des ventes de produits pour près de 200 millions de dollars, mais surtout, qui contribuent directement ou indirectement à l'industrie agricole canadienne pour une valeur pollinisatrice de 4 à 5,5 milliards de dollars additionnels par année (1).

Les abeilles jouent un rôle clé dans la pollinisation de nombreuses cultures, or, le déclin actuel des abeilles domestiques est alarmant. Dans le contexte actuel, la communauté scientifique et le public en général sont fortement sensibilisés aux problèmes que vivent les pollinisateurs, particulièrement les abeilles. Le taux de mortalité mondial des abeilles au cours des 30 dernières années a augmenté avec l'utilisation de pesticides, la modernisation agricole, le manque de biodiversité florale et, particulièrement, les diverses maladies et parasites (2). L'association canadienne des apiculteurs professionnels estime des pertes hivernales de colonies d'abeilles de 45,6% en 2022, correspondant au taux le plus élevé enregistré depuis 2007 (3, 4). Ces pertes sont considérables et inquiétantes en apiculture.

La survie des colonies d'abeilles pendant l'hiver nécessite une grande réserve d'énergie (graisse et sucres) et un état de santé optimal pour produire de la chaleur dans la ruche grâce à la vibration de leurs ailes. Le parasite *Varroa destructor* est un des principaux agents pathogènes qui nuit à la survie hivernale des abeilles. Les connaissances des effets de ce parasite sur l'abeille se sont grandement améliorées depuis la dernière décennie. Par contre, la pathogénie exacte ainsi que la relation entre les abeilles et l'acarien occasionnant leur affaiblissement restent à être éclairées (5).

L'utilisation d'instruments adaptés en médecine vétérinaire (glucomètre, spectrophotomètre, PCR) pourrait potentiellement aider à la translation des connaissances connues sur les autres espèces animales afin d'approfondir les notions sur les abeilles.

Chapitre 1 - Revue de littérature

1. Connaissances de base sur l'abeille domestique (*Apis mellifera*)

L'abeille domestique, *Apis mellifera* Linneaus 1758, est une espèce faisant partie de la classe des insectes, de l'ordre des hyménoptères, de la super famille *Apoidea* et de la famille *Apidae*. L'abeille domestique se divise en sous-espèces selon leur physiologie (couleur et taille) et leur comportement (agressivité) (6). Parmi le genre *Apis*, les espèces *Apis mellifera* (européenne) et *Apis cerana* (asiatique) partagent des similarités concernant leur morphologie et leur comportement (6).

Les abeilles sont des insectes holométaboliques, c'est-à-dire qu'elles subissent une métamorphose complète lors de leur développement selon leurs différents stades évolutifs (œuf, larve, nymphe, adulte) (7).

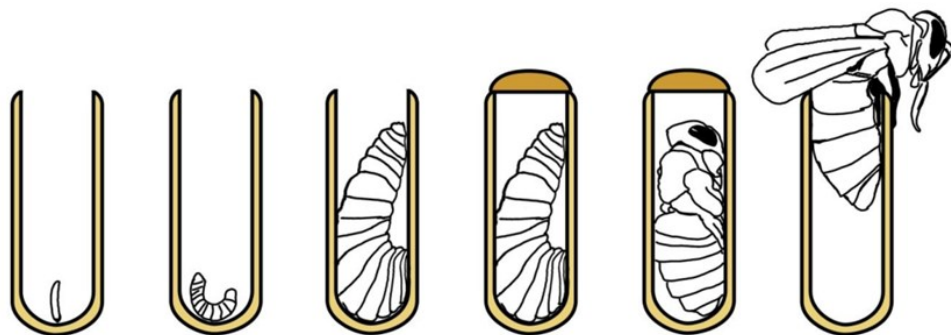
1.1 Anatomie

L'anatomie des abeilles (famille *Apidae*) est caractérisée par des structures buccales qui servent à la collecte du nectar et du pollen et par la présence d'une corbeille qui accumule le pollen aux deux pattes postérieures (6). Les insectes de l'ordre des hyménoptères, dont l'abeille, possèdent un maxillaire et un labium (8). Cet ensemble anatomique forme un tube afin d'aspirer du liquide (8). L'abeille domestique fait d'ailleurs partie des espèces d'abeilles ayant une longue langue leur permettant d'aspirer du nectar, ce qui est une caractéristique évolutive des pollinisateurs (9).

1.2 Cycle de vie

Les abeilles domestiques sont des insectes eusociaux, ce qui veut dire qu'elles vivent dans un système hiérarchique organisé en castes. Cette organisation sociale assure la survie de la colonie au sein d'une ruche pour plusieurs années. La ruche est une structure semi-fermée composée de cire abritant des formes immatures d'abeilles (couvain) et des réserves

nutritionnelles comme le miel et le pollen. L'ensemble des abeilles forme alors une collectivité pleinement intégrée qui peut être considérée comme un seul organisme, c'est-à-dire un superorganisme (10). Par conséquent, l'état de santé des abeilles s'examine sur le plan de la population. La durée totale du développement varie selon les castes (**Figure 1**), soit de 16 jours pour la reine, 21 jours pour les ouvrières et 24 jours pour les faux bourdons (8). Le cycle de vie de l'abeille se divise quatre stades ; l'œuf, la larve, la nymphe et l'adulte (8) (**Figure 1**). La reine pond un œuf qui est fertilisé (femelle : ouvrière ou reine) ou non (mâle : faux bourdon) au fond d'un alvéole non operculé (8). L'œuf se transforme ensuite en larve. La larve prend un gain de poids rapide en se nourrissant de la gelée nourricière (8). Les ouvrières adultes operculent l'alvéole renfermant la larve, ce qui entame le stade de nymphe (8). Dans l'alvéole operculé, la nymphe se métamorphose en l'une des 3 castes (8).



Caste	Oeuf	Larve	Nymphe	Émergence de l'adulte
Ouvrière	3 j.	6 j.	12 j.	21 j.
Faux bourdon	3 j	6,5 j.	14,5 j.	24 j.
Reine	3 j.	5 j.	8 j.	16 j.

Figure 1. Durée du développement de l'abeille selon les castes, en nombre de jours (j.). Tableau modifié et traduit de Gela Bayeta, 2014 (11). Image de Chan, 2012 (12), avec respect de la licence CC.

1.2.1 Castes chez l'abeille

La colonie se divise en trois castes : la reine (femelle fertile), ouvrières (femelles stériles) et les faux bourdons (mâles) (8). Pour chaque caste, les abeilles détiennent une physiologie caractéristique et un rôle défini contribuant à la survie de la colonie (6). Ainsi, il y a une interdépendance des abeilles adultes au sein de la ruche (6). Dans la colonie, il y a aussi le couvain qui regroupe toutes les formes immatures en développement, ce qui comprend les œufs, les larves et les nymphes.

La reine est la seule femelle fertile de la colonie (8). Son rôle est de pondre des œufs dans les alvéoles de la ruche, après son accouplement avec des mâles. La reine est donc la mère des ouvrières et des faux-bourdons au sein de la colonie.

Les ouvrières composent la majeure partie de la population de la ruche (8, 13). Elles exécutent différentes tâches essentielles à la productivité et la survie de la colonie. Les ouvrières ont une fonction évoluant selon l'âge, qui se regroupe en quatre sous-castes : les nettoyeuses, les nourrices, les butineuses et les abeilles adaptées à l'entreposage nutritionnel (14). Leurs comportements fluctuent en fonction de différents paramètres comme l'âge, le contexte social de la colonie, le bagage génétique, la température, la saison, l'infestation parasitaire et le statut nutritionnel (13).

Les faux bourdons sont les abeilles mâles qui permettent de fertiliser la reine. Ils sont en petit nombre dans la colonie. Le nombre de faux bourdons est plus important au printemps et ils meurent ou sont éliminés de la colonie à l'automne (6, 8).

1.2.2 Sous-castes chez l'ouvrière

La division des différentes tâches au sein de la colonie varie en fonction de l'âge (15-17). Les jeunes ouvrières exécutent des tâches au sein de la ruche durant les trois premières semaines de leur vie. Elles commencent le travail à l'extérieur de la ruche vers l'âge moyen

de 20 jours et butinent les plantes durant leurs dernières semaines de vie (8, 13). Le taux de mortalité des butineuses est plus élevé que chez les autres sous-castes d'ouvrières, en raison du niveau métabolique élevé (stress oxydatif), de la prédation et du climat (13).

Les besoins et les comportements des abeilles varient selon les tâches et l'âge (18). Par exemple, les butineuses (abeilles âgées) présentent une déplétion des stockages nutritionnels (protéiques) dans le corps gras pour les besoins de la colonie ; cette déplétion permet ainsi d'économiser les réserves de protéines de la ruche (19).

Malgré la structure sociale établie, le comportement des ouvrières s'adapte en fonction des interactions sociales et des besoins démographiques (13, 16, 20). À titre d'exemple, les abeilles deviennent prématurément des butineuses lorsque la taille de la population d'ouvrières de la ruche diminue (13, 20). La quantité de couvain influence également la physiologie des abeilles, en stimulant le développement des abeilles d'hiver (13). Ce changement physiologique est observé chez l'abeille d'une génération à l'autre (13).

Tous ces changements physiologiques sont médiés par la vitellogénine et l'hormone juvénile (13, 15).

1.2.2.1 Vitellogénine

La vitellogénine est une protéine de type phospholipoglycoprotéine synthétisée par le corps gras et sécrétée dans l'hémolymphe (15, 17, 21, 22). La vitellogénine est une molécule monomère qui constitue 30-50% des protéines circulant dans l'hémolymphe (13, 19, 23). La vitellogénine est ainsi la protéine la plus importante et la plus abondamment synthétisée chez l'abeille adulte (24). Cette molécule est également la protéine la plus abondamment entreposée dans le corps gras (13, 19, 23).

Cette protéine de stockage influence plusieurs aspects de la vie des abeilles, dont le comportement, l'immunité et la longévité (15, 21, 22, 25). La vitellogénine est utilisée par

les nourrices pour produire la gelée nourricière pour le couvain (13, 19, 23). La vitellogénine est également transporteuse de zinc, ce qui soutient le système immunitaire et protège du stress oxydatif (13, 22, 26).

Le niveau de vitellogénine dans l'hémolymphe varie selon l'âge. Il est le plus élevé chez les nourrices et les abeilles d'hivernage, mais plus bas chez les butineuses (15, 27-29). La quantité de vitellogénine dans l'hémolymphe atteint un maximum vers l'âge de 7 à 10 jours (nourrice), puis diminue avec l'âge (21, 30) et atteint son niveau le plus bas 4 jours après la transition en butineuse (29).

1.2.2.2 Hormone juvénile III

L'hormone juvénile III est sécrétée par le *corpora allata* (13, 15, 17, 31). Cette hormone participe au développement comportemental et à la métamorphose (13, 15, 31). Sa concentration dans l'hémolymphe change en fonction des saisons (température) et de la caste (18, 32). Le niveau d'hormone juvénile III demeure bas en automne et en hiver pour atteindre un pic au printemps (15, 27).

La quantité d'hormone juvénile fluctue selon l'âge (19, 30) tout en influençant le polyéthisme (17). Globalement, le niveau d'hormone juvénile est bas chez les jeunes abeilles (incluant les nourrices) et les abeilles d'hiver, mais plus élevé chez les butineuses (28, 30). Un niveau d'hormone juvénile plus élevé provoque la transition de l'abeille en butineuse (15, 27). Le déclenchement du butinage des ouvrières est alors accéléré lorsque le titre d'hormone juvénile est élevé pendant quelques jours (13, 20).

1.2.2.4 Relation entre la vitellogénine et l'hormone juvénile III

Les niveaux d'hormone juvénile et de vitellogénine circulant dans l'hémolymphe sont inversement proportionnels (19, 30). Il existerait une autorégulation de la synthèse de vitellogénine en fonction du niveau de vitellogénine sérique (29). L'hormone juvénile

permet la transcription de vitellogénine, mais l'inhibe à très haute concentration (13, 29). D'autre part, le corps gras de l'abeille produit de la vitellogénine en grande quantité pour diminuer la signalisation d'hormone juvénile (13, 33). La vitellogénine joue aussi un rôle important dans la fluctuation de l'hormone juvénile qui, indirectement, influence la longévité de l'abeille (13).

1.2.2.5 Influence des saisons sur le cycle de vie

La colonie d'abeilles est fortement influencée par les saisons (28). Entre les mois d'octobre et de mars, les abeilles doivent s'adapter aux faibles températures et à l'absence des ressources alimentaires (13). Étant donné les défis que représente l'hiver dans les milieux tempérés, les abeilles doivent adapter leur physiologie et leur comportement conséquemment aux baisses de température, ce qui débute en automne (8, 15, 34). Il y a alors une transition graduelle des abeilles d'été à celles d'hiver (34). Cette transition est également influencée par d'autres facteurs, comme la diminution de disponibilité de pollen, la photopériode et la diminution de la taille du couvain (13, 28, 35).

Lorsque les températures extérieures sont basses, soit inférieures à 10°C (36), les abeilles s'agglomèrent au sein de la ruche (près du couvain) afin de thermoréguler la ruche autour de 33°C (13, 28, 37). La thermorégulation s'effectue grâce à la vibration de leurs ailes, ce qui leur permet de survivre pendant plusieurs mois (13, 28, 37). Leur petite cage thoracique recouverte de poils permet de diminuer la perte de chaleur (37). L'énergie requise en glucose est puisée du miel accumulé durant l'été pour produire de la chaleur via la vibration des muscles thoraciques (13, 37, 38).

La population d'abeilles dans la ruche varie en fonction des saisons (**Figure 10**), de l'état de santé et de la sous-espèce (6, 8). Une ruche comprend entre 10 000 et 60 000 abeilles, selon la saison (39). Ainsi, au printemps et en été, la ruche comprend une reine, des milliers d'ouvrières (20 000-60 000) et d'abeilles immatures (10 000-30 000) et des centaines de faux bourdons (8, 40). C'est en été que le nombre d'œufs pondus est à son maximum (40). En hiver, le nombre d'abeilles diminue à environ 10 000 (8, 40).

L'espérance de vie des ouvrières est d'environ 30-45 jours durant l'année (28). Elle augmente graduellement entre le printemps et l'automne, et atteint son maximum en hiver (250 jours) (28).

Les abeilles d'hiver sont appelées *diutivæ* (de longue durée) (15). Les abeilles *diutivæ* sont modifiées morphologiquement. Elles présentent une hypertrophie des glandes hypopharyngiennes leur permettant la production de nourriture (13). La diminution de la photopériode en automne occasionne un élargissement du corps gras, ce qui leur permet d'accumuler des sources nutritionnelles comme des protéines et des lipides (13, 28, 41, 42). Le corps gras des abeilles *diutivæ* atteint donc sa taille maximale à la fin de l'automne et au début de l'hiver (13, 28, 41, 42). Ainsi, la quantité des protéines totales (dont la vitellogénine) est plus élevée chez les abeilles *diutivæ* (27), mais l'activité métabolique du corps gras des abeilles d'hiver est réduite (15).

1.3 Hémolymph

L'hémolymph constitue le fluide circulatoire des insectes (43) (**Figure 2**). L'hémolymph diffère du sang des vertébrés en raison de l'absence de globules rouges et de la concentration élevée en acides aminés libres (44). Le système circulatoire de l'abeille est ouvert et il remplit la cavité corporelle de l'insecte où les organes sont en suspension (43, 44). L'hémolymph est séparée des cellules tissulaires par une fine membrane délimitant l'hémocoel (43).

L'hémolymph permet le transport de l'eau, de molécules, de nutriments, d'hormones et des hémocytes (cellules immunitaires) (15, 44). Le cœur dorsal permet de pomper le liquide circulatoire à travers l'insecte (43) (**Figure 2**). L'hémolymph pompée au cœur passe de l'aorte vers le cerveau, retourne dans l'abdomen puis au cœur (15) (**Figure 2**). L'hémolymph participe peu au transport de gaz (oxygène et dioxyde carbone) en raison

de l'absence d'hémoglobine (8, 15, 43), et c'est plutôt un système distinct composé de trachées et de trachéoles qui fournit l'apport en gaz aux tissus.

L'hémolymphe est composée majoritairement d'un fluide comportant des concentrations variables de molécules : des protéines, des lipides, des acides aminés et des sucres (38, 44, 45). Les acides aminés ont une haute concentration (200 mmol/L) et participent à l'osmolarité (44). Des protéines plasmatiques et de transport du fer sont également en circulation (44). Les protéines plasmatiques composent entre 1-5% de l'hémolymphe (46). Les concentrations en sodium et en chlore sont faibles, tandis que celles du potassium et du magnésium sont élevées (44).

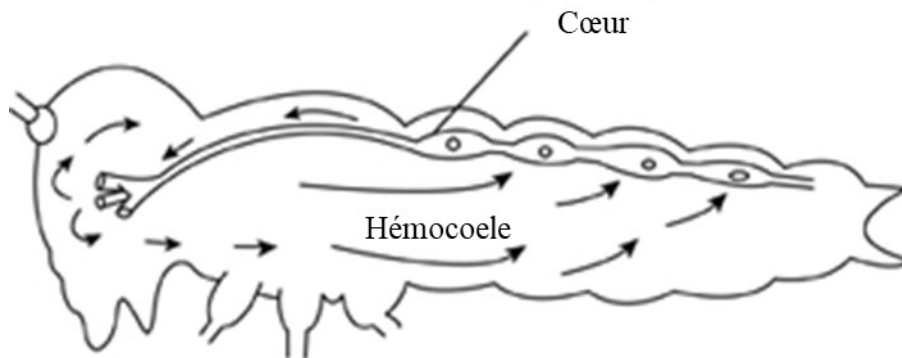


Figure 2. Système circulatoire ouvert de l'insecte.

Il y a un cœur à l'aspect dorsal avec un vaisseau simple. L'hémolymphe circule dans les vaisseaux et remplit la cavité corporelle (hémocoèle). Adapté et traduit avec la permission de © 2022 Purdue University.

L'eau de l'hémolymphe compose 20-50% du volume total du corps de l'insecte, avec une plus grande proportion chez les larves (44). La majorité de l'eau est réabsorbée dans l'intestin postérieur et le rectum, et excrétée par les tubules de Malpighi (reins) (43). Le pH de l'hémolymphe des insectes se situe généralement entre 6,4 et 6,8 (44). La couleur jaunâtre de l'hémolymphe est attribuée à certains pigments, dont le bêta-carotène (44).

1.3.1 Sucres

Les sucres constituent les principaux substrats d'oxydation pour la production d'énergie (15, 38, 46-51). L'énergie produite par ces sucres permet d'accomplir les activités quotidiennes de l'abeille, dont le vol par la contraction des muscles des ailes (15, 38, 46-51). Les principaux sucres circulant dans l'hémolymphe sont le tréhalose, qui est le plus abondant et, en plus petite concentration, le fructose et le glucose (44, 51) (**Figure 3**).

Le tréhalose est composé de deux molécules de glucose (glucose-1-phosphate et glucose-6-phosphate) (44, 48, 52, 53). La liaison glycosidique alpha-(1-1) entre les deux glucoses rend la molécule de tréhalose très stable (53, 54).

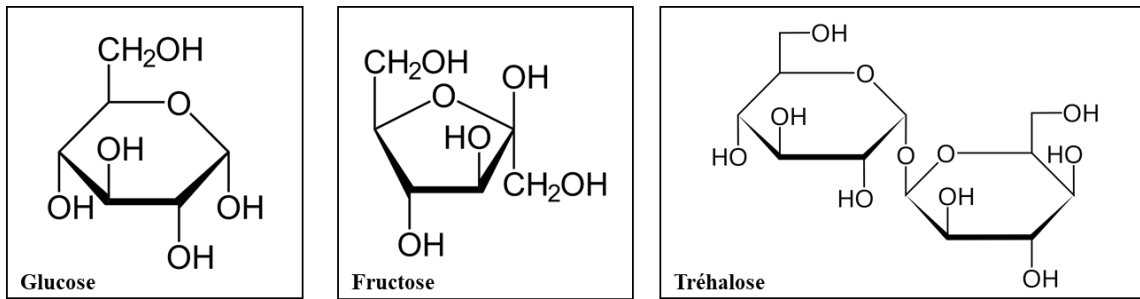


Figure 3. Forme moléculaire (projection de Haworth) des différents sucres circulant dans l'hémolymphe de l'abeille.

Le glucose et le fructose ont la même formule moléculaire, mais présentent une différente structure (isomères). Le tréhalose est composé de deux molécules de glucose. Images du domaine public.

Le vol demande une transition rapide du niveau métabolique. La concentration des sucres dans l'hémolymphe augmente pour favoriser la diffusion vers les cellules (47, 48). Lorsque les abeilles entament le vol, leur consommation d'oxygène augmente intensément, soit de 70 fois en un court intervalle de temps (47, 55). La concentration en glucose peut être maintenue durant 15 minutes ou sur 5,5 km lorsque le jabot de l'abeille est rempli de miel (15).

Les abeilles puisent leurs sources nutritionnelles des produits floraux : le pollen et le nectar (8). Le nectar des fleurs est la source alimentaire privilégiée de l'abeille parce qu'elle fournit les carbohydrates sous forme de sucres (glucose, fructose et sucrose) (8, 56). Le nectar est ensuite transformé en miel par la digestion dans le jabot. Les enzymes, comme l'alpha-glucoxydase et l'invertase, sécrétées par les glandes hypopharyngiennes, permettent de réduire les sucres en molécules simples et stables de glucose et de fructose (8, 56). La trophallaxie (transfert entre les ouvrières par régurgitation) participe également à la formation de miel (8, 13).

Après l'ingestion d'un repas, le glucose et le fructose du jabot sont mobilisés passivement aux intestins, absorbés dans l'hémolymphe et convertis en tréhalose dans le corps gras (47, 49, 50, 57). Ce processus d'absorption se réalise en 5 à 10 minutes (49, 50, 57). Les nutriments liquides et solides passent du jabot aux intestins en quelques minutes via la contraction du ventricule (48, 57). Des myostimulateurs, dont la neurohormone tachynine, permettent la contraction du ventricule (48). Ce flux de sucres digestifs dépend de la concentration en sucres dans l'hémolymphe (48).

La régulation du taux de sucres est spécifique à l'abeille (48). En effet, les abeilles seraient déficientes en deux enzymes de la gluconéogenèse : le glucose-6-phosphatase et le tréhalose-6-phosphate phosphatase (48, 58). Le glycogène est entreposé en quantité insuffisante dans les muscles et le corps adipeux pour répondre aux besoins de l'abeille (47, 50). Par conséquent, le glycogène stocké dans l'abeille ne permet qu'à subvenir à un vol parcouru sur 335 mètres (38). De plus, la synthèse de tréhalose par le corps gras n'est pas suffisante pour combler les besoins d'énergie (48). Les sucres accumulés dans le jabot et l'hémolymphe sont conséquemment plus importants pour les activités de l'abeille que ceux stockés dans les muscles et le corps adipeux (47, 48, 50).

Les hormones impliquées dans l'homéostasie des sucres ne sont pas encore bien connues (48, 59). Le *corpora cardiaca*, un organe neurosécréteur, sécréterait des neurohormones qui influencent la mobilisation des réserves énergétiques du corps gras (48). La concentration en hormone adipokinétique (AKH) est faible dans le cerveau des abeilles

comparativement aux autres insectes (49, 60). La neurohormone octopamine jouerait un rôle hyperglycémiant et maintiendrait l'homéostasie des sucres en augmentant l'appétit (prise de sucres) (49, 50, 52, 60, 61). Le contrôle de l'appétit serait influencé par le niveau de tréhalose, l'octopamine et l'âge de l'abeille (49, 61). Une mobilisation de tréhalose par le corps stimule la transition des sucres du proventricule vers les intestins (62). Une abeille plus âgée présenterait un niveau d'octopamine élevée de façon constante, donc elle régulerait son appétit en fonction de la concentration en tréhalose sérique reconnue par le cerveau (61).

La concentration en sucres sériques est très élevée chez les abeilles comparativement aux autres insectes (46, 51, 63) (**Tableau 1**). Les réserves libres dans l'hémolymphe sont importantes pour le métabolisme (64). Une concentration élevée en sucres dans l'hémolymphe serait une adaptation secondaire à une circulation inefficace des fluides dans le corps de l'abeille (53). Il existe aussi une certaine variabilité individuelle des concentrations en sucres sériques (47, 65). La concentration des sucres dans l'hémolymphe varie selon les besoins énergétiques, les saisons, le repas, le comportement, et le stress (parasitisme, manipulation expérimentale, etc.) (47, 56, 63).

Le tréhalose est le sucre dont la concentration fluctue le plus dans l'hémolymphe (61). Lorsqu'une activité métabolique est augmentée, les concentrations en sucres (tréhalose, fructose et glucose) augmentent, puis le tréhalose diminue graduellement parce que le corps gras synthétisant ce sucre ne peut combler les besoins énergétiques (51). La concentration moyenne du sucres dans l'hémolymphe correspond à 2% du volume chez les ouvrières et à 1,2% chez les faux bourdons (38).

Les valeurs de référence en tréhalose dans l'hémolymphe chez l'abeille ne sont pas établies et seraient très variables. Selon certaines études, la concentration en tréhalose varie de 5 mmol/L à 50 mmol/L, voire jusqu'à 100 mmol/L (43, 53, 56, 59, 66, 67) (**Tableau 1**).

Tableau 1. Concentrations en sucres (tréhalose, glucose et fructose) dans l'hémolymphe de l'abeille rapportées dans la littérature.

Sucre	Concentrations, mmol/L
Tréhalose	5 à 50, voire 100 (43, 53, 56, 59, 66, 67)
Glucose	11 à 80 (65, 66)
Fructose	11 à 80 (65, 66)

1.3.1.1 Tréhalose

Le tréhalose est composé de deux molécules de glucose (glucose-1-phosphate et glucose-6-phosphate) (44, 48, 52, 53). La liaison glycosidique alpha-(1-1) entre les deux glucoses rend la molécule de tréhalose très stable (53, 54).

Le tréhalose, le sucre plus important circulant dans l'hémolymphe chez l'abeille, est synthétisé à partir du glucose par le corps gras de l'abeille (48, 52, 53, 56). Cette synthèse se réalise grâce à deux enzymes : le tréhalose-6-phosphate synthase et le tréhalose-6-phosphate phosphatase (48, 52, 53, 56).

Le tréhalose est entreposé dans le corps gras et relâché dans l'hémolymphe sous forme de glucose, ce qui constitue alors la première source d'entreposage énergétique (48, 52, 56). Le tréhalose est une molécule hautement polarisée, ce qui la rend difficilement perméable à la membrane cellulaire (46). L'utilisation du tréhalose par les muscles nécessite alors une hydrolyse du tréhalose en glucose en utilisant une enzyme : la tréhalase (46, 53). Le transport du tréhalose du corps gras dans l'hémolymphe serait facilité par le *trehalose-transporter 1* (TRET1) (68). Le tréhalose peut également être présent dans les tubules de Malpighi, les ovaires et les muscles (59).

Les rôles du tréhalose sont multiples. Le tréhalose permet le stockage énergétique, la cryoprotection, la stabilisation des protéines lors de choc thermique ou osmotique et la régulation de l'appétit (53, 59). Le tréhalose influencerait également la lipolyse et le transport lipidique (52, 69).

La concentration en tréhalose varie selon l'âge, les repas et l'activité (56, 70). Lorsque les besoins métaboliques augmentent, le tréhalose est rapidement consommé ; il diminue rapidement après le vol (62, 71), où il tombe à son plus bas en raison d'une demande énergétique élevée, puis peut être régénérée lors du repos (56). La synthèse de tréhalose par le corps gras ne peut combler la consommation marquée en sucres, où il y a une augmentation rapide de la demande énergétique (47, 48). Lorsque le niveau métabolique augmente, la concentration en tréhalose baisse graduellement, associée à une augmentation du glucose et du fructose (53, 56, 57). Ainsi, la concentration en tréhalose dans l'hémolymphe est inversement proportionnelle à celle des autres sucres (53, 56, 57). D'autre part, la concentration en tréhalose et en glucose diminue de façon importante (environ 40% à 70%) après environ sept heures de jeûne et une activité sur 10 mètres (53, 66). La concentration en tréhalose augmente également à la suite d'un stress (71).

Les variations saisonnières seraient plutôt secondaires aux activités de l'abeille : le niveau de tréhalose sérique est plus élevé en automne qu'au printemps, parce que l'abeille butine davantage au printemps (56).

1.3.1.2 Tréhalase

La tréhalase est une isoenzyme qui permet l'hydrolyse du tréhalose en deux molécules de glucose (53, 72, 73). La tréhalase régule la concentration en tréhalose dans l'hémolymphe (71). De cette façon, la tréhalase contribue à l'homéostasie et au maintien du métabolisme (53, 71). Le tout varie en fonction de l'environnement (53, 71). L'hydrolyse du tréhalose permet l'entrée du glucose dans les cellules pour être synthétisé à nouveau en tréhalose ou pour être utilisé comme combustible (71, 72).

La tréhalase de l'insecte existe sous deux formes (71). La forme soluble (Tre-1) est libre dans l'hémolymphe, les cellules caliciformes intestinales et l'œuf (71, 72, 74-76). La forme liée (Tre-2) est présente sur la membrane cellulaire des tissus (muscles et intestins), possiblement à la face externe, pour l'accès direct à l'hémolymphe (71, 72, 74-76).

La tréhalase joue un rôle métabolique énergétique et développemental chez l'abeille (59, 71, 72). Plus précisément, l'enzyme soutient le vol par le catabolisme du tréhalose, la régulation de la synthèse de la chitine (composante du corps de l'abeille) et la résistance au stress abiotique (eau, température, oxygène, toxines) (71).

1.3.1.3 Glucose et fructose

Le glucose et le fructose sont des sucres simples isomères résultant de la digestion du nectar (8, 56). Les deux sucres présentent la même formule moléculaire, mais une structure différente. Ces molécules sont directement assimilées par les cellules du corps de l'insecte pour le métabolisme énergétique (71). Le fructose est métabolisé en glucose par l'hexokinase et la phosphoglucoisomérase pour être utilisé par l'organisme ou entreposé dans le corps gras (47, 49).

La concentration sérique en glucose et en fructose varie de 11 à 80 mmol/L (65, 66) (**Tableau 1**). Les concentrations en glucose et en fructose dans l'hémolymphe sont donc plus faibles que celles du tréhalose (44) (**Tableau 1**).

La concentration en glucose et en fructose dans l'hémolymphe varie selon les conditions expérimentales et les activités de l'abeille (47, 56). Par exemple, la concentration en glucose et en fructose augmente lors du butinage en raison de la collecte du nectar (56). Donc, la concentration en glucose serait alors plus faible à l'automne, en raison d'une moins grande activité de butinage (56). Une faible concentration en glucose indique une abeille affamée avec un jabot vide (57). L'anesthésie au dioxyde de carbone sur une courte période (5 secondes) diminuerait respectivement de 50% et 80% la concentration en

glucose et en fructose d'une abeille jeûnée (50, 51). En effet, l'anesthésie diminue le taux métabolique (50, 51).

1.4 Corps gras

Le corps gras est un organe essentiel à la vie des insectes et souvent comparé au foie des mammifères (13, 24). Les connaissances sur cet organe se sont approfondies à partir de données basées principalement sur les mouches à fruits (*Drosophila melanogaster*) (24, 33).

1.4.1 Distribution du corps gras chez l'abeille

Le corps gras est distribué à travers le corps de l'abeille. Cet organe se retrouve principalement dans l'abdomen sous deux formes : viscérale (autour des organes) et pariétale (près de la paroi) (15, 77) (**Figure 4**). Les cellules sont d'ailleurs plus abondantes près des glandes cirières (78). La surface du corps gras est en contact étroit avec l'hémolymphe et juxtaposé au système digestif, ce qui maximise l'exposition aux échanges métaboliques (24, 46).

Étant donné que les cellules du corps gras ne renferment pas seulement des lipides, celles-ci ne correspondent pas aux adipocytes des mammifères. (13, 77). Aussi, l'origine embryonnaire du corps gras est le mésoderme (46, 77, 79), tandis que celui du foie est l'endoderme et celui des adipocytes est le mésoderme (**Tableau 2**). Alors, le corps gras ne serait pas l'équivalent du foie du mammifère pour ses origines, mais ses fonctions.

1.4.2 Rôles du corps gras chez l'abeille

Le corps gras joue de multiples fonctions métaboliques (**Tableau 2**) comme la réserve nutritionnelle, la synthèse de plusieurs molécules (protéines, lipides, glycogène et tréhalose), la détoxification et l'immunité innée (15, 33, 44, 52, 80).

Le rôle de cet organe varie selon la localisation corporelle et l'âge de l'insecte (46, 52). Le corps gras abdominal est biologiquement actif, tandis que le corps gras viscéral sert davantage de réserves nutritionnelles (24), or chez l'abeille adulte, les cellules du corps gras sont surtout situées près de la paroi abdominale (78). La proportion corporelle du corps gras est plus élevée chez les larves et les pupes (77, 78). Chez les jeunes insectes, le corps gras permet l'accumulation de réserves (24), alors que l'activité biologique du corps gras augmente chez l'adulte (24).

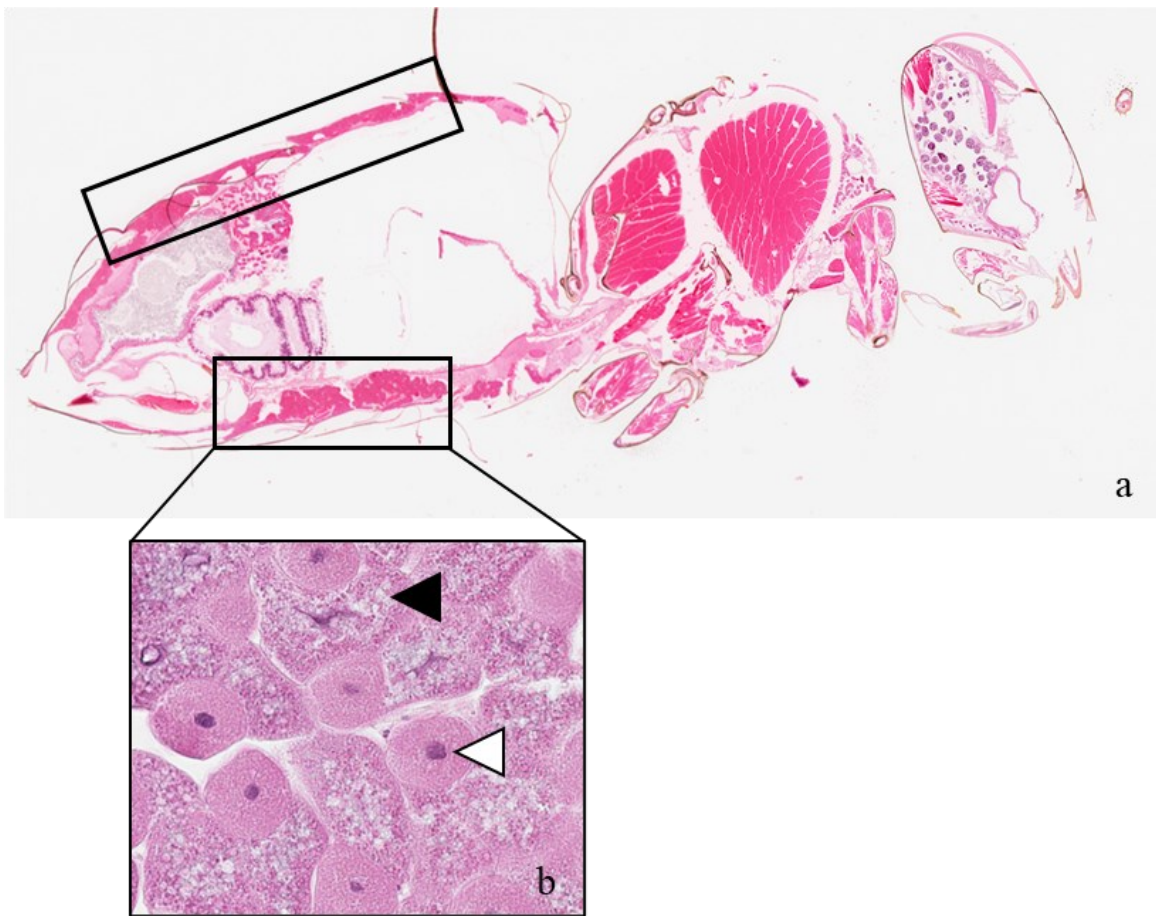


Figure 4. Corps gras de l'abeille.

(a) Abeille en histologie (10x), coloration HEPS. Le corps gras de l'abeille est distribué dans l'abdomen, près de la paroi et sous la cuticule, majoritairement en partie dorsale et ventrale (encadrés noirs). **(b)** Agrandissement du corps gras en histologie (400x). Le corps gras est composé de deux types de cellules : les trophocytes (pointe de flèche noire) et les oenocytes (pointe de flèche blanche).

La majorité des protéines sont synthétisées par le corps gras, incluant la vitellogénine et les protéines plasmatiques (33, 44). La vitellogénine constitue 70-90% des protéines synthétisées par le corps gras (24, 77). La vitellogénine participe au développement et au comportement des abeilles ainsi qu'à la production d'œufs par la reine (24, 33, 44, 77) (**1.2.2.1 Vitellogénine**). Les protéines plasmatiques synthétisées par le corps gras circulent dans l'hémolymphe et font partie intégrante des structures de l'épiderme et des hémocytes (24, 44, 55, 81).

Le corps gras est un site de détoxification grâce la présence d'enzymes comme les cytochromes P450 et les estérases (33). Les cellules du corps gras participent à l'immunité en synthétisant des peptides antimicrobiens, dont certains aident à la phagocytose des hémocytes (33, 46).

Le corps gras est la cible de plusieurs hormones et contribue à la régulation métabolique (24). Les cellules de l'organe sont alors sous le contrôle de l'hormone juvénile et des nutriments comme le glucose (24, 33, 44, 52, 77). Plus précisément, l'hormone juvénile régule la production de vitellogénine par le corps gras (46) (**1.2.2.2 Hormone juvénile III**).

1.4.3 Cellules composant le corps gras

Le corps gras est un organe complexe composé majoritairement de trophocytes (77) (**Figure 4**). Ces cellules accumulent des vacuoles lipidiques (triglycérides) entourées par des granules de sucres et/ou de protéines (13, 33, 46, 52, 77, 81, 82). Les trophocytes peuvent également se différencier en cellules spécialisées : en urocytes, chromatocytes ou mycetocytes (24)

1.4.4 Oenocytes

Les oenocytes sont des cellules sécrétrices qui dérivent de l'ectoderme (77). Les oenocytes sont associées au corps gras et observées à tous les stades de vie de l'abeille (77, 78, 83). Chez l'abeille, les oenocytes sont localisées dans le corps gras pariétal, surtout autour des glandes cirières des ouvrières. (83) (**Figure 4**). Des oenocytes peuvent également se retrouver en petits amas dans la tête de l'abeille et près du mandibule (83).

Le rôle exact des oenocytes demeure à être clarifié. (77, 83, 84) (**Tableau 2**). Les oenocytes sont comparées aux hépatocytes des mammifères (81, 84). Chez l'abeille, les oenocytes accumulent davantage des gouttelettes lipidiques en jeûne, pouvant s'apparenter à une stéatose (84). Les oenocytes produiraient les composantes lipidiques de la cuticule et de la cire, ainsi que la partie hydrocarbonée des phéromones (46, 80, 83-85).

Tableau 2. Comparaison du corps gras de l'insecte ainsi avec le foie et les adipocytes des mammifères.

Organe	Classe	Fonctions		Origine embryonnaire
Corps gras	I	<u>Trophocytes</u>	<u>Oenocytes</u>	T : Mésoderme (46, 77, 79) O : Ectoderme (77)
		1. Réserve nutritionnelle (13, 33, 46, 52, 77, 81, 82) <ul style="list-style-type: none"> • Vitellogénine (Granules) • Lipides (Vacuoles de triglycérides) • Sucres (Granules) 2. Synthèse (24, 33, 44, 77) <ul style="list-style-type: none"> • Protéines 	1. Mal identifiée (77, 83, 84) 2. Sécrétion (46, 80, 83-85) <ul style="list-style-type: none"> • Lipides (Cuticule) • Cire • Phéromone 3. Stéatose	

		<ul style="list-style-type: none"> • Lipides • Sucres <p>3. Détoxification (33)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Cytochrome P450 • Estérases <p>4. Immunité innée (33, 46)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Peptides antimicrobiens 	
Foie	M	<p>1. Métabolisme (86)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Digestion des nutriments • Conversion et inactivation/détoxification (Hormones, médicaments, toxines) <p>2. Synthèse (86)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Bile et ses pigments (digestion du gras), Protéines plasmatiques • Facteurs de coagulation • Cholestérol 	Ectoderme
Adipocytes	M	<p>1. Entreposage énergétique (86)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Triglycérides • Réduction de perte de chaleur 	Mésoderme

I : Insecte
M : Mammifère
T : Trophocytes
O : Oenocytes

L'interaction entre les trophocytes et les oenocytes mérite d'être mieux étudiée (84). Cette relation se comparerait à celle entre les hépatocytes et adipocytes des mammifères (84). D'ailleurs, la proportion de trophocytes et d'oenocytes varie selon l'âge de l'insecte (24).

1.5 Système immunitaire

Les abeilles peuvent être infectées par plusieurs agents pathogènes, comme des parasites, des bactéries, des champignons et des virus (87). Ces agents infectieux occasionnent un stress et modulent le système immunitaire (87).

L'immunité de l'abeille s'observe sur deux niveaux : individuelle et populationnelle (88). Une particularité est à considérer lorsqu'il s'agit d'insectes sociaux : les agents infectieux se transmettent rapidement au sein d'une colonie. De plus, il est possible que les abeilles adultes infectées se sacrifient pour sauver la colonie (87). Les abeilles présentent une immunosénescence selon les castes; ainsi, les butineuses ont une perte d'immunité (87, 89). L'augmentation du titre d'hormone juvénile durant la transition de l'ouvrière nourrice en butineuse provoque la mort des hémocytes via l'apoptose (26, 89, 90).

1.5.1 Immunité individuelle

Sur le plan individuel, les défenses initiales de l'abeille sont les barrières physiques comme le système tégumentaire et le système digestif (91). Le système immunitaire inné des insectes est bien développé, mais ils ne possèdent pas d'immunité acquise (mémoire immunologique et production d'anticorps) (91). L'immunité innée commence par une reconnaissance suivie par un processus de défense contre un agent inconnu (91). L'immunité individuelle des abeilles est similaire au système inné des mammifères (87). L'immunité se divise en immunité cellulaire et humorale (87).

1.5.1.1 Immunité humorale

L'immunité innée humorale comprend différents mécanismes comme les peptides antimicrobiens, la coagulation et la mélanisation (91). La reconnaissance des motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs), comme des peptidoglycanes protéiques, active quatre voies de signalisation : *Toll*, *imd*, *Jak/STAT*, *Jnk* (6, 92). Il s'ensuit une

transcription de gènes de peptides antimicrobiens (91-93). Deux peptides antimicrobiens riches en proline ont été détectés chez les abeilles : l'apidaecin et l'abaecin (94, 95).

L'activité de la phénoloxidasase est un processus immunitaire inné important dans l'hémolymphe des insectes (96) (**Figure 5**). La phénoloxidasase est une enzyme impliquée dans la mélanisation, un processus qui noircit l'hémolymphe exposée à l'air (44, 97, 98) (**Figure 5**). Le zymogène prophenoloxidasase est contenu dans les hémocytes (44) (**Figure 5**). Une cascade de coagulation, une l'altération des propriétés de l'hémolymphe (pH, calcium) ou la reconnaissance d'un pathogène provoque le clivage protéolytique du prophenoloxidasase (44, 97, 98) (**Figure 5**). Le clivage protéolytique par des protéases active la prophenoloxidasase à un site d'infection ou de plaie (44, 97, 98) (**Figure 5**). Il s'ensuit alors une oxydoréduction de la molécule de phénol en quinone, qui est toxique (44, 96-98) (**Figure 5**). Les molécules de quinone se polymérisent et forment un pigment de mélanine (97). Le tout permet d'encapsuler un pathogène (97) (**Figure 5**). L'encapsulation du pathogène bloque son absorption de nutriments; en parallèle, il se produit un relâche de produits cytotoxiques contre le pathogène (44, 93, 97).

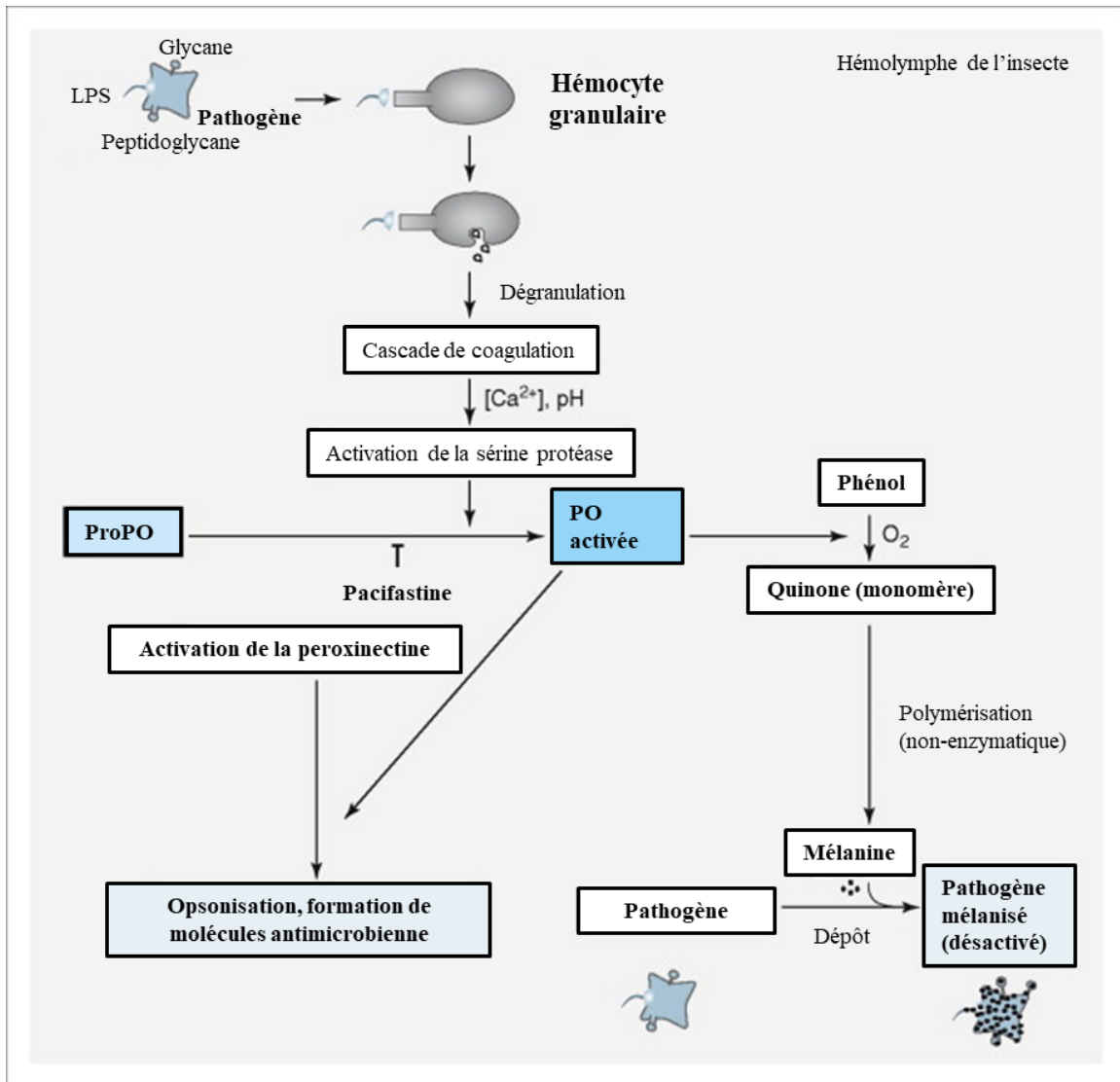


Figure 5. Processus immunitaire de mélanisation dans l'hémolymphe de l'insecte. La phénoloxidasé (PO) est un enzyme clé, qui se présente sous forme inactive de prophénoloxidasé (ProPO). Le clivage protéolytique de ProPO active PO. Une oxydoréduction du phénol en quinone s'ensuit. Les molécules de quinone se polymérisent pour former un pigment de mélanine. La mélanine se dépose sur un pathogène pour l'encapsuler. Figure adaptée avec la permission de Saunders *et al.*, 2006 © (98).

1.5.1.2 Immunité cellulaire

L'immunité cellulaire, constituée des hémocytes, est une composante centrale de défense chez les abeilles (87). Le contrôle de la réponse immunitaire cellulaire des insectes mérite d'être davantage étudié (91). Les hémocytes sont des cellules circulatoires de l'hémolymphe, qui s'apparentent aux leucocytes (44, 99). Les hémocytes peuvent être libres dans l'hémolymphe ou attachés à la surface des tissus (44).

Les hémocytes jouent différentes fonctions comme la phagocytose, la nodulation, l'encapsulation, la coagulation, la mélanisation, ainsi que le stockage et la distribution de nutriments (13, 43, 44, 87, 91, 99).

La classification des hémocytes n'est pas encore unanimement acceptée dans la communauté scientifique (100). Différents types d'hémocytes existent, mais varient selon les espèces (44). Ces types d'hémocytes sont généralement classés selon leur morphologie, leur fonction et leurs réactions aux colorations spéciales et immunohistochimiques (100). Ainsi, les connaissances précises sur les types, les proportions et les fonctions des hémocytes chez l'abeille sont limitées (87).

Globalement, sept types d'hémocytes d'insectes sont rapportés dans la littérature (**Tableau 3**); les prohémocytes, les plasmatocytes, les granulocytes, les sphérulocytes, les adipohémocytes, les oenocytoïdes et les coagulocytes (91, 100). Une fonction phagocytaire a été décelée chez deux types d'hémocytes, soit les plasmocytoses et les granulocytes (91). Les prohémocytes sont des cellules précurseurs rondes et petites (44). Les plasmatocytes prennent des formes et des tailles variables (44, 100). Les hémocytes granulaires sont larges et contiennent des granules cytoplasmiques pour la défense (44, 100). Les sphérulocytes sont ronds à ovales et contiennent de grandes granules composées de mucopolysaccharides (44, 100). Les oenocytoïdes produisent la prophenoloxidase, zymogène de la mélanisation (44). D'autres classifications existent, comme les adipohémocytes avec des granules positives à la coloration PAS, et les coagulocytes (43, 100).

Tableau 3. Résumé des connaissances sur les hémocytes connus chez les insectes de l'ordre des Hymenoptera.

Type d'hémocyte (91, 100)	Fonctions ou informations connues
Prohémocyte	<ul style="list-style-type: none"> • Précurseurs de tous les hémocytes (44, 101) • Encapsulation (44)
Plasmatocyte *, **	<ul style="list-style-type: none"> • Phagocytose (91) • Coagulation (91) • Production de réactifs oxydatifs (102)
Granulocyte *, *** Le plus commun chez les insectes (103)	<ul style="list-style-type: none"> • Phagocytose (91, 103) • Granules intracytoplasmiques (exemple : peptides antimicrobiens) (44, 100, 101) • Production de réactifs oxydatifs (102) • Encapsulation (44, 103)
Sphérulocyte	<ul style="list-style-type: none"> • Granules de mucopolysaccharides (44, 100, 103) • Présents dans les composantes cuticulaires (103)
Adipohémocyte	<ul style="list-style-type: none"> • Granules positives à la coloration PAS (100)
Oenocytoïde	<ul style="list-style-type: none"> • Production de la prophenoloxidase (zymogène de la mélanisation) (43) • Non adhésif (103) • À déterminer (101)
Coagulocyte	<ul style="list-style-type: none"> • Ressemblance aux granulocytes (100)

* Présents à tous les stades de l'abeille (102)

** Plus abondant chez l'adulte à l'émergence (102)

*** Plus abondant chez la larve (102)

1.5.2 Immunité populationnelle

Des mécanismes de défense au sein d'une ruche sont également reconnus et spécifiques à des agents infectieux comme *Varroa destructor* : le comportement de toilettage et hygiénique sensible à varroa (104, 105). Le toilettage est un ensemble de comportements efficaces utilisés par l'abeille elle-même (auto-toilettage) ou par une autre abeille (allo-toilettage) pour retirer varroa (92, 105, 106). Le comportement hygiénique sensible à varroa est une composante immunitaire particulière qui permet aux abeilles de reconnaître un couvain infesté par varroa pour le retirer de la colonie (105, 107, 108). En revanche, le stimulus permettant de sélectionner le couvain infesté demeure à être clarifié (105). Ces comportements sont mieux exprimés chez l'abeille asiatique *Apis cerana* que chez l'abeille européenne *Apis mellifera* (92).

2. Agents pathogènes rencontrés chez l'abeille

2.1 *Varroa destructor*

2.1.1 Généralités

Varroa destructor est un des parasites les plus néfastes et plus souvent rapportés pour causer des mortalités chez l'abeille mellifère (107). Les connaissances concernant ce parasite externe sont en constante évolution (107). De plus, *Varroa destructor* développe des résistances aux traitements acaricides utilisés par les apiculteurs, ce qui change constamment la gestion et la compréhension de ce parasite (107).

Varroa destructor est une espèce faisant partie de la classe des *Arachnides*, de l'ordre *Mesostigmata*, de la famille *Varroidae* et du genre *Varroa*. Le genre *Varroa* a été établi dès 1904 par Marcus Terentius Varro en Indonésie (109). L'espèce *Varroa destructor* a été découverte en 2000 par Anderson et Trueman (110), auparavant confondue avec l'espèce *Varroa jacobsoni*. Il existe différentes espèces, incluant *Varroa jacobsoni*, *underwoodi*,

rindereri et *wongsirii*, mais *Varroa destructor* constitue la seule espèce ayant un impact économique mondial (111).

2.1.2 Évolution

Varroa jacobsoni est un acarien qui a été pour la première fois décrit en Asie (110). Son hôte naturel est l'abeille asiatique, *Apis cerana* (110). *Varroa jacobsoni* aurait conservé son tropisme pour *Apis cerana* en raison de son isolation géographique naturelle (6). Une cohabitation écologique équilibrée et stable s'est alors établie entre *Varroa jacobsoni* et *Apis cerana* (6, 107, 112). Ainsi, l'abeille asiatique infestée présente peu de changements, avec une population parasitaire demeurant faible au sein de ses colonies (6, 107, 112). *Apis cerana* est une espèce d'abeille qui est très proche de *Apis mellifera* sur l'aspect physiologique et comportemental (107).

Varroa jacobsoni a ensuite fait une transition d'hôte pour infecter l'abeille européenne, *Apis mellifera* (110). Entre 1940 et 1960, *Varroa jacobsoni* a été identifiée pour la première fois en Corée sur l'abeille *Apis mellifera*, en raison d'importation d'abeilles plus productives (*Apis mellifera*) et, possiblement, de transport de matériel et d'apiculteurs infestés (6, 107, 112). *Varroa* a donc commencé à parasiter *Apis mellifera* lorsque cette espèce d'abeille, plus productive, a été introduite en Asie (110, 113). La transition d'hôte a alors permis à *Varroa jacobsoni* d'évoluer rapidement en *Varroa destructor* (107). L'évolution de *Varroa destructor* associée à *Apis mellifera* est donc récente et moins comprise, mais la transition d'hôte (de *Apis cerana* à *mellifera*) semble s'être réalisée au moins à deux reprises (105, 107, 114, 115). Depuis, *Varroa destructor* continue d'évoluer parallèlement à *Varroa jacobsoni*.

La transition d'hôte correspond aux deux haplotypes mitochondriaux identifiés : la souche coréenne, la plus fréquente, et la souche japonaise (111, 115, 116). Ainsi, vers la moitié du 20^e siècle, *Varroa* s'est répandu sur tous les continents par des transmissions naturelles et par les échanges commerciaux (6, 107, 112). Il a été détecté pour la première fois au

Canada en 1989 (107). Certaines régions comme l'île de Man et Terre-Neuve demeurent exemptes de varroa à ce jour (107).

2.1.3 Anatomie

Varroa destructor est un arachnide et possède huit pattes (**Figure 6**). Les quatre paires de pattes sont courtes et près du gnathostome. Les pattes ne servent pas qu'à la mobilité, et s'apparentent aux antennes des insectes (111). Les premières paires de pattes joueraient un rôle sensoriel olfactif et gustatif et lui permettent de grimper et monter sur l'abeille (6). Les trois autres paires servent au déplacement (6). Les pattes antérieures constituent un organe d'olfaction avec une identification de transcriptions compatibles à des chémorécepteurs (5, 111, 117), présents sur le *palptarsus* (111, 118) (**Figure 6**).

Les adultes présentent un dimorphisme sexuel (6) (**Figure 6**). La femelle adulte est reconnaissable par son corps rougeâtre à brunâtre, ovale et aplati (**Figure 6**). Le corps de varroa adulte (femelle) mesure environ 1,5-2 mm de largeur et 1-1,8 mm de longueur (107) (**Figure 6**). Son corps est aplati à l'aspect dorsoventral et se divise en deux parties : *gnathosoma* (partie antérieure, mâchoire) et *idiosoma* (partie postérieure, corps) (6, 107, 119) (**Figure 6**). Son *idiosoma* est rigide, ce qui l'empêche d'emmagasiner un grand volume de liquide (80, 119). L'*idiosoma* comprend une membrane dorsale et ventral flexibles qui peuvent se dilater lors de la prise de repas et de l'accouplement (6). Le *gnathosoma*, avec l'aide de deux dents du segment distal du *chelicerae*, est composé d'une cavité orale qui permet de percer la cuticule de l'abeille (6, 120). Varroa vit dans l'ombre au fond de la ruche sur l'abeille ; il est aveugle (107). Le corps du mâle est sphérique et jaunâtre, et mesure 0.75 mm x 0.70 mm, donc plus petit que la femelle (**Figure 6**).

Les poils sur la surface de varroa (parties buccales et pattes antérieures) contiennent des chémorécepteurs et des mécanorécepteurs (6, 111, 121) (**Figure 6**).

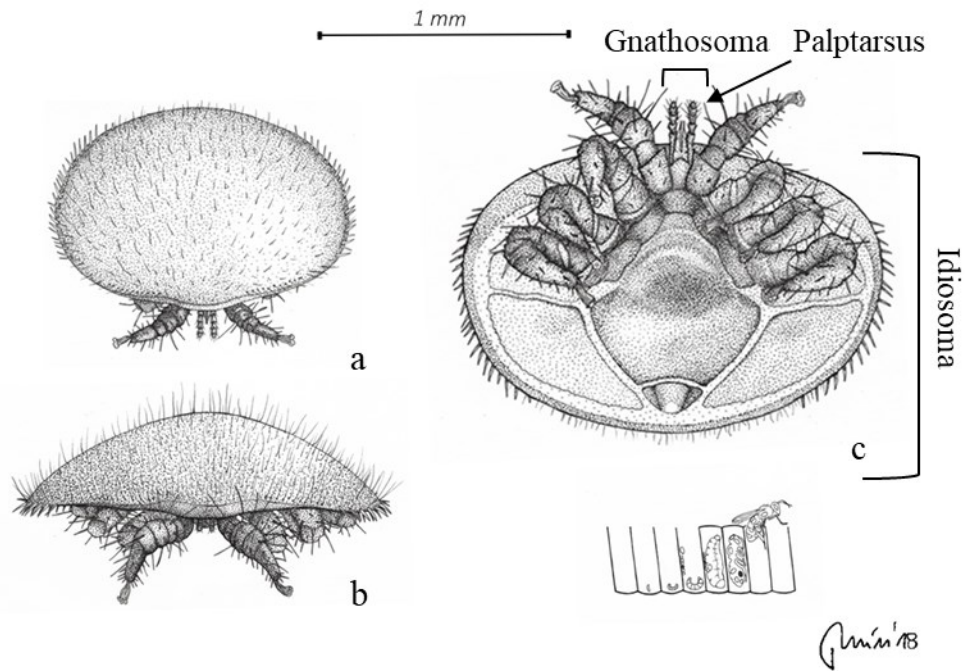


Figure 6. Anatomie de *Varroa destructor*; aspect dorsal (a), de face (b) et ventral (c). Illustration de Benjamín De Andrés Cuesta, sous le respect de la licence CC.

Le système digestif de *Varroa destructor* est adapté à celui d'un acarien parasite, avec une digestion extraorale (80). Son tube digestif est simple, avec peu d'activité protéolytique (80, 122). Ses gnathostomes sont composés de stylets salivaires proéminents qui peuvent sécréter de la salive qui se mélange avec le tissu de l'abeille (80, 120). L'analyse des excréments suggère une diète riche en protéine, surtout en guanine (123, 124). Il a été démontré que l'acarien se nourrit des cellules de son hôte (majoritairement son corps gras entremêlé avec de l'hémolymphe et matériel prédigéré) (80, 122, 123). Les glandes salivaires sont bien développées et sécrètent des enzymes comme des estérases, pouvant métaboliser des substrats exogènes (acaricides) et endogènes (123, 125).

2.1.4 Cycle de vie

Le cycle de vie de *Varroa destructor* est dépendant de celui l'abeille (6, 112). *Varroa* passe à travers différentes phases de vie : l'œuf, la protonympe, la deutonympe, la préadulte

et l'adulte (6) (**Figure 7**). Le cycle de vie de l'acarien femelle est constitué de deux phases: la phase phorétique (sur les abeilles adultes) et la phase reproductive (sur les nymphes) (5, 6, 112) (**Figure 8**). Varroa peut donc infecter l'abeille en développement et en phase adulte. (88, 112) (**Figure 8**). L'acarien doit changer d'hôte entre les deux phases, ce qui implique qu'elle infecte la colonie entière (113). Le mâle ne sert qu'à la reproduction : il a une courte espérance de vie et il ne vit que dans l'alvéole operculée (6, 111). Il meurt lors de l'éclosion de la jeune abeille infestée (6).

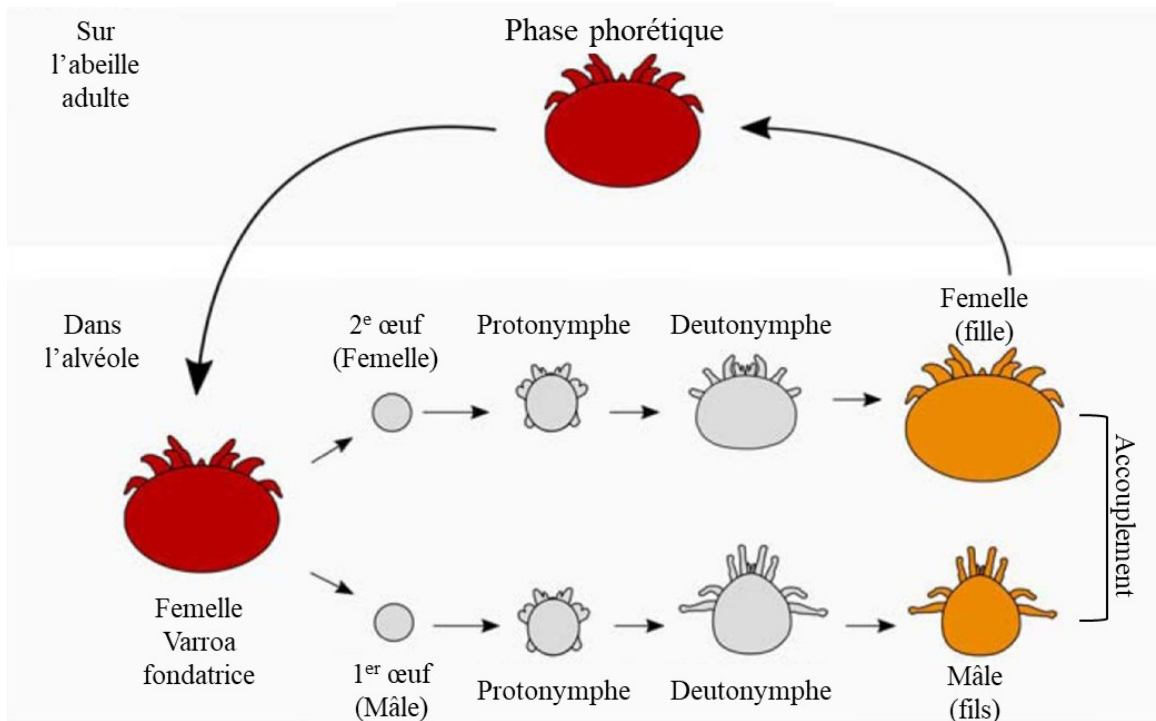


Figure 7. Les différentes phases de la vie de varroa : œuf, protonympe, deutonympe, préadulte et adulte. Un dimorphisme sexuel est visible en forme adulte. Figure adaptée de McAfee A et al., 2017 (126), sous le respect de la licence CC.

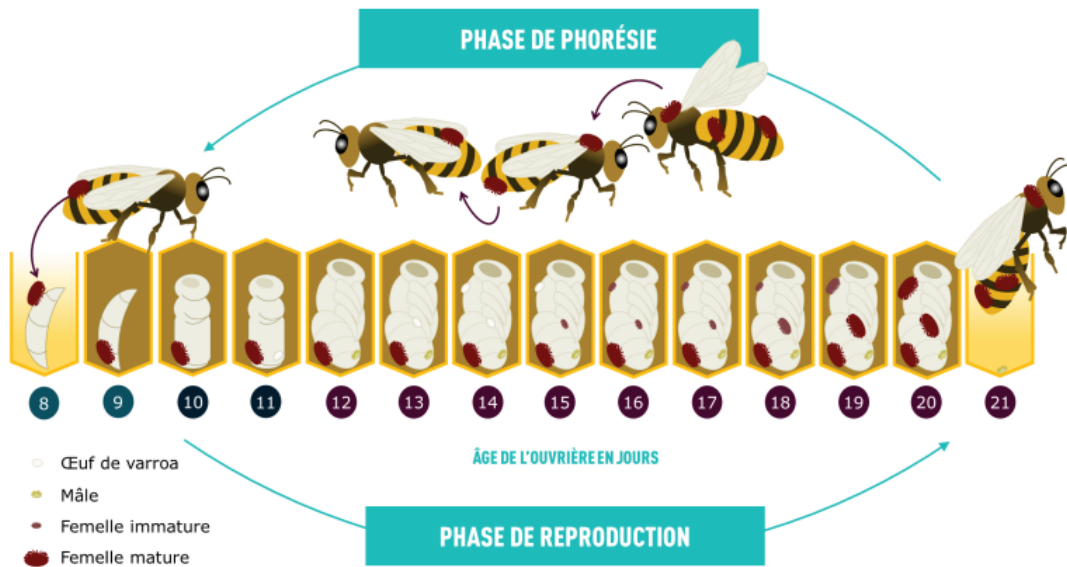


Figure 8. Le cycle de vie de varroa se divise en deux phases : phase phorétique et reproductive. La femelle varroa est attachée à l’abeille adulte durant la phase phorétique. La reproduction de varroa se déroule dans l’alvéole operculé. Source MAPAQ, sous permission.

2.1.4.1 Phase reproductive

La femelle est la seule pouvant vivre sur les abeilles adultes (6). La phase reproductive assure la production d’une génération d’acariens (107). La reproduction de *Varroa destructor* ne peut s’effectuer que dans l’alvéole (112). La femelle peut se reproduire deux à trois fois au courant de leur vie (5, 6). La reproduction se déroule dans l’alvéole operculée de l’abeille en développement (immature) (107). La femelle *Varroa destructor* s’attache préalablement à une jeune abeille (surtout une nourrice) pour augmenter son exposition au couvain (107). Cette phase débute lorsque la femelle entre dans une alvéole renfermant une larve prénymphe, 5^e phase larvaire, approximativement 15 heures avant son operculation (5, 107, 115). L’acarien femelle se déplace alors de l’abeille (nourrice) vers l’alvéole contenant une larve d’abeille (6, 107, 112, 127) (**Figure 8**).

L’invasion de l’alvéole par varroa est influencée par la distance entre la paroi alvéolaire et la larve (128) et la composition de l’alimentation larvaire en acide gras estérifié (acide 2-

hydroxyhexanoïque) (129). Après ce mouvement rapide (en moins d'une minute) et d'une courte distance, la femelle se faufile au fond de l'alvéole, entre la gelée nourricière et la paroi alvéolaire (6, 107, 112, 127). Il est intéressant de noter que plus d'une femelle peuvent se retrouver dans l'alvéole (6, 112). Varroa perce la cuticule de la larve, à l'aspect abdominal, avant l'operculation de l'alvéole (115).

Au moment où l'abeille ouvrière scelle l'alvéole avec de la cire, la nourriture fournie pour la larve est complètement consommée et la métamorphose (nymphe) commence ; c'est à ce moment que l'acarien commence à se nourrir de l'abeille (107). La femelle varroa pond son premier œuf 70 heures après l'operculation sans besoin d'être accouplée (5, 107). Ce premier œuf est haploïde et est un mâle (6). Les œufs suivants (jusqu'à 5 dans le couvain d'ouvrière et 6 pour le couvain mâle) pondus aux 30 heures sont fertilisés et diploïdes, c'est-à-dire des femelles (6, 107, 111, 130). L'ontogenèse dure 6,6 jours pour la femelle et 5,8 jours pour le mâle (6). Le développement des œufs est influencé par la température, généralement entre 31-37°C (6).

Le mâle et les femelles varroa mûrissent, en passant du stade larvaire à nymphaire (107) (**Figure 7**). Le mâle est le premier à atteindre sa maturité sexuelle (111). La forme immature de l'acarien est mobile et se nourrit de la nymphe mellifère par la cuticule préalablement percée par la mère (6). Le nombre de femelles pondues pouvant atteindre une maturité est d'environ trois (131). Tout au long de la phase reproductive, les varroas (mère et progéniture) accumulent des fèces au fond de l'alvéole (107). Le mâle adulte s'accouple avec les femelles adultes (sœurs) au site d'accumulation fécale (107), le tout est stimulé par des kairomones (112). De multiples accouplements sont nécessaires (111). Le nombre moyen de progénitures survivantes durant les cinq premiers cycles est de quatre (130).

Le cycle de reproduction du faux bourdon est d'environ 24 jours, tandis que celui de la femelle ouvrière est de 21 jours (8). Étant donné que la métamorphose des faux bourdons prend environ 3,5 jours de plus que chez les femelles, le mâle est ainsi un candidat potentiel pour la reproduction de varroa (132). En effet, le nombre d'œufs est plus élevé dans un

couvain mâle que femelle. D'ailleurs, le taux de reproduction est environ deux fois plus élevé chez le faux bourdon que chez les ouvrières (6). Le taux d'infestation est également plus grand chez les mâles (111, 133). Par ailleurs, *Varroa jacobsoni* infecte seulement le faux bourdon de *Apis cerana* (107).

Les larves de reines ne sont pas un choix optimal pour la reproduction de varroa, en raison de l'effet répulsif de la gelée royale (111, 134) et de la courte durée du cycle de développement pour cette caste.

2.1.4.2 Phase phorétique

La phase phorétique correspond à la période durant laquelle la femelle est attachée à l'abeille adulte et se nourrit de son corps gras (6, 80) (**Figure 8** et **Figure 9**). Cette phase commence lors de l'éclosion de la jeune abeille (**Figure 8**). Après la métamorphose, la jeune abeille adulte éclot et les varroa femelles (la mère et ses filles) sont attachées à leur hôte, tandis que le mâle et les autres femelles immatures demeurant dans l'alvéole seront nettoyés par les abeilles (107). Compte tenu que varroa infeste l'abeille adulte, cette phase devrait s'appeler dispersante plutôt que phorétique, terme qui ne sous-entend aucune invasion de son hôte (107). Varroa s'insère entre deux sternites (plaques) d'exosquelettes abdominaux d'une abeille, et le plus souvent, ventralement sur l'abeille (107, 111, 135). Varroa perce la peau de son hôte et s'y nourrit par aspiration (115). Après l'éclosion de la jeune abeille, varroa change d'hôte pour infester une nourrice (111, 136).



Figure 9. Deux acariens *Varroa destructor* en phase phorétique attachés sur l'abdomen d'une abeille.

Photo prise par AbsoluteFolly, sous le respect de la licence CC.

Durant la phase phorétique, il y a une dispersion de l'acarien par voie horizontale au sein de la ruche et éventuellement dans d'autres ruches (6, 107). Une infection d'abeilles s'effectue par contact étroit, en affectant principalement les nourrices âgées de 12 à 14 jours (5, 6). D'après Cervo *et al.*, lors d'un taux d'infestation léger à modéré, varroa a tendance à infester des jeunes abeilles ouvrières demeurant au sein de la ruche (107, 137). En ayant une proximité au couvain, cela augmente ses chances de reproduction. Varroa change d'hôte lorsque le taux d'infestation est élevé; en sélectionnant de plus vieilles abeilles (gardiennes et butineuses) (107, 137), permettant une transmission entre colonies d'abeilles (6). Globalement, la phase phorétique dure une dizaine de jours en été, mais peut durer plusieurs mois en hiver (40, 80, 138) (**Figure 8**). La phase phorétique se termine quand la femelle varroa s'incruste dans une alvéole (5) (**Figure 8**). Par conséquent, cela déclenche un nouveau cycle de reproduction (5).

Durant la phase phorétique, varroa peut se transmettre au sein de la colonie ainsi qu'entre elles (107). Une transmission horizontale entre les colonies peut subvenir lors de dérive, du passage de faux bourdons, de pillage et du butinage (39, 107, 139). Une transmission d'acariens chez les ruches voisines dans un même rucher est observée lorsqu'une colonie est fortement infestée (140). Une transmission verticale pourrait être s'observer lors d'essaimage (39, 107). Pettis *et al.* ont aussi rapporté une présence de varroa sur des fleurs importées des Pays-Bas et des États-Unis (141). Varroa pourrait survivre jusqu'à six jours sur les fleurs (142). D'ailleurs, Peck *et al.* ont démontré que l'acarien posé sur une fleur peut monter sur une abeille butineuse en deux secondes (139). L'apiculteur peut aussi participer à la transmission d'acariens entre les colonies si les pratiques d'élevages sont inadéquates (distance rapprochée des ruches et manque de biosécurité) (107).

2.1.4.3 Sélection de son hôte

Étant donné que l'acarien est aveugle, il choisit son hôte et interagit avec celui-ci par le biais des signaux chimiques : les phéromones (intraspécifique) et les kairomones (interspécifique) (80, 111, 115, 143). Le varroa femelle est attiré par la cuticule de l'abeille (111). La sélection de son hôte se base sur la composition d'hydrocarbures de la cuticule de l'abeille, qui est spécifique à la caste (137, 144). Selon les différents stades de développement de l'abeille, la quantité et la qualité des hydrocarbures de la cuticule changent (144, 145). La sélection olfactive de son hôte est également influencée par l'âge de cette dernière (146); l'infestation est 2 à 3 fois plus forte chez les jeunes abeilles âgées de 14 jours (147). Aussi, varroa a une préférence pour les larves de faux bourdons en raison des acides gras, plus précisément les esters méthyliques et éthyliques qui les composent (143).

Parmi les différentes sous-castes d'ouvrières, le varroa adulte préfère infester une nourrice, plutôt qu'une butineuse (115, 144, 148, 149), ce qui est une composante adaptative afin s'assurer leur reproduction, considérant une plus grande proximité au couvain (111). Varroa est principalement attiré par des nourrices âgées entre deux et huit jours (149, 150).

Les butineuses sécrètent des signaux chimiques qui sont répulsifs pour varroa (5, 136, 144). La présence d'hydrates de carbone non saturés chez la butineuse et les phéromones la glande de Nasonov semblent nuire à l'acarien (5, 144); plus spécifiquement, le géraniol présent dans les phéromones de glande de Nasonov, qui serait plus élevé avec l'âge, est répulsif pour varroa (146).

2.1.5 Capacités d'adaptation

L'acarien *Varroa destructor* possède plusieurs mécanismes d'adaptations qui lui permettent de survivre sur l'abeille européenne (*Apis mellifera*). Le cycle de vie de varroa lui a permis d'établir une relation avec son hôte (111). Comme varroa est un parasite, son évolution est plus rapide que l'abeille (39).

Varroa se dissimule chimiquement de son hôte de différentes façons : l'acarien possède une dissimulation passive en imitant l'odeur de l'abeille (5, 107, 151) et est capable d'imiter de façon passive la composition chimique de la cuticule de l'abeille en fonction du stade de développement de son hôte (145). Cette adaptation est plus grande lors du stade larvaire et nymphaire (145). En effet, varroa présente une diminution du ratio méthylalkane : alkène des hydrates de carbone pour ressembler à la cuticule de son hôte, ce qui lui empêche d'être reconnu au sein de la ruche (5, 107, 151). Cette capacité d'adaptation est efficace, en à peine 3 à 9 heures après avoir changé d'hôte (151). D'après Le Conte *et al.*, ce serait cette imitation cuticulaire qui lui aurait conféré l'aptitude de changer d'espèce d'abeille (*Apis cerana* à *mellifera*) (152).

Varroa se dissimule de son hôte par différents mécanismes physiques : premièrement en se faufilant entre deux sternites abdominaux, préférentiellement à gauche entre le 3^e et 4^e tergite ventro-latéral (135, 153); deuxièmement, sa forme aplatie lui permet de s'incruster entre deux plaques de cuticule de son hôte (6); localisation difficile d'accès pour l'abeille (5); troisièmement l'abeille ne voit pas le spectre rouge correspondant à la couleur de la femelle Varroa (107), ainsi l'abeille ne peut l'identifier (107).

La survie de varroa dans une colonie dépend de plusieurs facteurs : la survie de la femelle en phase phorétique, la quantité de couvain, la fertilité, le nombre de femelles infectant un alvéole, la température et l'humidité (5, 6, 150). La température optimale pour l'acarien varie entre 26 et 33 °C (111). Une variation aussi basse que 1 °C influence la physiologie de l'acarien et son infestation (150).

Apis cerana (l'abeille asiatique) est l'hôte naturel de varroa (105). *Apis cerana* a maintenu une relation stable avec ce parasite à travers le temps, avec peu d'effets néfastes (105, 114). Varroa infeste seulement les mâles chez l'espèce *Apis cerana*. La durée du développement du mâle *Apis cerana* est plus courte d'un jour comparativement à *Apis mellifera* (154). *Apis cerana* a un comportement de toilettage efficace, lui permettant de reconnaître et de détacher l'acarien efficacement en phase phorétique (5, 114). De plus, *Apis cerana* possède un comportement hygiénique efficace : cette espèce reconnaît les couvains mâles infestés et les élimine, ce qui permet de diminuer l'émergence de mâles adultes parasités (111, 114). En conclusion, la population de varroa reste sous contrôle dans une colonie de *Apis cerana* (5, 105, 107, 114, 155). En contrepartie, *Apis mellifera* possède des mécanismes de défense (toilettage) moins efficace qu'*Apis cerana*, ainsi, la croissance de Varroa dans les colonies est plus rapide, voire exponentielle (105, 114, 156).

La morphologie de varroa s'est adaptée à l'espèce *Apis mellifera*. Le corps de *Varroa destructor* est plus grand que celui de *Varroa jacobsoni* (110, 157). Le corps de *Varroa destructor* est proportionnel à la taille de son hôte, puisque l'espèce *Apis mellifera* est plus grande qu'*Apis cerana* (110, 157).

Varroa s'adapte en fonction des paramètres environnementaux comme l'hôte, la résistance à des acaricides, le climat extérieur et le microclimat de la ruche (113, 157). La population de varroa au sein d'une colonie d'abeilles fluctue en fonction des saisons (**Figure 10**). Le cycle de vie de varroa dépend du couvain, dont la quantité est plus élevée en été (113). Varroa peut survivre tout au long de l'année à l'intérieur d'une colonie, même en hiver (113). En automne, la quantité de couvain diminue. Parallèlement, la proportion de varroa phorétique augmente (111). Le tout se reflète par un plus grand taux d'infestation. En été,

une grande proportion d'acariens (67%, mais pouvant atteindre 90%) sont dans les alvéoles pour la reproduction (107, 111). L'effet saisonnier est directement lié à la quantité de couvain (abeilles en développement). Donc, le nombre de femelles augmente au printemps et à l'été, mais diminue légèrement vers l'automne (113).

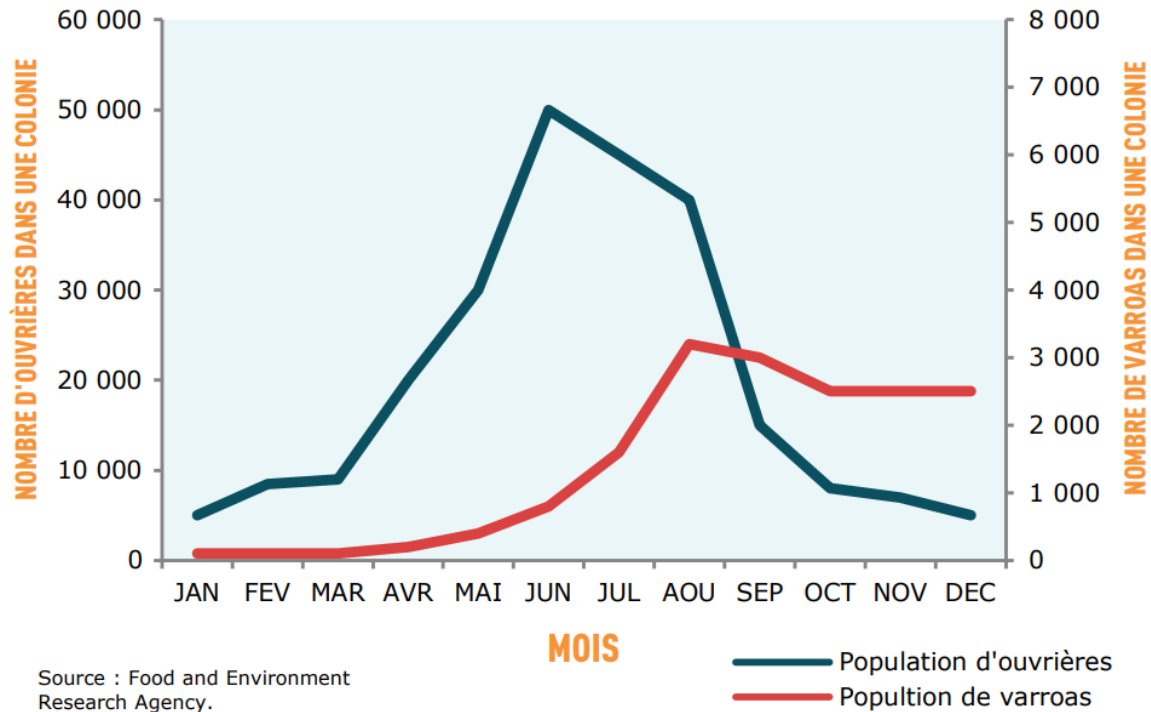


Figure 10. Fluctuation de la population d'abeilles et de varroas dans une ruche au courant d'une année.
Source MAPAQ, adapté de Food and Environnement Research, sous permission.

La variabilité saisonnière de la morphologie chez varroa est peu étudiée. Selon une étude ukrainienne, des variations morphologiques sont observées en été et en hiver (113). Le parasite possède une plasticité morphologique qui est plus marquée en été (157-160). En été, varroa présente un corps plus petit et allongé sur l'axe transversal, avec un plus grand organe reproducteur et des plus petites pattes (113). Ce changement se développe graduellement entre chaque génération (113). En hiver, il y a un changement des caractéristiques morphologiques et une élimination des Varroas peu adaptés à la phorésie (157, 160).

2.1.6 Impacts connus de *Varroa destructor* sur l'abeille *Apis mellifera*

Étant donné la récente évolution de *Varroa destructor*, un déséquilibre entre l'acarien et *Apis mellifera* est bien documenté. Plusieurs conséquences du parasitisme chez l'abeille sont répertoriées dans la littérature.

L'infestation par *Varroa destructor* affecte le comportement de l'abeille. Par exemple, l'apprentissage diminue chez les abeilles parasitées, avec une diminution du stimulus aux sucres (161). De plus, les butineuses parasitées présentent une perte de leur sens d'orientation; ainsi, les chances de non-retour à la ruche augmentent (162). La perte de butineuses est conséquemment plus élevée chez les ruches fortement parasitées (162).

2.1.6.1 Les changements physiologiques de l'abeille parasitée

Pendant plusieurs années, la théorie selon laquelle *Varroa* se nourrit de l'hémolymphe de l'abeille était acceptée. Cependant, les résultats de Ramsey *et al.* ont démontré que *Varroa destructor* se nourrit majoritairement de corps gras et d'une certaine proportion d'hémolymphe (80). Selon Dmitryjuk *et al.*, *Varroa* se nourrit des acides gras de l'hôte (163).

Deux organes clés (le corps gras et les glandes hypopharyngiennes) ne se développent pas adéquatement lors d'une infestation par *Varroa* (23, 88, 164, 165). Plusieurs changements pathologiques s'apparentent à des altérations du corps gras de l'abeille (80). Les dommages sont plus sévères lors du développement de l'abeille, qui présente une plus grande proportion de corps gras. La synthèse de lipides, le stockage nutritionnel et son métabolisme sont modifiés (80). Toutes ces conséquences sur cet organe diminuent l'espérance de vie des abeilles (166). La taille des glandes hypopharyngiennes, organe sécrétant la gelée nourricière du couvain, est réduite de 15% (6, 8). Le tout diminue la capacité de transformer le nectar en miel (6). L'abeille adulte émergeant de l'alvéole est alors affaiblie (107). Par conséquent, *Varroa destructor* altère les composantes

physiologiques permettant normalement aux pupes des abeilles d'hivernage de survivre à l'hiver (23).

Le parasitisme par varroa influence les protéines de stockage des abeilles adultes. En effet, les niveaux de protéines cervicales et abdominales sont plus faibles chez les abeilles adultes émergentes (167) et chez les jeunes abeilles âgées de moins d'une semaine (168). Plus précisément, les niveaux de vitellogénine (la principale protéine de réserve) et des protéines totales sont significativement plus faibles dans l'hémolymphe des abeilles d'hiver infestées durant leur développement (23). De plus, la disponibilité de pollen dans la ruche, source protéique chez les abeilles, est diminuée lors d'infestation acarien (168). Une réduction de la collecte de pollen par les butineuses pourrait expliquer la diminution de la disponibilité protéique dans la ruche (169). De plus, l'assimilation du pollen est diminuée en raison d'une altération de son métabolisme (168). Le niveau protéique est une composante clé à analyser considérant son influence sur le métabolisme et l'espérance de vie (168), facteurs primordiaux influençant la survie hivernale des abeilles (168).

2.1.6.2 Changements morphologiques de l'abeille infestée

Une abeille adulte présente des changements morphologiques lorsqu'elle est infestée durant son développement. Tout d'abord, il y a une diminution de poids de l'abeille (4-33%) en fonction du nombre d'acariens (5, 6, 111, 166-168, 170, 171). Le poids est une composante importante de l'abeille pour assurer le bon fonctionnement de la colonie (167). En effet, un butinage précoce a été observé si le poids de l'abeille est plus petit (164). Quoique Yang *et al.* n'aient pas démontré de corrélation entre la survie de l'abeille et le parasitisme par varroa (166), une diminution du poids a été corrélée à la longévité de l'abeille par plusieurs autres auteurs (23, 88, 111, 172). La présence de 4 à 6 varroa femelles fondatrices empêche l'émergence de l'abeille ouvrière (170).

Les faux bourdons infestés durant leur développement présentent aussi une diminution de leur poids, de leur fertilité, du vol nuptial et du nombre de spermatozoïdes (5, 173).

Les abeilles infestées présentent une plus petite quantité d'eau, ce qui affecte directement le poids (172). *Varroa* diminue la régulation des échanges d'eau tout en occasionnant une perte d'eau par la cuticule (172). L'infestation par l'acarien change également la composition de la cuticule, lors du développement nymphique (172, 174).

Des ailes plus petites et déformées sont également observées chez les abeilles émergentes, en raison de l'association directe entre *varroa* et le virus des ailes déformées (6, 170). Globalement, les ailes déformées et/ou la perte de poids diminuent la performance du vol (111).

2.1.6.3 Immunité de l'abeille infestée par *Varroa destructor*

Varroa influence des composantes clés du système immunitaire de l'abeille. Par exemple, les abeilles en développement et émergentes infestées présentent une diminution d'expression de gènes importants dans l'immunité comme *apidaecine* (5, 175, 176). De plus, *varroa* diminue le nombre d'hémocytes circulant dans l'hémolymphe (5, 177) et de façon plus significative chez les femelles (178); cette diminution du nombre d'hémocytes est observée chez l'abeille infestée à l'émergence et vers l'âge de 5 jours (23). De plus, il y a une diminution de la synthèse de mélanine pour le processus de mélanisation lors de d'une infestation par *varroa* (5, 177).

L'immunité de la jeune abeille n'est pas totalement développée; l'activité de l'enzyme impliquée dans la mélanisation, la phénol oxidase, est absente dans les 24 heures suivant l'émergence de l'abeille adulte saine (166), ce qui a un impact important sur la survie de la jeune abeille si elle est exposée à un agent pathogène, incluant *varroa*.

Varroa infectant une abeille crée une condition favorable à la transmission de virus (179), particulièrement chez les jeunes abeilles. En effet, *varroa* favorise la dissémination de plusieurs virus (107) : il a été démontré par plusieurs chercheurs que *varroa* est un contributeur majeur de la transmission horizontale des virus, dont le virus des ailes

déformées (DWV) et les virus du complexe AKI (virus de la paralysie aigüe de l'abeille (ABPV), virus du Cachemire (KBV) et virus israélien de la paralysie aigüe (IAPV) (6, 107, 180-187). *Varroa* joue un rôle de vecteur des virus, autant en phase reproductive que phorétique : l'acarien ingère des particules virales lorsqu'il se nourrit d'une abeille infectée (188), puis les transmet à une congénère saine en injectant ces particules via sa salive dans l'hémolymphe. Cette inoculation augmente la pathogénicité de plusieurs virus (180, 182, 184, 189-194). Des effets synergétiques pouvant aggraver les effets secondaires de l'infestation par *varroa* ont été rapportés avec des pesticides et d'autres agents infectieux, dont *Nosema ceranae* (111).

2.2 Virus rencontrés chez l'abeille

Plus d'une vingtaine de virus nocifs ont été identifiés à ce jour chez l'abeille. Le nombre de virus connus a augmenté grâce au séquençage génomique (179, 195). Ces virus répertoriés constituent un risque pour l'état de santé des abeilles en provoquant des effets secondaires néfastes autant sur le plan individuel que populationnel (179, 195). Ce sont donc des agents à surveiller qui méritent d'être bien étudiés.

2.2.1 Génomique des virus

Les virus détectés chez les abeilles sont principalement des virus ARN. Les virus ARN présentent une plus grande variété de mutations, en raison de la faible fidélité de leur polymérase (196). En d'autres termes, les virus peuvent se recombinaisonner et muter facilement. Ainsi, cela augmente la variété des séquences et l'émergence de nouveaux variants (196).

Ces virus de type ARN sont à simples brins, à polarité positive et non enveloppés (6, 107, 195). Ils possèdent une capsidie icosaédrique et symétrique (6, 107, 195). Les virus se multiplient dans le cytoplasme en utilisant la machinerie cellulaire de l'hôte (6, 107, 195).

La majorité des virus font partie de l'ordre des *Picornavirales* et de la famille des *Iflaviridae* et *Dicistroviridae* (6, 195). La famille des *Distrioviridae* comprend le virus de la cellule royale noire (*Bee Queen Cell Virus* en anglais ; abréviation : BQCV), le virus du Cachemire (*Kashmire Bee Virus*, KBV), le virus de la paralysie aigüe (*Acute Bee Paralysis Virus*, ABPV) et le virus israélien de la paralysie aigüe (*Isareli Acute Paralysis Virus*, IAPV). La famille des *Iflaviridae* comprend le virus des ailes déformées (*Deformed Wing Virus*, DWV).

2.2.2 L'isolement viral chez l'abeille

La plupart des virus peuvent être détectés chez des abeilles asymptomatiques, ce qui constitue ainsi une menace importante pour les colonies (6, 179). La majorité des signes cliniques lors d'une infection virale est observée lors de co-infections fongiques (*Nosema*) ou parasitaires (*Varroa*) (179). Malgré le fait que les virus peuvent se multiplier dans plusieurs cellules, beaucoup d'entre eux ont un tropisme particulier pour le système nerveux (6).

Les virus peuvent affecter tous les stades de développement : œuf, larve, nymphe, adulte (179, 197). Les différentes castes d'abeilles peuvent également être infectées comme les ouvrières, les faux bourdons et la reine (179, 197). Il est aussi fréquent d'observer une infection combinant de multiples virus simultanément au sein d'un même individu et dans une colonie (197).

2.2.3 Modes de transmission des virus

La transmission des virus peut se produire par voie horizontale : par voie orale, par la trophallaxie ou par un contact étroit entre les différentes castes (6, 179). Les virus peuvent se transmettre également par voie verticale : via l'ovaire, le sperme ou durant l'accouplement (6, 179).

La transmission horizontale dans un rucher peut être accélérée par le biais d'un vecteur, dont le plus connu est *Varroa destructor* (6, 107, 198). Les virus sont transmis par varroa lors de sa prise d'un repas sur l'abeille (107). Varroa injecte des virus directement dans la circulation de l'abeille (107). Cette voie de transmission virale amène des conséquences flagrantes au sein d'une colonie : la sévérité des signes cliniques des infections virales est plus grande en présence de varroa (107). D'ailleurs, la pathogénicité de certains virus serait aggravée lorsqu'ils sont accompagnés de varroa. (6). L'apiculteur peut contribuer à la transmission des virus entre les ruches en agissant comme vecteur passif (fomite) (6). La prédominance des virus et les souches virales varient selon les régions; ainsi, la localisation géographique pourrait influencer le risque d'infection virale entre deux hôtes (180).

2.2.4 Signes cliniques

Les signes cliniques des virus ne sont pas spécifiques. Les plus fréquents sont la paralysie et les difformités (195). Les changements induits par les virus occasionnent principalement une diminution de l'espérance de vie des abeilles et perturbent l'efficacité et l'équilibre de la population dans la colonie (6). Or, les abeilles peuvent demeurer asymptomatiques (107).

2.2.5 Test diagnostique

Un diagnostic par analyse moléculaire est nécessaire afin de distinguer les différentes infections virales possibles (107). La RT-PCR est la méthode diagnostique la plus sensible permettant d'identifier et de quantifier la charge virale, mais encore peu utilisée en apiculture pour des raisons financières (6). Le diagnostic peut également se baser sur les signes cliniques et les résultats virologiques (6).

2.2.6 Virus des ailes déformées (DWV)

Le virus des ailes déformées (*Deformed wing virus*, DWV) est le plus rencontré et très contagieux chez *Apis mellifera* (6, 179, 195). Il s'agit du virus le mieux connu, qui cause des mortalités de colonies d'abeilles dans les régions tempérées (199).

2.2.6.1 Histoire

Le DWV a été isolé pour la première fois en Égypte en 1997 chez une abeille saine (107, 182, 199, 200). Puis, il a été découvert au Japon en 1982 chez une abeille avec les ailes déformées, d'où l'origine du nom du virus (107, 182, 199, 200).

2.2.6.2 Transmission

Le virus des ailes déformées se transmet par voie horizontale, verticale et vectorielle (88, 195, 200). En l'absence du vecteur varroa, le virus se transmet horizontalement et verticalement (201), mais l'efficacité est moindre.

2.2.6.3 Signes cliniques

Les signes cliniques secondaires à cette infection virale sont variables, pouvant aller de la paralysie à des difformités (des ailes déformées ou un abdomen arrondi et petit), voire à des changements de comportement (difficultés au vol et d'apprentissage) (6). Toutes les castes et tous les stades du cycle de vie peuvent être infectés par le DWV (180, 200). De plus, la combinaison du virus avec varroa aggrave les signes cliniques (6, 180). Les abeilles peuvent également être infectées par le DWV sans présenter de signes cliniques (200). Les abeilles asymptomatiques (sans ailes déformées) peuvent éprouver des problèmes d'apprentissage et même une diminution de leur comportement d'hygiène (6, 107).

La sévérité de la maladie virale varie selon la voie de transmission; l'infection de DWV peut être virulente ou avirulente (200). L'infection virulente se présente lors de la transmission horizontale, avec ou sans le biais d'un vecteur (200). La transmission horizontale du DWV occasionne une infection chronique ou aigüe, avec une plus grande chance d'apparition de signes cliniques que par la transmission verticale (200). Une infection aigüe provoque des ailes déformées, une paralysie et la mort (180, 200). Une infection chronique affecte le processus d'apprentissage et l'espérance de vie (180, 200, 202). L'infection avirulente et asymptomatique se produit lors de la transmission verticale, soit par le sperme, soit par les œufs (200).

Les abeilles développant des ailes déformées sont particulièrement les jeunes émergentes. En effet, le virus DWV empêche le développement des ailes au dernier stade du cycle nymphique (6, 88, 107, 182, 195). Les glandes hypopharyngiennes et mandibulaires sont hypoplasiques (180, 203). Les jeunes abeilles émergent de leur alvéole plus lentement (203). Les risques de mortalité sont élevés, ce qui diminue globalement l'espérance de vie des abeilles de la colonie (6, 88, 107, 195).

2.2.6.4 Rôle de varroa

Le rôle vectoriel de *Varroa destructor* est bien établi pour le DWV (6, 182, 204-207), avec une interaction synergétique bien documentée (208). Le varroa femelle peut contracter des particules virales de DWV d'une abeille adulte ou d'une nymphe infectée (207).

La combinaison de varroa et de DWV contribue à une augmentation de la prévalence et de la charge virale chez les abeilles d'une même colonie (107, 182). En d'autres mots, la charge virale du DWV est corrélée avec l'infestation par varroa (187, 208). En effet, il a été démontré que la charge virale par abeille était plus élevée chez les nymphes infestées avec un grand nombre d'acariens *Varroa* (182, 187, 209, 210). D'autre part, les effets pathologiques augmentent également en présence de varroa (6, 88, 195). De surcroît, la reproduction de varroa serait optimisée chez les couvains infectés par DWV (211).

En absence de varroa, l'infection virale au DWV est souvent inapparente (200). Une faible prévalence et pathogénicité de DWV sont observées dans les régions exemptes de varroa, comme sur l'île de Terre-Neuve au Canada (199, 212).

Malgré les nombreuses connaissances sur le rôle vectoriel de *Varroa* dans la transmission des particules virales de DWV, des résultats contradictoires demeurent concernant sa contribution dans la transmission mécanique ou multiplicatrice du virus (204). Le DWV a été isolé dans l'acarien (182, 205, 213), avec une charge virale 50 fois plus élevée que les autres virus connus (214).

Selon Gisder *et al.*, le variant DWV-B est présent dans l'épithélium intestinal et les glandes salivaires de varroa, sans l'évidence de DWV-A en fluorescence (204). La charge virale de DWV varie entre les individus d'un même groupe expérimental où des nymphes sont infectées par la même méthode, avec le même niveau d'infestation (exposées au même nombre de varroas) (209), ce qui laisse sous-entendre que la présence de varroa n'augmente pas automatiquement la charge virale (209). D'autre part, une charge virale plus élevée ne corrèle pas systématiquement avec l'apparition de signes cliniques (182, 210).

La présence de varroa chez les abeilles en développement favorise la formation d'anomalies comme des ailes déformées et un plus petit corps (182, 207, 215). La présence d'ailes déformées est aussi fortement corrélée avec une charge virale élevée chez l'abeille (200). L'injection expérimentale du virus dans une nymphe cause des ailes déformées (182, 216). Il est à noter qu'il n'y a pas toujours des signes cliniques de DWV en présence de varroa, mais les chances d'apparition de signes cliniques sont plus élevées lorsque la phase phorétique de varroa est plus longue (217). Ces signes sont plus souvent observés à la fin de l'été et en automne (6, 182).

L'immunosuppression par varroa favoriserait la multiplication et la virulence de DWV (6). De multiples gènes associés à l'immunité sont différemment exprimés chez ces pupes

infectées (209). Lors d'infection virale au DWV, il y a une diminution d'expression de gènes d'enzymes immunitaires dont le phénol oxydase (166, 182).

2.2.6.5 Isolement

Le virus DWV peut être isolé dans tous les tissus de l'abeille (107, 180, 213). Le virus s'accumule davantage dans les cellules épithéliales et dans la lumière du tractus digestif, ainsi que dans l'épithélium de l'antenne près de l'hémolymphe (180, 218) ; des particules virales sont également présentes dans la tête des abeilles asymptomatiques (213). Le DWV chez la reine peut être présent dans le système digestif, les ovaires, la tête et le corps gras (179, 187, 218, 219). Le DWV infecte également les vésicules séminales et le sperme du faux-bourdon (218, 220).

2.2.6.6 Génome du virus des ailes déformées (DWV)

Le DWV possède une certaine variabilité génétique et se divise en quatre génotypes : A, B, C et D (6, 107, 195, 221). Les quatre souches présentent une virulence et une distribution géographique différentes (107). Les séquences génétiques retrouvées varient selon la localisation géographique plutôt que par l'espèce d'abeille (195) ; ainsi, la prévalence de DWV A ou B varie selon les études (leur géolocalisation) et serait expliquée par la compétition dans l'hôte (221).

Une abeille saine présente des charges virales de DWV qui sont faibles, avec une diversité des variants (222). En contrepartie, *varroa* diminue la diversité génétique de DWV chez les abeilles, autant lors d'expérimentations *in vitro* que sur le terrain (221), avec une multiplication des variants plus virulents (107, 195). D'ailleurs, certaines séquences génétiques de DWV seraient sélectionnées selon *varroa* ; l'explication de ces observations demeurent à être élucidés lors de prochaines études (195, 223). De cette façon, la diversité virale chez l'abeille infectée serait diminuée lors d'infestation par *varroa* (107, 195, 223), même prolongé (209), avec une sélection génétique du variant A ou B du virus DWV (222).

Les variants A et B peuvent atteindre des concentrations élevées lorsque le virus est injecté dans l'hémolymphe, autant par voie vectorielle (*varroa*) que par inoculation (195), mais les deux génotypes seraient en compétition. Cependant, selon Yañez *et al.*, le recombinant A serait favorisé lors du stade de développement nymphique de l'abeille autant chez les abeilles adultes symptomatiques qu'asymptomatiques (224).

Dans la communauté scientifique, l'association entre le génotype du DWV et sa virulence demeure contradictoire (221). Sommes toutes, la virulence des différents variants entre les abeilles au sein d'une colonie demeure à être éclairée (204).

Les études en Australie, région exempte de *Varroa destructor*, permettraient de mieux comprendre le dynamisme génotypique du DWV avant l'introduction du parasite dans une colonie d'abeilles (221).

2.2.6.6.1 Virus des ailes déformées, génotype A (DWV-A)

Le variant A (DWV-A) a été le premier à être étudié (107) et correspond à celui le plus souvent identifié et réparti mondialement (199).

Selon une étude réalisée à Hawaï, le variant A serait plus associé avec des signes cliniques (198, 204). Une étude britannique a également suggéré que le variant A serait plus létal, tout en empêchant la persistance du virus dans la population (222). Selon Tehel *et al.*, la virulence des variants A et B serait similaire après inoculation expérimentale d'abeille en développement (189), voire légèrement plus élevée chez le variant A (199, 221).

Le DWV-A serait capable de se multiplier dans *varroa*, tel que démontré lors d'hybridation *in situ* dans le parasite (225). De plus, la réplication ne dépendrait pas de la charge virale de son hôte (225). Cette capacité de réplication reste à être confirmée dans le futur (199).

2.2.6.6.2 Virus des ailes déformées, génotype B (DWV-B)

Le génotype B a été décrit pour la première fois en 2004 aux Pays-Bas sous le nom *Varroa destructor virus-1* (199, 226), puis a été subséquemment été renommé DWV génotype B (199). Le DWV-B partage près de 80% de séquences identiques au A (107). Le variant B s'est répandu rapidement dans le monde, selon les données épidémiologiques s'étendant de 2008 à 2021 (199). Le DWV-B a été isolé dans plusieurs pays, dont la France et l'Allemagne (199, 223, 227). Globalement, il y a un remplacement du DWV-A par le DWV-B (199) ; la prévalence du génotype B est en hausse aux États-Unis (228), au Royaume-Uni (229) et probablement ailleurs (221).

Selon McMahon *et al.*, le DWV-B serait plus virulent que le DWV-A (190). Lors d'inoculation expérimentale du virus chez l'abeille adulte, le variant B se multiplie plus rapidement en atteignant des titres plus élevés que le variant A (190, 199). L'abeille infectée expérimentalement par le variant B a une moins grande chance de survie, ainsi, les colonies infectées par ce variant présenteraient un effondrement plus rapide (190). Le recombinant B causerait une perte cognitive chez les abeilles adultes et une diminution de l'espérance de vie chez les abeilles émergentes (221).

Selon d'autres chercheurs, le DWV-B s'adapterait mieux pour la transmission dans une colonie (228). En effet, le variant B serait peu létal et pourrait s'établir efficacement dans une ruche ; une abeille asymptomatique survit, même si elle présente un titre élevé de DWV, ce qui en facilite subséquemment la transmission (222).

Le variant B du DWV aurait une capacité de réplication dans varroa, tel que démontré par la présence de bande négative d'ARN dans le parasite infestant des abeilles symptomatiques (213, 226, 230). De plus, le variant B du DWV a été identifié par fluorescence dans l'épithélium intestinal et dans les glandes salivaires de varroa (204). Cette découverte réfute les anciennes études qui démontraient des particules virales seulement dans la lumière du tractus gastro-intestinal (188, 231). Cependant, l'hypothèse de réplication virale dans varroa est parfois réfutée. En fait, la détection de bandes

négatives ARN dans varroa serait plutôt expliquée par certains comme résultant de l'ingestion de résidus provenant du tractus gastro-intestinal de l'abeille (204, 232).

2.2.6.6.3 Virus des ailes déformées, géotypes C et D (DWV-C et DWV-D)

Le DWV-C a récemment été identifié en 2006 par Mordecai *et al.* (233) Il constitue une branche virale distincte qui se serait séparée des autres géotypes il y a environ 300 ans (180, 233). Le DWV-C pourrait se recombiner avec le DWV-A ou le DWV-B (180, 233). En revanche, la pathogénicité et la distribution mondiale du variant C demeurent à être clarifiées (195, 233).

Le DWV-D a seulement été identifié chez des abeilles collectées en Égypte dans les années 1970 (199). On croit que le DWV-D serait disparu et aurait été remplacé par le DWV-A (199).

2.2.7 Complexe viral AKI

Le virus de la paralysie aigüe de l'abeille (*Acute bee paralysis virus*, ABPV), le virus du Cachemire (*Kashmere bee virus*, KBV) et le virus israélien de la paralysie aigüe (*Israeli acute paralysis virus*, IAPV) font partie d'un complexe commun appelé AKI (6, 185, 192). Les virus du complexe AKI sont de la famille *Dicistrovirus*, avec une pathogénicité similaire (6, 185, 192).

L'infection virale par le complexe AKI présente majoritairement peu de signes cliniques, avec des charges virales qui demeurent relativement basses chez l'abeille (185). Cependant, leur virulence augmente et la dose létale est plus faible lorsque ces virus sont injectés dans l'hémolymphe (autour de 100 particules) plutôt qu'absorbés par voie orale (autour de 10¹¹ particules) (185, 192, 234). Les virus AKI participent aux mortalités hivernales avec une distribution mondiale (185). Ce complexe est souvent présent lors d'infestation par *Varroa destructor* (185).

2.2.7.1 Virus de la paralysie aigüe (ABPV)

Le ABPV est un virus ARN à distribution mondiale, plus commun en Europe et en Amérique du Sud (180, 185). Le ABPV est constitué de deux lignées génétiques : américaine et européenne (180). L'hôte original du ABPV est probablement l'abeille domestique (*Apis mellifera*) (185). Le ABPV constituerait une des principales causes de mortalité d'abeilles en France, aux États-Unis et en Allemagne (6).

2.2.7.1.1 Histoire

Le ABPV est connu depuis 1963, mais se présentait en faible concentration en absence de signes cliniques avant l'arrivée de varroa, surtout l'été (6, 180, 192, 216). Le nom du virus provient des premières observations expérimentales, où le virus provoquait des tremblements chez l'abeille, 2 à 4 jours après l'injection, suivis par la mort un ou deux jours plus tard (192).

2.2.7.1.2 Isolement

Ce virus est isolé chez les abeilles adultes asymptomatiques (192), avec une faible fréquence et une faible charge virale (6, 180). Les larves et les pupes peuvent également être infectées par ABPV, mais en moins grande prévalence que les adultes (185).

2.2.7.1.3 Transmission

Ce virus se propagerait de façon horizontale, plus précisément par transmission orale (180, 182). En effet, il a été étudié que ABPV s'accumule dans le cerveau et les glandes hypopharyngiennes (6, 179, 235). ABPV se transmet également par les fèces (179, 187). Une transmission verticale est aussi suspectée parce que le virus a été isolé dans le sperme et les œufs (180, 185, 220).

Le parasite *Varroa destructor* favorise également la transmission horizontale par son rôle de vecteur mécanique (6, 182, 185, 236). Ce parasite se nourrit de l'hémolymphe de l'abeille et accumule des particules virales dans son tractus gastro-intestinal (6, 182, 185, 236). Par contre, on n'a encore aucune preuve de la multiplication virale de ABPV dans varroa, en raison de la diminution d'efficacité de la transmission virale successive entre les abeilles par varroa dans le temps (182).

Le taux de la transmission virale de ABPV par varroa entre les abeilles varie entre 50-80% (185, 186). Le parasite peut contenir des millions de particules de ABPV dans le tractus gastro-intestinal, mais ne semble en injecter qu'une plus petite portion dans l'hémolymphe de l'abeille (182). En effet, les données expérimentales de Bailey *et al.* présentent une dose létale de ABPV aussi basse que 100 particules virales injectées dans l'hémolymphe, ce qui est similaire à l'action de varroa (182, 191, 192). Les effets sont ainsi plus sévères et létaux quand le virus est injecté directement dans la circulation (6). La virulence de ABPV est ainsi plus sévère que DWV lorsqu'il est associé avec varroa (6). En d'autres mots, les abeilles infectées par voie orale ne présentent pas toujours des signes cliniques (182), et une plus grande quantité de particules virales (estimée à 10^{11}) est requise pour causer une paralysie (182). De plus, selon une étude réalisée en Allemagne et aux Pays-Bas, l'isolation de ABPV serait corrélée avec le taux d'infestation par varroa, avec une mortalité plus grande en fin d'été (182). En fin de saison estivale, du couvain mort operculé ou non peut être également observé avec la varroase (182).

2.2.7.1.4 Signes cliniques

Les signes cliniques se présentent lorsque ABPV est injecté dans l'hémolymphe par *Varroa destructor* (6). D'ailleurs, la mortalité des pupes et des jeunes adultes survient après 2-6 jours (180). Comme le ABPV est présent dans le cerveau (235), les abeilles adultes développent des signes neurologiques tels que de la paralysie, des tremblements, une incapacité de voler, le tournis ou l'errance de la ruche (6, 185). Des malformations sont

également observées chez les adultes : une perte de poils associée à un noircissement graduel de thorax et de l'abdomen et/ou des ailes asymétriques (6, 180, 185).

À l'échelle de la colonie, un affaiblissement et un déclin de la population sont observés lorsque l'infection virale de ABPV est élevée, par un manque d'abeilles adultes disponibles pour nourrir le couvain (6, 185). Le ABPV infecte la puppe et empêche la métamorphose de la puppe en stade adulte (40). L'incidence de ABPV serait corrélée avec la population de *Varroa destructor* dans la ruche et avec l'effondrement de colonies hivernales, avec une létalité en 1-2 an si aucun traitement antiacarien n'est entamé dans la ruche (6, 180) ; une corrélation avec les pertes de colonies a été bien établie avec le ABPV en Europe dans les années 1980 et 1990 (180, 185).

2.2.7.2 Virus du Cachemire (KBV)

Le virus du Cachemire (en anglais : *Kashmere bee virus*, abréviation : KBV) est un virus à distribution mondiale. La prévalence est plus grande en Amérique du Nord et le virus peut être isolé autant chez des ruches saines que malades (180, 182, 185, 237). Le KBV partage 70% de son bagage génétique avec le ABPV (180). Les souches varient selon la géographie (194). Le KBV serait aussi détecté dans le syndrome d'effondrement des colonies (179) ainsi que lors de pertes de colonies infestées par varroa (185).

2.2.7.2.1 Isolement

Le virus est normalement présent dans un rucher avec une faible charge virale (180, 185). La prévalence et la charge virale augmentent lors d'un facteur stressant, comme la transition de l'été vers l'automne (180, 185).

Les études de Dall *et al.* ont permis de démontrer par microscopie électronique des inclusions du virus KBV dans de nombreuses cellules, comme les cellules épithéliales intestinales et trachéales, les hémocytes et les oenocytes, sans toutefois affecter le système

nerveux (234). Les abeilles infectées par KBV sont alors affaiblies, ce qui diminue leur défense contre d'autres agents infectieux (107).

2.2.7.2.2 Signes cliniques

Peu de signes cliniques sont observés chez les abeilles infectées par le KBV, mis à part des mortalités lorsque les charges virales sont élevées (180, 182). Ainsi, l'injection de particules virales avec une grand titre de KBV est rapidement létal (182). Le KBV serait le plus virulent virus du complexe AKI. En effet, une faible quantité de virus est nécessaire pour occasionner la mort en 3-4 jours (238) ; la quantité de KBV peut être aussi basse que 35 particules dans l'hémolymphe de la nymphe (182, 234). Contrairement au ABPV, aucune paralysie n'est observée chez une abeille infectée par le KBV (182).

2.2.7.2.3 Transmission

La transmission peut être horizontale (oro-fécale), avec une détection du virus dans les fèces (239) et la contamination subséquente de la nourriture, ou verticale, avec une démonstration de particules virales dans les œufs et la reine (180, 182, 183). D'ailleurs, des particules virales ont été également isolées dans le corps de *Varroa destructor* adulte ainsi que dans sa salive (182-184). *Varroa destructor* est un vecteur du KBV, en activant et augmentant la virulence du virus (180). Une étude néozélandaise a permis de détecter des bandes négatives d'ARN dans l'acarien, suggérant une répllication dans le parasite (240).

2.2.7.3 Virus israélien de la paralysie aigüe (IAPV)

Le IAPV est le dernier virus faisant partie du complexe AKI. Le IAPV est similaire aux autres virus du complexe AKI, mais peut être distingué par la PCR (193). Le IAPV a seulement été isolé chez *Apis mellifera* (185), et peut infecter tous les stades de vie de l'abeille (6). Différentes souches virales existent selon la localisation géographique : Australie, Chine/Israël/Corée et États-Unis (180).

2.2.7.3.1 Histoire

IAPV est connu depuis 2007 où il a initialement été identifié dans des installations apicoles en Israël, d'où l'origine du nom (180, 193).

2.2.7.3.2 Signes cliniques

Les abeilles infectées par IAPV présentent peu de signes cliniques et meurent rapidement, soit 2 à 5 jours après une injection, autant les ouvrières que les nymphes (180). L'injection expérimentale de IAPV dans une larve résulte en 80% de mortalité en à peine 4 jours (193). Les premiers signes cliniques d'infection sont une perte de poils associée à un noircissement graduel de l'abdomen, puis du thorax (180, 193).

Selon Li *et al.*, le nombre de copies virales de IAPV augmente dans la tête de l'abeille butineuse, à peine un jour après l'injection expérimentale (241), occasionnant ainsi des signes nerveux. Les signes neurologiques sont similaires à ceux du ABPV (193). Ces signes se manifestent par des tremblements, de la paralysie et un arrêt du vol (180, 241).

Les butineuses infectées par IAPV ont moins de chance de retourner à la ruche (241). La réponse au sucrose est également diminuée chez les butineuses (241), ce qui est un indice de difficulté d'apprentissage et d'orientation (242, 243). À l'échelle de la colonie, la santé et la productivité des abeilles sont diminuées (180).

2.2.7.3.3 Isolement

Le IAPV est hautement virulent et se concentre probablement dans les intestins et moindrement dans les tissus nerveux et reproducteurs (180, 185).

2.2.7.3.4 Transmission

La transmission du virus se fait par voie horizontale; le virus a été isolé dans l'alimentation : pollen, gelée royale et miel (180). Le virus se transmet aussi par contact étroit (180). La présence du virus dans le sperme et les œufs suggère également une transmission verticale (180).

Varroa joue un rôle de vecteur et multiplicateur du virus (180, 181). Le nombre de copies virales de IAPV est corrélé avec le nombre d'acariens (181, 244). Une abeille exposée à varroa serait aussi affaiblie avec une immunité faible due à la réduction de l'expression des gènes *Apidaecin* (immunité humorale) et *Eater* (phagocytose) (181). La réplication du virus dans l'acarien a été démontrée par la présence de bandes négatives d'ARN dans l'acarien (181).

Le virus IAPV est fortement corrélé avec le syndrome de collapse des colonies selon l'analyse métagénomique de Cox-Foster *et al.* (237). Le virus KBV et *Nosema* peuvent influencer l'effet de IAPV dans ce désordre (237). Exception faite de cette étude, aucune évidence de relation entre la présence de IAPV et le syndrome de collapse des colonies n'a été décelée (180, 245). Deux études établies à long terme (allemande et américaine) présentent une forte corrélation entre les virus du complexe AKI (ABPV et moindrement IAPV) et les mortalités hivernales (244, 246).

2.2.8 Virus de la cellule royale noire (BQCV)

Le virus de la cellule noire royale (*Black queen cell virus*, BQCV) est un des virus les plus répandus chez l'abeille, avec le DWV (180, 208). Les connaissances concernant ce virus sont encore limitées (180, 208). Au niveau génétique, plusieurs variants existent, dont la répartition est influencée par la géographie (180, 247).

2.2.8.1 Isolement

Le BQCV a été détecté pour la première fois chez des larves et prénymphe de reines (248). Le virus a été également isolé chez des nymphes de faux bourdons et d'ouvrières adultes (6). Le BQCV est plus prévalent chez les adultes que chez les nymphes (206). Le BQCV est prévalent dans les colonies saines au Canada et il est souvent isolé avec le DWV, autant dans des colonies saines que malades (249).

Ce virus semble être transmis par les sécrétions des glandes et accumulé dans les ovaires, les fèces et les tissus d'intestins (6, 179, 180, 187, 250).

2.2.8.2 Signes cliniques

Le BQCV infecte principalement les larves de reines (6, 180, 182) et constitue une des principales causes de mortalités chez celles-ci (180). Les larves infectées apparaissent pâles à jaunâtres, partiellement décomposées avec une mince peau prenant l'apparence d'un sac (6, 180, 182). Par la suite, l'alvéole royale infectée devient noir-brunâtre et tachetée, puis la larve ou la nymphe meurt (180, 182, 248).

Malgré le fait que le virus peut être isolé à tous les stades de développement, les abeilles adultes (ouvrières et reines) présentent peu de signes cliniques, mais le virus peut compromettre leur orientation au vol (180, 251). Les ouvrières adultes meurent rapidement après avoir contracté le virus (182). De plus, la reproduction de la reine est sévèrement affectée (179).

2.2.8.3 Transmission

Ce virus propage principalement de façon horizontale et moindrement verticale (6, 180, 182). La transmission horizontale se fait par la voie orale via l'infection de la nourriture pour le couvain royal (182). La reine peut contracter le BQCV lors de l'accouplement (sperme) et le transmettre lors de la ponte (verticalement) (179, 180).

Certains agents infectieux influencent la prévalence du BQCV. Tout d'abord, la microsporidie intestinale *Nosema apis* augmenterait la susceptibilité de l'abeille au virus BQCV (6, 180, 191, 208, 248, 252). Lorsque BQCV est associé à *Nosema apis*, l'incidence de BQCV est plus grande au printemps et au début de l'été, (182). En revanche, cette relation n'est pas claire pour *Nosema cerana* (253).

Les résultats de plusieurs études épidémiologiques ont révélé une absence de corrélation entre le BQCV et l'infestation par varroa (6, 180, 208). Or, une étude néozélandaise a isolé le BQCV dans varroa, suggérant ainsi une possible transmission mécanique du virus (240). Le BQCV ne multiplierait pas dans l'acarien, puisqu'aucune bande négative d'ARN n'a été détectée (240).

2.3 Bactéries connues chez l'abeille

Quelques agents bactériens pathogènes sont identifiés chez les abeilles, particulièrement *Melissococcus plutonius* et *Paenibacillus larvae*; deux bactéries à Gram positif provoquant respectivement la loque européenne et américaine (254, 255). Ces deux maladies sont mondiales et dangereuses pour les abeilles en développement (surtout les larves) (255).

Il existe aussi d'autres bactéries opportunistes comme *Serratia marcescens* et *Pseudomonas aeruginosa*, secondaires à un déséquilibre du microbiome, une altération de l'immunité ou une infection primaire (virale, parasitaire ou bactérienne) (255). Il est également possible qu'un parasitisme élevé occasionne une infection bactérienne opportuniste (255). Ainsi, une dysbiose dans l'intestin pourrait augmenter la susceptibilité de l'abeille (256). Cependant, ces données demeurent mal comprises et controversées.

2.3.1 Microbiome intestinal

Le microbiome des abeilles (surtout des ouvrières) est bien étudié. Le microbiome leur procure une protection contre des agents pathogènes (256, 257). De plus, la communauté

microbienne intestinale module leur fonction immunitaire par l'augmentation d'expression de peptides antimicrobiens dont l'*apidaecin* (258, 259) ou de la cascade de la mélanisation (259). De plus, le microbiome influence leur métabolisme par l'augmentation de signalisation à l'insuline, du niveau de vitellogénine et du gain de poids (257, 260).

Les abeilles émergentes sont exemptes de microbiome (261). Elles acquièrent un microbiote stable et complet quatre à six jours après l'émergence via la transmission orale ou féco-orale, la trophallaxie, la coprophagie, ainsi que par contacts directs (256, 257, 261). Le microbiome est bien conservé dans la communauté, c'est-à-dire qu'il se ressemble entre les ouvrières de la même colonie (256, 257, 261). Le microbiome comprend près de 10^8 - 10^9 cellules bactériennes (256, 257, 261). Il est composé de huit principales espèces composant 99% des bactéries ; *Snodgrassella alvi*, *Gilliamella apicola*, *Lactobacillus* sp. Fimicutes 4 et 5, *Bifidobacterium* spp., *Frishcella perrara*, *Parasaccharibacter apium* et *Bartonella apis* (256, 257, 261). Il y a une petite quantité de bactéries potentiellement pathogènes dont *Serratia* spp. (256).

L'iléon et le rectum comprennent la plus grande proportion des bactéries (257). L'iléon présente une prédominance de *Snodgrassella alvi* et de *Gilliamella apicola* tandis que le rectum est dominé par *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* spp. (256, 257).

La saison, l'environnement (cultures, plantes), la diète (qualité du pollen) et le comportement (stress) semblent influencer le microbiote (256, 257, 262-264). Les abeilles d'hiver présentent une plus grande concentration de bactéries avec une plus grande prédominance de *Bartonella* et de *Commensalibacter* (263). L'âge ne semblerait pas influencer le microbiome (256, 257). Les souches bactériennes sont diversifiées entre les individus et semblent influencer le métabolisme des sucres (256, 257, 265, 266). Une grande diversité des séquences génétiques métaboliques est observée pour les phylotypes de *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* (267).

Le microbiote intestinal des faux bourdons et de la reine est peu étudié; selon une étude, le faux bourdon présente une prédominance de *Lactobacillus* tandis que la reine présente une plus grande quantité de *Parasaccharibacter apium* (257).

Les bactéries de la famille *Enterobacteriaceae* comme *Serratia*, *Klebsiella* et *Enterobacter* sont davantage considérées opportunistes et présentes en plus grande quantité lors de déséquilibre (257). Par exemple, Yang et Cox-Forster ont observé une diminution de la survie et une amplification virale chez les abeilles parasitées lorsqu'ils sont injectés avec du *E. coli* (166). Il est encore difficile d'établir un lien entre le microbiome et l'infestation par *Varroa destructor*, mais une augmentation de l'abondance des bactéries intestinales aurait été observée en sa présence (175).

Une dysbiose intestinale diminue l'immunité et déstabilise le développement de l'abeille (256). Par exemple, une antibiothérapie peut changer la composition du microbiome, occasionnant une plus grande susceptibilité (moins grande résistance à la colonisation) aux infections par des bactéries opportunistes déjà présentes dans l'intestin, dont *Serratia* (268).

2.3.2 *Serratia marcescens*

Serratia marcescens est une bactérie Gram négative, pouvant être détectée à une faible abondance dans la flore normale intestinale des insectes (254). *Serratia* devient opportuniste lors d'immunosuppression, de facteurs environnementaux (dont les pesticides) et de modification du microbiote (254). La virulence a été observée chez les insectes lorsque *Serratia* se retrouve en circulation, après une colonisation et une pénétration de la muqueuse intestinale (254).

Selon Burritt *et al.*, la souche Ss1 de *Serratia marcescens* serait pathogène en occasionnant une septicémie (269). Cette souche a été isolée dans l'hémolymphe des abeilles infestées par *Varroa destructor* et chez varroa, ce qui suggère une transmission bactérienne lors d'infestation (269). La souche Ss1 semblerait coloniser seulement l'hémolymphe (sepsis).

Elle diminuerait la concentration en hémocytes et exprimerait des protéases cytotoxiques et DNase (269). *Serratia marcescens* semblerait détenir des propriétés pouvant la protéger du système immunitaire, en ne stimulant pas l'expression du gène pour AMP et phenoloxydase (254).

Chapitre 2 – Thème de recherche et innovation

Le principal but de ce mémoire est d'approfondir les connaissances sur les effets pathophysiologiques de *Varroa destructor* sur les abeilles en adaptant des outils diagnostiques permettant de faire un suivi rapproché des abeilles soumises à un haut taux d'infestation.

Le projet de recherche vise à mieux comprendre les répercussions biologiques d'une exposition prolongée à *Varroa destructor* sur l'état de santé des ruchers au Québec.

Varroa destructor est un des principaux facteurs occasionnant des pertes considérables de colonies d'abeilles en hiver. Malgré les récentes découvertes concernant ce parasite, une meilleure compréhension des interactions entre les différents facteurs de stress, comme les co-infections virales ou bactériennes, est importante pour estimer les chances de survie des ruchers. Cette étude a permis d'identifier des indices de pronostic de la santé des ruches fortement exposées à *Varroa destructor* qui pourraient être utiles dans de futures études.

De nos jours, les connaissances sont limitées en ce qui concerne les concentrations en sucres dans l'hémolymphe ainsi que leur régulation chez les abeilles. Le glucose sérique serait un paramètre permettant d'évaluer indirectement le métabolisme et les réserves chez les abeilles. Par conséquent, il pourrait être utile pour estimer l'état de santé de la colonie et ses chances de survie à l'hiver.

La relation entre l'abeille et varroa, occasionnant leur affaiblissement, reste à être éclairée. Le suivi rapproché des concentrations en sucres sériques et du taux d'infections (virales et bactériennes) pourrait aider à estimer indirectement les chances de survie à l'hiver.

2.1 Hypothèse

Les abeilles de ruches hautement infestées par *Varroa destructor* présentent des changements dans les concentrations en sucres de l'hémolymphe et un plus grand risque d'infection secondaire (bactérienne et virale).

2.2 Objectif

L'objectif est de déterminer l'impact de *Varroa destructor* sur l'hémolymphe (sucres sériques) et les infections chez l'abeille.

Les sous-objectifs sont :

1. Valider l'utilisation du glucomètre pour mesurer la concentration en sucres (glucose et tréhalose) dans l'hémolymphe des abeilles;
2. Évaluer les changements dans les taux de sucres sériques en fonction de la charge parasitaire de *Varroa destructor*;
3. Corréler l'infestation par *Varroa destructor* avec l'incidence des infections bactériennes et virales.

Chapitre 3 – Article 1 : Validation de l'utilisation du glucomètre chez les abeilles (sous-objectif 1)

Titre : Analytical validation of a portable human Accu-Chek glucometer in honeybee hemolymph

Antoine Cournoyer^{1,2}, Annie Deschamps³, Liza Bau-Gaudreault³, Pascal Dubreuil², Marie-Odile Benoit-Biancamano^{1,2}

1. Groupe de recherche sur les maladies infectieuses en production animale (GREMIP), Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada.
2. Centre de diagnostic vétérinaire de l'Université de Montréal, Département de pathologie et microbiologie, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada.
3. Charles River Laboratories, Senneville, Québec, Canada.

Short title : Validation of a glucometer in honeybees

Contribution des auteurs :

Conception et design : Antoine Cournoyer, Annie Deschamps, Liza Bau-Gaudreault, Pascal Dubreuil, Marie-Odile Benoit-Biancamano

Acquisition et analyse des données : Antoine Cournoyer

Interprétation des données : Antoine Cournoyer, Annie Deschamps, Liza Bau-Gaudreault, Pascal Dubreuil, Marie-Odile Benoit-Biancamano

Ébauche du manuscrit : Antoine Cournoyer

Révision du manuscrit : Antoine Cournoyer, Annie Deschamps, Liza Bau-Gaudreault, Pascal Dubreuil, Marie-Odile Benoit-Biancamano

Approbation finale : Antoine Cournoyer, Annie Deschamps, Liza Bau-Gaudreault, Pascal Dubreuil, Marie-Odile Benoit-Biancamano

Article publié dans *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, le 21 août 2022.

Référence : 2022;34(5):789-795. doi:10.1177/1040638722111723

3.1 Abstract

Glucose and trehalose are the main energy sources used by honeybees (*Apis mellifera*) for daily activities. However, there is no validated point-of-care method to reliably measure both sugars. We performed an analytical validation of a portable human glucometer (Accu-Chek; Roche) for glucose measurement in honeybee hemolymph compared to a reference method (GluCH, UniCel DxC 600; Beckman Coulter). We used 30 pooled hemolymph samples collected from the antennae of anesthetized honeybees and diluted 1:4 in 0.9% saline. We evaluated dilution linearity, spike recovery, and inter- and intra-assay imprecision. Glucose concentration was measured over time (2 h, 4 h, 8 h, 12 h, 1 d, 2 d, 3 d, 7 d, 21 d, 28 d) at various storage temperature (25°C, 4°C, -20°C, -80°C). The trehalose concentration was measured indirectly by trehalase hydrolyzation. Glucose concentrations measured by both instruments had a strong correlation (0.985, $p < 0.0001$) and a bias of -7.33 mmol/L ($\pm 1.96SD$: 13.70 to -28.36), with linear agreement at < 20 mmol/L (physiologic value: 100 mmol/L). The accuracy of the glucometer decreased at > 20 mmol/L. Recovery of 115–130% of diluted spikes indicated good specificity. Inter- and intra-assay imprecision were 2.50% and 2.21%, respectively. Glucose concentrations fluctuated in stored samples dependent on time and temperature; however, glucose concentrations were constant with storage at -80°C for ≥ 28 d. The Accu-Chek glucometer is an adequate instrument to measure honeybee glucose concentration in hemolymph diluted with 0.9% NaCl, with good accuracy and precision at < 20 mmol/L. Hemolymph storage at -80°C is suitable for long-term conservation of glucose.

Keywords: *Apis mellifera*, glucometer, glucose, hemolymph, honeybees, trehalase, trehalose

3.2 Introduction

Honeybee hemolymph distributes molecules, nutrients, and hormones to tissues and organs in an open circulatory system (10,32). Glucose, trehalose, and fructose are the main sugars used by honeybees as a source of energy for daily activities. The concentration of sugars in hemolymph is especially high in honeybees compared to other insects (33). Trehalose is the most important sugar used for flight and thermoregulation (22,31), and also plays a role in appetite regulation and energy metabolism. Trehalose, a very stable molecule composed of 2 D-glucose molecules, is synthesized and stored in fat bodies, and is converted into glucose and released in the hemolymph (3,15,29,32).

Measuring carbohydrates in hemolymph would be helpful to evaluate physiologic status, metabolism, and homeostasis in honeybees (8,19). Considering the major role of trehalose in honeybees, its measurement can be useful (22). Trehalase is an important enzyme in metabolism, response to stress, and regulation of trehalose concentrations in insects (24,27,29). A soluble form of trehalase has been isolated in insect hemolymph (27).

Although there is no RI for physiologic glucose values in honeybee hemolymph, glucose concentrations may vary from 11.1 to 83.2 mmol/L (1,16); the trehalose concentration can reach 222 mmol/L (7). Several analytic approaches have been used to evaluate sugar concentrations in hemolymph, including chromatography (5,22,23), enzymatic or colorimetric reaction (19,23), or refractometers (7). However, standard analytic techniques rely on access to a laboratory, large sample volumes, and higher costs. As an alternative, portable glucometers, which require small sample volumes and are used regularly in veterinary and human medicine for the rapid estimation and monitoring of glucose concentration (30), might be useful tools for beekeepers and researchers. Even though most glucometers have been designed for humans, the performance of glucometers has been evaluated and validated in several species, including cats, horses, dogs, deer, sheep, cattle, alpacas, and ferrets (26). Although one study reported using a glucometer to estimate glucose concentrations in bees (8), this method has not been validated for point-of-care

testing. The glucometer and spectrophotometer are intended to measure glucose only, and cross-reactions are not expected with trehalose and fructose. A glucometer might be useful in monitoring hemolymph glucose concentration in bees.

Our aims were: 1) to perform an analytical validation (accuracy, imprecision, cross-reaction) of a portable human glucometer (Aviva Accu-Chek, NC model; Roche) in honeybees and to assess its agreement with the reference method (UniCel DxC 600; Beckman Coulter); and 2) to assess the stability of glucose concentration in hemolymph over time at various storage temperatures.

3.3 Material and methods

3.3.1 Sample collection

Although insects are not covered by the Canadian Council on Animal Care guidelines, all procedures were performed while respecting ethical considerations. A honeybee hemolymph extraction protocol was executed (6). Per the recommended submission protocol to diagnostic centers (9), honeybees were anesthetized by exposure to dry ice (CO₂ and cold). Honeybees were placed on a Styrofoam plate, and their antennae were pulled out with clean tweezers followed by finger pressure on the thorax to exteriorize a hemolymph bulla, from which hemolymph was aspirated with a 2- μ L manual micropipette. Aspirated hemolymph was immediately transferred to an Eppendorf tube placed in iced water (0°C) to limit melanization. A single honeybee worker yields 0.5–2.5 μ L of hemolymph. We used ~2,500 honeybees for the entire experiment. All bees were euthanized by exsanguination.

3.3.2 Sample preparation

Saline (0.9% NaCl) was chosen as diluent and added to the pooled hemolymph. Two dilution factors for hemolymph samples were used depending on the experiment: 1:4

(method assessment, evaluation of imprecision and accuracy) and 1:9 (stability under storage conditions, trehalase protocol). For the remainder of the experiment, results are referenced as physiologic concentrations in honeybees, unless specified otherwise.

3.3.3 Measurement of glucose

We first determined hemolymph glucose concentration with an Accu-Chek human glucometer. Each new strip lot number (498557, 498586, 498688, 498769, 498717) was validated with Accu-Chek control solutions. Each sample was vortexed before analysis, and 1.5 μ L of sample was used for each assay. Glucose concentrations were also assessed with a UniCel DxC 600 spectrophotometer at the Centre de diagnostic vétérinaire de l'Université de Montréal (Québec, Canada), using 40 μ L of sample per measurement.

3.3.4 Accuracy

Inaccuracy was evaluated indirectly by investigating linearity under dilution and by spike-and-recovery analysis. Linearity was assessed using successive 1 in 2 dilutions (50%, 25%, 12.5%, 6.25%, 3.125%) with physiologic saline (0.9% NaCl) of freshly collected and pooled hemolymph from 30 honeybees. Linearity was evaluated on whether the slope deviated from one and the intercept from zero.

To evaluate the specificity of the Accu-Chek glucometer, a spike-and-recovery assay was performed. Hemolymph spikes at a known concentrations (9.85, 14.5, 16.4, 19.2 mmol/L) were respectively added to 15- μ L samples of hemolymph.

3.3.5 Imprecision

Inter- and intra-assay variations were assessed on 10 repeated measures (strip lot 498769). Fresh hemolymph samples from different collection days were pooled and stored at -20°C . Intra-assay imprecision (repeatability) was performed on 10 consecutive measurements within the same assay (21). Inter-assay imprecision (reproducibility) was assessed by

measuring glucose concentrations daily in duplicate from the aliquoted sample across analytical runs (over 5 d) (21).

3.3.6 Cross-reactions

Commercial, 10-mmol/L fructose (47740; MilliporeSigma) and 20-mmol/L trehalose (BP2687100; Thermo Fisher) solutions in 0.9% NaCl were used to assess the interference of those sugars with glucose measurement by the Accu-Chek glucometer and the UniCel DxC 600 spectrophotometer.

3.3.7 Method agreement

Groups of 16–30 worker honeybees were taken from 30 hives, and their hemolymph was combined to create 30 pooled samples at the Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, over the summer and fall of 2020. Samples were collected over 2 d and stored at -20°C in 250- μL Eppendorf tubes until glucose analysis. Glucose concentrations were measured with the Accu-Chek glucometer and a UniCel DxC 600 spectrophotometer 1 wk later within an interval of 3–4 h between the instruments. All measurements were done in duplicate.

3.3.8 Time and temperature storage conditions

Hemolymph samples were stored at different temperatures (24°C , 4°C , -20°C , -80°C) in 250- μL Eppendorf tubes for each time measurement (2, 4, 8, 12 h; 1, 2, 3, 7, 14, 21, 28 d). Glucose concentrations were measured with the Accu-Chek glucometer.

3.3.9 Trehalose measurement

Trehalase is an enzyme that hydrolyzes 1 molecule of trehalose into 2 molecules of glucose (Suppl. Fig. 1). To measure the trehalose concentration indirectly in hemolymph, we designed an enzymatic protocol using a trehalase solution from porcine kidney (T8778;

MilliporeSigma) diluted 1:9 with 0.9% NaCl, mixed with a hemolymph sample, and incubated at 37°C for 3 h at 20 rpm on a benchtop shaker (Suppl. Fig. 1). The trehalose concentration was measured indirectly by assessing the difference in glucose concentrations measured by the Accu-Chek glucometer before and after the enzymatic reaction. Commercial 10 mmol/L of trehalose (BP2687100; Thermo Fisher) was also spiked in hemolymph samples to determine the recovery of added trehalose and to hence assess the efficacy of the enzymatic reaction.

3.3.10 Statistical analysis

Pearson correlation was used to assess the linearity of plotted data. Mean and CV were calculated with Excel (v.2108; Microsoft). Agreement was evaluated through Bland–Altman plot and Passing–Bablok regression (ACOMED statistical Excel program v.2108) to compare Accu-Chek glucometer measurements with UniCel DxC 600 spectrophotometer measurements. For the Bland–Altman technique, differences in values of <20 mmol/L followed a normal distribution per a Shapiro–Wilk test ($p = 0.069$). No values were excluded.

3.4 Results

3.4.1 Accuracy

Dilutions of freshly collected hemolymph in 0.9% NaCl (50%, 25%, 12.5%, 6.25%, 3.125%) were linear and proportional according to expected concentrations (Fig. 1). The lower value measured by the glucometer was 0.3 mmol/L.

Recovery after spiking non-diluted hemolymph with a matrix of hemolymph samples was 86% at 9.85 mmol/L and 67% at 14.5 mmol/L (Table 1). On the other hand, recovery was higher when spiking diluted hemolymph samples at 16.4 mmol/L (115%) and 19.2 mmol/L (130%; Table 1).

3.4.2 Imprecision

Intra-assay CV of the Accu-Chek glucometer was 2.09–2.97% for glucose concentrations of 7.90, 14.8, and 22.0 mmol/L (measured value), respectively (Table 2). Inter-assay CV was 2.21% at 7.90 mmol/L (measured value), for a total CV of 2.15% (Table 2).

3.4.3 Cross-reactions

Trehalose and fructose were not detectable on Accu-Chek strips nor on the UniCel DxC 600 spectrophotometer (Suppl. Table 1).

3.4.4 Method agreement

Pearson correlation of 0.985 ($p < 0.0001$) highlights a positive, significant, and strong correlation between the Accu-Chek glucometer and the UniCel DxC 600 spectrophotometer (Fig. 2). The general equation including all 30 measurements was $y = 0.74x + 19.2$ (Fig. 2); when considering values < 100 mmol/L only, the equation became $y = 0.91x + 7.41$ (Fig. 3). Better linearity was observed with Passing–Bablok regression at < 100 mmol/L, with a slope closer to 1 (Fig. 3); this agreement was less at > 100 mmol/L (Fig. 2). Pooled sample measurements from both methods ($n = 30$), plotted with the Passing–Bablok regression analysis, show a proportional and constant error with a slope of 0.74 (95% CI: 0.68–0.80) and an intercept of 19.20 (95% CI: 13.2–25.2; Fig. 2).

Data ($n = 30$) in the Bland–Altman plot highlights a bias of -7.33 mmol/L (± 1.96 SD: 13.7 to -28.3 ; Fig 4). All data fall within the agreement limits and approximately -7 to 7 when < 100 mmol/L (Fig. 4); hence, a strong correlation is seen at < 100 mmol/L. A proportional error is seen at > 100 mmol/L; the difference of values measured by both instruments increased at > 100 mmol/L, as was observed with the Bland–Altman plot (Fig. 4).

The mean glucose concentration of the 30 hemolymph samples measured on the spectrophotometer was 103 mmol/L (yields 26.5–154 mmol/L); the Accu-Chek

glucometer reported a mean glucose concentration of 96.1 mmol/L (yields 29.5–134 mmol/L).

3.4.5 Time and temperature storage conditions

The glucose concentration increased quickly and at approximately the same rate during storage at 24°C and 4°C before reaching a plateau after ~2 d (Fig. 5). After 1.5 wk, the glucose concentration decreased to eventually reach 0 mmol/L (Fig. 5). When hemolymph samples were stored at –20°C, the maximal glucose concentration was reached after ~7 d and subsequently remained stable (Fig. 5). Storage at –80°C provided the best sample conservation; the glucose concentration remained stable over time (Fig. 5).

3.4.6 Trehalose measurement

After 3 h of incubation, the glucose concentration increased from 12.0 to 112 mmol/L in hemolymph samples (measured values: 2.40–22.5 mmol/L; Table 3), representing a physiologic trehalose concentration of 50.0 mmol/L (Table 3). A recovery of ~77% was observed when a hemolymph sample was spiked with 10 mmol/L of commercial trehalose, which shows acceptable efficacy of hydrolysis by the commercial trehalase. The expected measured glucose concentration after spiking trehalose in a sample was 4.44 mmol/L compared to 3.40 mmol/L measured by the Accu-Chek glucometer.

3.5 Discussion

To our knowledge, analytical validation of the Accu-Chek glucometer in honeybees has not been reported previously. The small CI observed in the Passing–Bablok regression indicates good precision of the Accu-Chek glucometer. Overall, inter- and intra-assay CVs were <10%, which indicates good reproducibility over time. Given that the ideal recovery is 80–120%, the glucometer had good specificity according to our spike-and-recovery experiment, and did not cross-react with trehalose and fructose.

Several conditions can interfere with Accu-Chek glucometer values and may explain differences in results between the Accu-Chek glucometer and the spectrophotometer. The instruments used in our evaluation measure the glucose concentration with different chemical reactions. The Accu-Chek glucometer strips use an electrochemical reaction, which results in oxidoreduction of D-glucose by glucose dehydrogenase (20); electrons are transferred to a mediator (ferricyanide) that generates a current proportional to the glucose concentration in analyzed samples (20). According to the manufacturer, the intra- and inter-assay CVs are respectively 3.6% and 2.5% for human blood, with linearity up to 33.3 mmol/L and a lower limit of detection of 0.6 mmol/L. Environmental factors such as temperature, humidity, and storage management of strips and samples may influence accuracy of the Accu-Chek strip (30). Physiologic factors, including pH, prandial state, and hematocrit may also alter analysis in whole blood (30). The UniCel DxC 600 spectrophotometer uses a hexokinase reaction, in which the residual absorbance change is correlated with the sample glucose concentration. This method requires a volume of ~50 μ L (undiluted or diluted) for a single measurement. A CV of ~3% is estimated, with linearity over 0.3–38.8 mmol/L.

Because we used 30 samples and a 3–4-h interval between instrument runs for the method agreement and 10 repeated measurements for the impression assessment, those criteria are limitations. Indeed, the latest ASVCP guidelines recommend 40 samples, a maximum 2-h interval, and 20 repeated measurements (2). Despite these limitations, we found good agreement between the instruments, and the glucometer had a low CV.

The Accu-Chek glucometer underestimates glucose concentration at concentrations >100 mmol/L (measured value of 20 mmol/L by the Accu-Chek glucometer). In fact, the regression flattens and becomes less linear at >100 mmol/L (measured value = 20 mmol/L). Given that the agreement between the methods is better at <20 mmol/L (measured value), samples should be diluted to reach concentrations below this level (0–20 mmol/L) for accurate results with the Accu-Chek glucometer. Dilution of hemolymph samples is therefore important to reach concentrations within the linear range of comparison with the reference spectrophotometer given that the physiologic glucose concentration in honeybee

hemolymph can be especially high, and can exceed the range of detection of the Accu-Chek glucometer. The actual values in honeybee hemolymph can be estimated after correcting for dilution.

Melanization of hemolymph samples is a phenoloxidase reaction that occurs in bees and results in polymerization and deposition of melanin on a wound or an infectious agent (14,18). This immune process darkens hemolymph when exposed to oxygen and affects buffer efficacy (18), consequently interfering with glucose measurement with glucometer strips. We did not assess the impact of melanization on glucose measurement in our analytical validation. Further studies would be needed to evaluate the inhibitory action of phenoloxidase over time by the addition of phenylthiourea to hemolymph samples (25). Melanization activity also depends on temperature, and decreases in a cooler environment (11).

The honeybee hemolymph pH (estimated at 6.8) (4) is lower than that of human blood (pH 7.35–7.45). Honeybee hemolymph acidifies when diluted with 0.9% NaCl and alkalinizes when melanized; however, the enzyme in glucometer strips is also sensitive to different pHs. Although studies on the effect of decreasing pH on glucose measurement are contradictory (17), lower or higher pH levels are known to interfere with the buffer in the glucometer strip, which can result in a false glucose decrease with acidosis and a false increase with alkalosis (17,28) Hematocrit influences glucose concentration estimation in human blood (17,30) However, hemocytes comprise <5% of the total hemolymph volume in insects (12); hence, such interference is less likely. Variation in sodium concentrations have been shown to interfere with the glucometer strip; indeed, it has been reported that glucose measurements are not reliable with Na concentrations >150 mmol/L (13). Hemolymph diluted with 0.9% NaCl contains ~70 mmol/L Na, which would not interfere with the glucose measurement. Based on our experience, samples must be warmed to room temperature before using the glucometer strips; the estimated glucose concentration is lower in cool samples (stored at –20°C).

Endogenous trehalase activity can greatly influence glucose concentrations in hemolymph samples depending on the time of measurement after collection. According to our findings, endogenous trehalase is still active at 24°C, 4°C, and -20°C, but the -20°C temperature decreased trehalase activity and therefore the glucose concentration increased at a slower rate.

As we observed, endogenous trehalase hydrolyzes trehalose and hence increases the glucose concentration, depending on storage conditions (time and temperature); concentrations stabilize after several days, when trehalose is no longer available for hydrolysis. The time to reach complete hydrolysis is temperature-dependent; colder temperature slows (-20°C) or stops (-80°C) hydrolysis. We found that the glucose concentration in stock samples stored at -20°C did not vary after 1 wk of storage, given that a plateau was reached at that point; therefore, we used hemolymph that was stored for 1 wk at -20°C for most experiments. Storage of hemolymph samples at 24°C or 4°C for periods of >7 d results in rapid decreases in glucose concentration, likely secondary to bacterial activity, given that hemolymph collection is a non-sterile procedure in which samples can be exposed to various bacterial flora.

Our use of commercial trehalase was effective in measuring indirectly the trehalose concentration in hemolymph samples. Because the recovery was <100% (77%), the measured trehalose concentration might be slightly lower than the actual trehalose concentration in honeybee hemolymph. This weakness also needs to be considered when interpreting the total sugar (glucose and trehalose) concentration in the hemolymph sample.

Sample storage may influence water volume in hemolymph samples. Indeed, the glucose concentration might change secondary to condensation. However, based on our experience (not shown), this phenomenon has less significance than endogenous trehalase activity.

3.6 Figures and tables

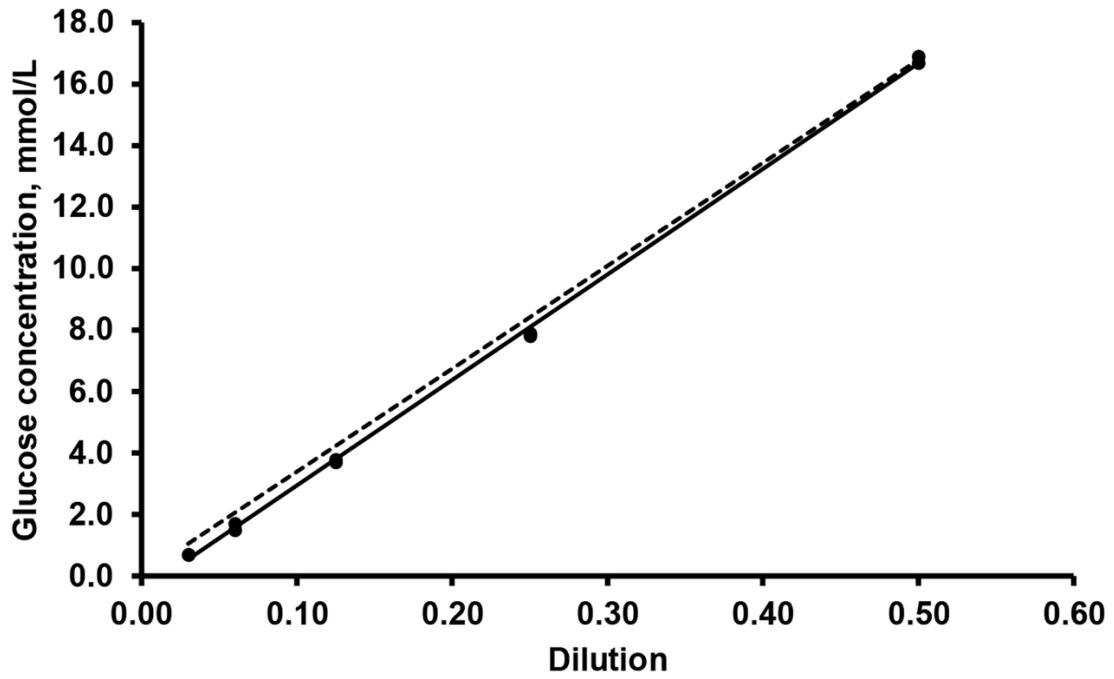


Figure 1. Linearity under sequential dilutions of pooled and non-diluted hemolymph (50%, 25%, 12.5%, 6.25%, 3.125%). Regression from data (solid line, $y = 34.3x - 0.48$) is close to expected values (dashed line, $y = 33.4x + 0.04$). Slope (34.3) from plotted data is similar to expected slope (33.4).

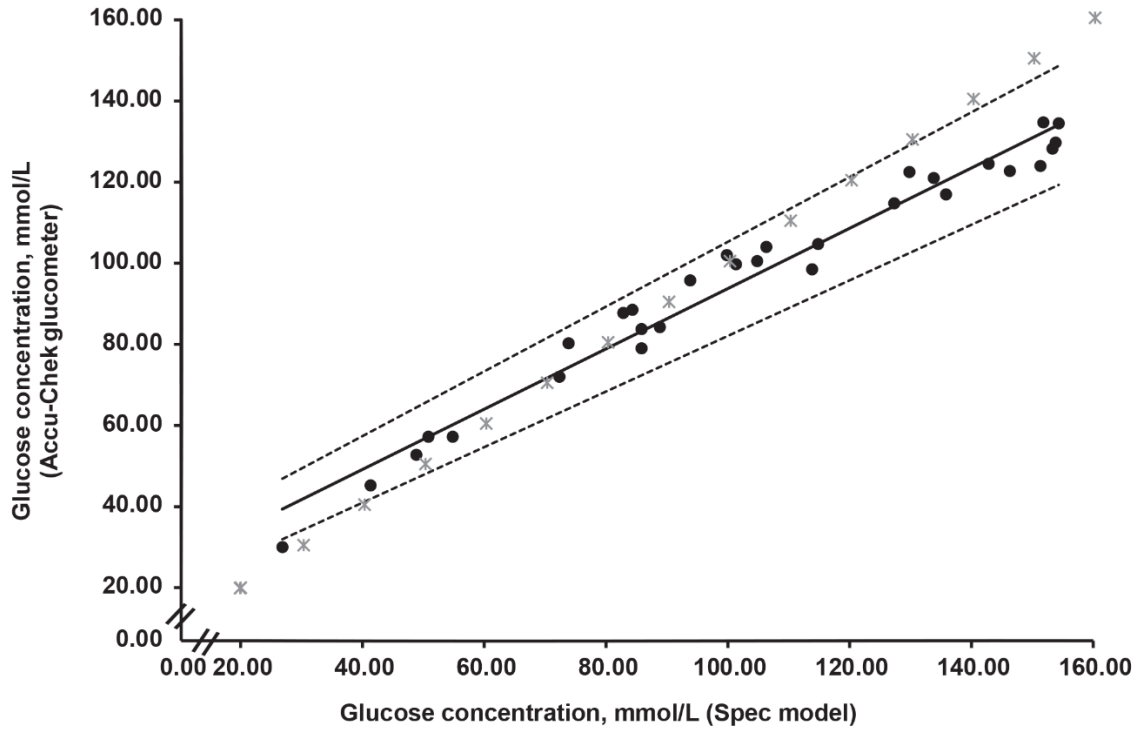


Figure 2. Passing–Bablok regression of glucose concentrations measured by 2 methods (UniCel DxC 600 spectrophotometer and Accu-Chek glucometer). Data are shown as dots. Solid line is the regression line (95% CI between dotted lines) with a slope of 0.74 (95% CI: 0.69–0.80) and an intercept of 19.2 (95% CI 13.3–25.2). Data <100 mmol/L are distributed around the gray solid line representing $x = y$ (linearity), which means good correlation. Data >100 mmol/L deviate from linearity, and the curve line is flattened. Thus, the difference between values from both methods increases and the Accu-Chek glucometer underestimates glucose concentration at >100 mmol/L compared to the spectrophotometer.

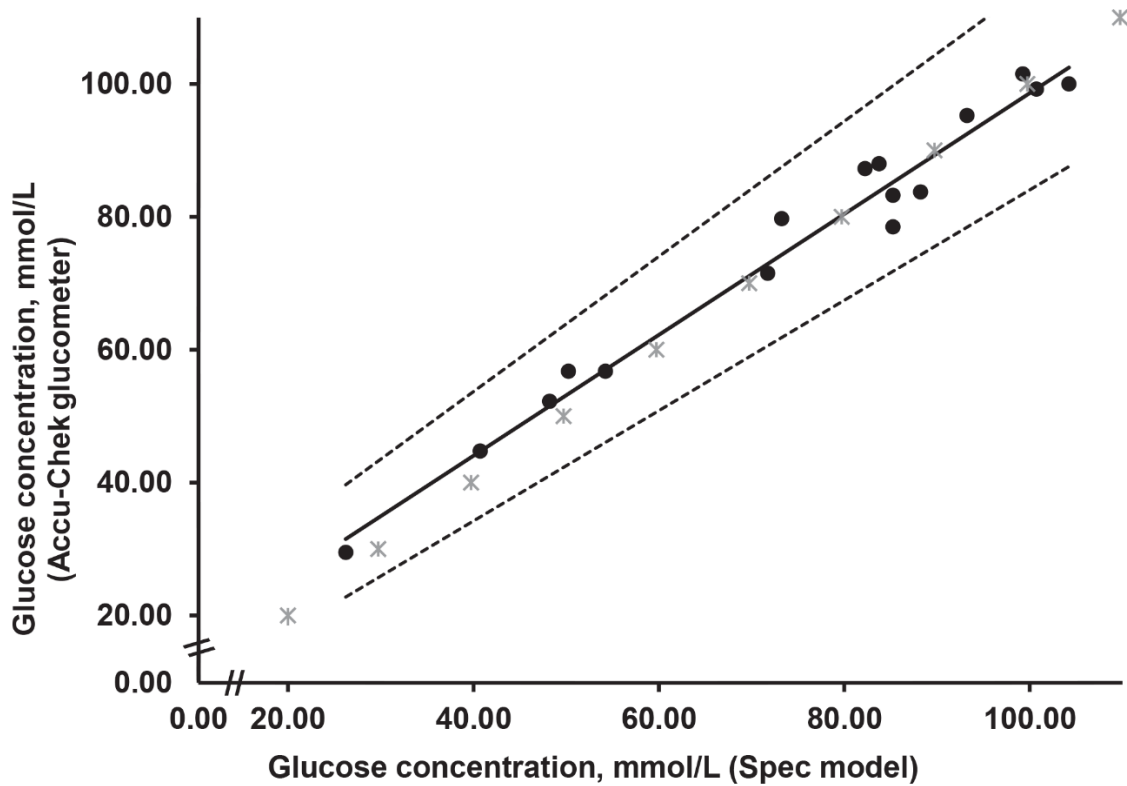


Figure 3. Passing–Bablok regression of glucose concentrations measured by 2 methods (UniCel DxC 600 spectrophotometer and Accu-Chek glucometer). Considering values <100 mmol/L (data shown as dots), regression line as a solid line (95% CI between dotted lines) has a slope of 0.91 (95% CI: 0.80–1.02) and an intercept of 7.71 (95% CI 0.79–12.7). There is better concordance between the instruments given that the slope is closer to 1 and data are grouped closely around the gray solid line (linearity).

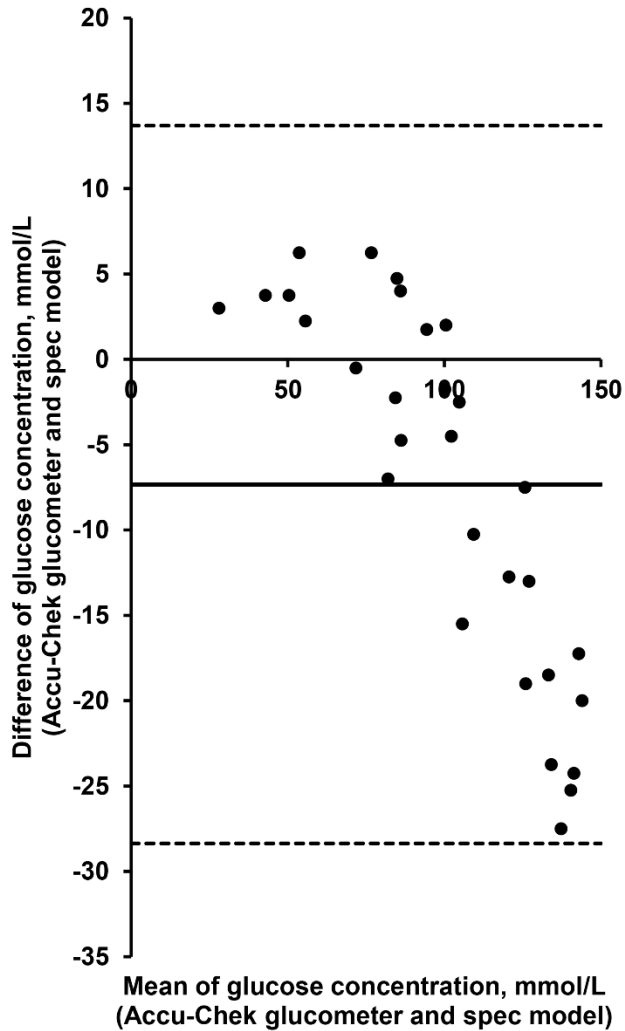


Figure 4. Bland–Altman plot of glucose concentrations measured by 2 methods (UniCel DxC 600 spectrophotometer and Accu-Chek glucometer). Differences between the methods fall within the dotted lines representing limits of agreement. Mean bias (systematic error, straight line) is estimated at -7.33 ($\pm 1.96SD$: 13.7 to -28.3). Differences are distributed at approximately 7 and -7 below 100 mmol/L, close to zero, as it should be. Above 100 mmol/L, a proportional error is observed, in which distance from zero increases as mean value of both methods increases.

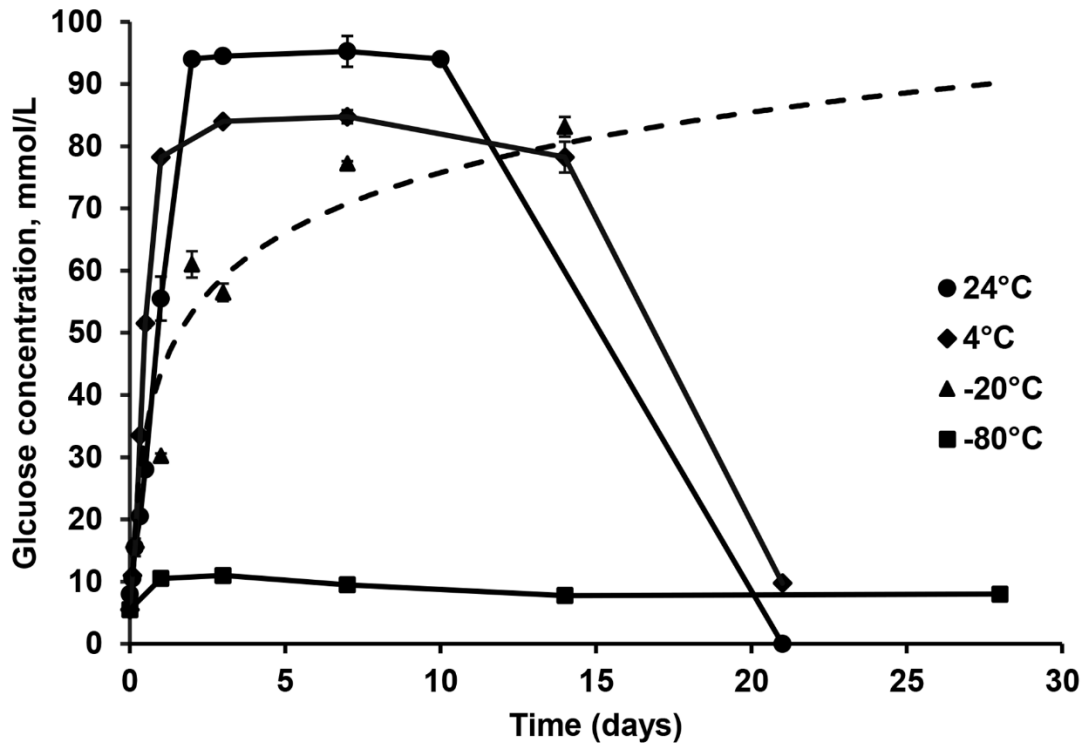


Figure 5. Glucose concentrations in pooled and hemolymph diluted 1:9 with 0.9% NaCl through time (2, 4, 8, 12 h; 1, 2, 3, 7, 14, 21, 28 d) at different storage temperatures (24°C, 4°C, -20°C, -80°C).

Table 1. Recovery of hemolymph spikes in a known concentration of a pooled hemolymph matrix.

Measured glucose concentration of hemolymph spike (mmol/L)	Recovery (%)
9.85	86
14.5	67
16.45	115
19.2	130

Table 2. Intra- and inter-assay CVs of an Accu-Chek glucometer with honeybee hemolymph.

Sample	Intra-assay		Inter-assay	
	CV, %	Concentration, mmol/L	CV, %	Concentration, mmol/L
Hemolymph	2.09	7.90	2.21	7.90
	2.97	14.8	*	*
	2.43	22.0	*	*
Human blood per manufacturer (Roche)	3.6	*	2.5	*

* No data available

Table 3. Glucose concentration in hemolymph samples during incubation with trehalase at 37°C over time.

Incubation time, h	Glucose concentration, mmol/L	Calculated trehalose concentration, mmol/L
0	12.0	50.2
3	112	0

3.7 Supplemental material

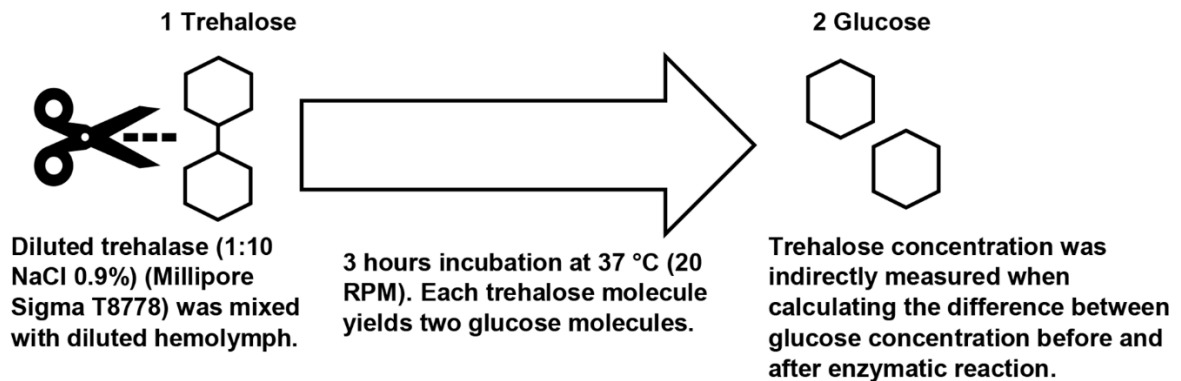
JVDI: Supplemental material

Cournoyer A, et al. Analytical validation of a portable human Accu-Chek glucometer in honeybee hemolymph

Supplemental Table 1. Honeybee glucose concentration measured by the Accu-Chek glucometer and the UniCel DxC 600 spectrophotometer in commercial trehalose and fructose solutions (solvent: 0.9% NaCl).

Solution	Value measured by Accu-Chek glucometer, mmol/L	Value measured by UniCel DxC 600 spectrophotometer, mmol/L
Trehalose (10 mmol/L)	Low	0.1
Fructose (20 mmol/L)	Low	0.3

The enzymatic protocol was executed as follows:



Supplemental Figure 1. Trehalase enzymatic protocol.

3.8 Acknowledgments

We thank Dr. Siavash Maghsoudi for his participation in the project.

3.9 Footnotes

Declaration of conflicting interests: The authors declared no potential conflicts of interests with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

Funding: Funding for our research was provided by Programme Innov'Action – MAPAQ (Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec) grant 2018-2023, and Fonds du centenaire – Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal.

3.10 References

1. Abou-Seif MA, et al. Fluctuations of carbohydrates in haemolymph of honeybee (*Apis mellifica*) after fasting, feeding and stress. *Horm Metab Res*; 1993;25:4–8. [PubMed] [Google Scholar]
2. Arnold JE, et al. ASVCP guidelines: principles of quality assurance and standards for veterinary clinical pathology (version 3.0): developed by the American Society for Veterinary Clinical Pathology's (ASVCP) Quality Assurance and Laboratory Standards (QALS) Committee. *Vet Clin Pathol* 2019;48:542–618. [PubMed] [Google Scholar]
3. Arrese EL, Soulages JL. Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. *Annu Rev Entomol* 2010;55:207–225. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
4. Bishop GH. Body fluid of the honey bee larva: I. Osmotic pressure, specific gravity, pH, O₂ capacity, CO₂ capacity, and buffer value, and their changes with larval activity and metamorphosis. *J Biol Chem* 1923;58:543–565. [Google Scholar]
5. Blatt J, Roces F. Haemolymph sugar levels in foraging honeybees (*Apis mellifera carnica*): dependence on metabolic rate and in vivo measurement of maximal rates of trehalose synthesis. *J Exp Biol* 2001;204:2709–2716. [PubMed] [Google Scholar]
6. Borsuk G, et al. A new method for quick and easy hemolymph collection from Apidae adults. *PLoS One* 2017;12:e0170487. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
7. Božič J, Woodring J. Effect of activity on the haemolymph sugar titres in honey bees. *J Apicult Res* 1997;36:33–39. [Google Scholar]

8. Buckemüller C, et al. Octopamine underlies the counter-regulatory response to a glucose deficit in honeybees (*Apis mellifera*). *Front Syst Neurosci* 2017;11:63. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
9. Canadian Council on Animal Care. CCAC guidelines on: euthanasia of animals used in science. CCAC, 2010.
<https://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Euthanasia.pdf>
10. Chan QWT, et al. Quantitative comparison of caste differences in honeybee hemolymph. *Mol Cell Proteomics* 2006;5:2252–2262. [PubMed] [Google Scholar]
11. Clark KD, Strand MR. Hemolymph melanization in the silkworm *Bombyx mori* involves formation of a high molecular mass complex that metabolizes tyrosine. *J Biol Chem* 2013;288:14476–14487. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
12. Clark ME, Jones JC. Hematocrit method for determining total hemocyte counts of larvae of the tobacco budworm, *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). *Ann Entomol Soc Am* 1980;73:683–685. [Google Scholar]
13. Dimeski G, et al. Glucose meters: evaluation of the new formulation measuring strips from Roche (Accu-Chek) and Abbott (MediSense). *Ann Clin Biochem* 2010;47:358–365. [PubMed] [Google Scholar]
14. Dudzic JP, et al. More than black or white: melanization and toll share regulatory serine proteases in *Drosophila*. *Cell Rep* 2019;27:1050–1061.e3. [PubMed] [Google Scholar]
15. Even N, et al. General stress responses in the honey bee. *Insects* 2012;3:1271–1298. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
16. Fell RD. The qualitative and quantitative analysis of insect hemolymph sugars by high performance thin-layer chromatography. *Comp Biochem Physiol A Physiol* 1990;95:539–544. [Google Scholar]
17. Gerber KL, Freeman KP. ASVCP guidelines: quality assurance for portable blood glucose meter (glucometer) use in veterinary medicine. *Vet Clin Pathol* 2016;45:10–27. [PubMed] [Google Scholar]
18. Harrison JF, et al. *Ecological and Environmental Physiology of Insects*. Oxford University Press, 2012. [Google Scholar]
19. Hartfelder K, et al. Standard methods for physiology and biochemistry research in *Apis mellifera*. *J Apicult Res* 2013;52:1–48. [Google Scholar]

20. Hill B. Accu-Chek® Advantage: electrochemistry for diabetes management. *Current Separations* 2005;21:45–48. <http://www.currentseparations.com/issues/21-2/cs21-2c.pdf> [Google Scholar]
21. Jensen AL, et al. Diagnostic test validation. In: Weiss DJ, et al., eds. *Schalm's Veterinary Hematology*. 6th ed. Wiley, 2010:1027–1031. [Google Scholar]
22. Mayack C, et al. Gas chromatography–mass spectrometry as a preferred method for quantification of insect hemolymph sugars. *J Insect Physiol* 2020;127:104115. [PubMed] [Google Scholar]
23. Mayack C, Naug D. Parasitic infection leads to decline in hemolymph sugar levels in honeybee foragers. *J Insect Physiol* 2010;56:1572–1575. [PubMed] [Google Scholar]
24. Nardelli A, et al. The evolutionary history and functional divergence of trehalase (treh) genes in insects. *Front Physiol* 2019;10:62. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
25. Ryazanova AD, et al. The phenylthiourea is a competitive inhibitor of the enzymatic oxidation of DOPA by phenoloxidase. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2012;27:78–83. [PubMed] [Google Scholar]
26. Selleri P, et al. Performance of two portable meters and a benchtop analyzer for blood glucose concentration measurement in rabbits. *J Am Vet Med Assoc* 2014;245:87–98. [PubMed] [Google Scholar]
27. Shukla E, et al. Insect trehalase: physiological significance and potential applications. *Glycobiology* 2015;25:357–367. [PubMed] [Google Scholar]
28. Tang Z, et al. Effects of pH on glucose measurements with handheld glucose meters and a portable glucose analyzer for point-of-care testing. *Arch Pathol Lab Med* 2000;124:577–582. [PubMed] [Google Scholar]
29. Thompson SN. Trehalose – the insect ‘blood’ sugar. In: Simpson SJ, ed. *Advances in Insect Physiology*. Vol. 31. Academic Press, 2003:205–285. [Google Scholar]
30. Tonyushkina K, Nichols JH. Glucose meters: a review of technical challenges to obtaining accurate results. *J Diabetes Sci Technol* 2009;3:971–980. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
31. Vidal-Naquet N, et al. *Honeybee veterinary medicine: Apis mellifera L.* 5M Publishing, 2015. [Google Scholar]

32. Wegener G, et al. Long-term effects of the trehalase inhibitor trehazolin on trehalase activity in locust flight muscle. *J Exp Biol* 2010;213:3852–3857. [PubMed] [Google Scholar]
33. Zachariah TT. Terrestrial invertebrates. In: Heatley JJ, Russell KE, eds. *Exotic Animal Laboratory Diagnosis*. Wiley, 2020:409–428. [Google Scholar]

Chapitre 4 – Article 2 : Évaluation des taux de sucres sériques et de l'incidence des infections secondaires en fonction la charge parasitaire de *Varroa destructor* (sous-objectifs 2 et 3)

Titre : Effects of *Varroa destructor* on hemolymph sugars and secondary infections in honeybees (*Apis mellifera*)

Antoine Cournoyer ^{1,2}, Laurence Plamondon ³, Liza Bau-Gaudreault ⁴, Annie Deschamps ⁴, Pascal Dubreuil ², Marie-Odile Benoit-Biancamano ^{1,2,*}

1. Groupe de recherche sur les maladies infectieuses en production animale (GREMIP). Faculté de médecine vétérinaire, Saint-Hyacinthe, QC, J2S 2M2, Canada ; antoine.cournoyer.1@umontreal.ca, marie-odile.benoit-biancamano@umontreal.ca,
2. Centre de diagnostic vétérinaire de l'Université de Montréal, Département de pathologie et microbiologie, Faculté de médecine vétérinaire, Saint-Hyacinthe, QC, J2S 2M2, Canada ; antoine.cournoyer.1@umontreal.ca, pascal.dubreuil@umontreal.ca, marie-odile.benoit-biancamano@umontreal.ca
3. Département de biologie, Université Laval, Québec, QC, G1V 0A6, Canada; laurence.plamondon.2@ulaval.ca
4. Charles River Laboratories, Senneville, QC, H9X 1C1, Canada ; liza.bau-gaudreault@crl.com, annie.deschamps@crl.com,

Contribution des auteurs :

Conceptualisation: Antoine Cournoyer, Liza Bau-Gaudreault, Annie Deschamps, Pascal Dubreuil, Marie-Odile Benoit-Biancamano

Analyse : Antoine Cournoyer, Liza Bau-Gaudreault, Annie Deschamps, Pascal Dubreuil, Marie-Odile Benoit-Biancamano

Investigation: Antoine Cournoyer, Liza Bau-Gaudreault, Annie Deschamps, Pascal Dubreuil, Marie-Odile Benoit-Biancamano

Ressources: Antoine Cournoyer, Liza Bau-Gaudreault, Annie Deschamps, Pascal Dubreuil, Marie-Odile Benoit-Biancamano

Gestion des données : Antoine Cournoyer, Laurence Plamondon

Rédaction – Premier ébauche : Antoine Cournoyer

Rédaction – révision et édition : Antoine Cournoyer, Laurence Plamondon, Liza Bau-Gaudreault, Annie Deschamps, Pascal Dubreuil, Marie-Odile Benoit-Biancamano

Visualisation: Antoine Cournoyer

Supervision: Liza Bau-Gaudreault, Annie Deschamps, Pascal Dubreuil, Marie-Odile Benoit-Biancamano

Financement : Liza Bau-Gaudreault, Pascal Dubreuil, Marie-Odile Benoit-Biancamano

Article publié dans *Applied Sciences*, le 16 novembre 2022.

Référence : 12(22), 11630; <https://doi.org/10.3390/app122211630>

4.1 Abstract

The European honeybee contributes to the agriculture by its pollination; however, the overwintering loss rate over the last decades is worrisome. *Varroa destructor* is considered one of the most important causes of bee colony declines. This project aims to correlate the infestation by varroa to the hemolymph sugar concentrations and bacterial and viral coinfections. Six highly infested and six control hives were compared over time. Pooled hemolymph samples from honeybees were collected for sugar concentration measurements using a previously validated portable glucometer. The hemolymph samples were submitted for bacteriology. Multiplex RT-PCR analysis was performed on honeybees for six viruses: DWV-A, DWV-B, BQCV, ABPV, KBV, and IAPV. There was also no predominance of pathogenic bacteria. In September, sugar concentrations in hemolymph were significantly lower in highly infested hives than in control hives. Infested hives showed markedly higher viral loads except for ABPV. DWV-A and BQCV viral loads from highly infested hives were significantly higher in September compared to July. A continued and severe exposure to varroa leads to increased viral charges and decreased sugar concentrations, suggesting alterations in immunity, metabolism, and reserve mobilization. These parameters contribute to the weakening and mortality of the colonies.

Keywords: honeybee; disease; pathogen; DWV; BQCV; ABPV; KBV; IAPV; sugar; hemolymph

4.2 Introduction

Honeybees are an important and fascinating species for humans, with regards to their complex social structure, honey production, and pollination of cultivated crops. Honeybees in temperate climates gain specific physiologic characteristics throughout the seasons to adapt for overwintering [1,2,3,4]. Overwintering honeybees show an increased life span [5,6] as well as a larger fat body for better storage of nutrients, such as lipids and proteins, required to respond to the great energy expenditure throughout the winter, from the vibration of their wings to regulating the temperature within the hive [1,7,8,9,10].

The increased honeybee mortality rate has become a worrying issue in the last three decades for both the scientific and general population. A Colony Losses Monitoring (COLOSS) survey showed a winter beehive loss rate around 20–25% in Europe [11]. In Canada, the beehive loss rate even reached 45.5% in the winter of 2022, corresponding to the highest recorded loss since 2007 [12]. This phenomenon is reported to be caused by several factors, most particularly by the parasite *V. destructor* [12,13]. Varroa is thus a great threat for *Apis mellifera* in temperate areas [14].

Varroa has a life cycle that follows that of the honeybee's [15]: the female varroa produces eggs within the honeycomb where the bee pupae grow, causing a weakening of the emerging honeybee [16]. The varroa mother and daughters continue to feed on the adult honeybee, further weakening the bearer [16]. Varroa can also transfer viruses to developing and adult bees when feeding, thus spreading and intensifying viral loads [15,16,17,18]. Evidence of mite contribution in viral transmission (vector role) is clearly demonstrated for deformed wing virus (DWV), acute bee paralysis virus (ABPV), cashmere honeybee virus (KBV), and Israeli acute paralysis virus (IAPV) [15,16,17,18] (Table A1).

Varroa feeds on the hemolymph and the fat body of the honeybees [19], an organ playing a key role in honeybee overwintering [1] and in metabolic functions such as growth, neural control, immunity, detoxification, and nutrient storage [20,21].

Since varroa infestations lead to altered metabolism and reserve mobilization, sugar concentrations in hemolymph might fluctuate directly from parasite consumption or indirectly from parasitic stress and co-infections [22]. Glucose and trehalose, which are produced in the fat body, are the main energy substrates for honeybees during their flight and their thermoregulation [20,23].

Varroa is also known to affect the immune system of the honeybee by decreasing expression of immune genes such as apidaecin [16,24,25] and by decreasing hemocyte counts and melanin synthesis, both playing key roles in immunity [16,26]. Therefore, the susceptibility to opportunistic agents is likely to increase in Varroa-infested honeybees. As a matter of fact, some researchers showed that *Serratia marcescens*, a commensal bacterium from the gut, can induce bacteremia with varroasis [27]. Burritt et al. even isolated a cytotoxic strain (Ss1) of *S. marcescens* in the hemolymph of dying, infested, and overwintering honeybees as well as in varroa mites [27,28].

Diagnostic techniques are currently lacking to evaluate the physiologic and biological impacts of varroa on honeybees. An innovative way to improve knowledge would be to adapt diagnostic techniques commonly used in veterinary medicine (i.e., biochemistry, glucometer, RT-PCR, bacteriology) to monitor the health status of honeybees and, consequently, help beekeepers prevent winter losses and better manage the beehives.

The objective of this study was to determine the impact of varroa infestation on the sugar concentrations in honeybee hemolymph over time and on the presence of concomitant viral and bacterial infections.

4.3 Materials and methods

4.3.1 Cohort Study

A cohort study was planned using 12 hives, including 6 highly infected by varroa mites (Nos. 505, 593, 503, 522, 345, and 427) and 6 control hives (Nos. 465, 208, 258, 328, 277, and 321) from the Centre de recherche en sciences animales de Deschambault (CRSAD, Deschambault, QC, Canada). Highly infested and control hives were located 34.8 km apart.

Highly infested hives were one year old and originally maintained for research purposes. The high level of mite infestation was achieved by avoiding any miticidal treatment in the fall preceding the study, adding drone brood and operculated brood, and exchanging worker honeybees between colonies. No varroa mite was directly introduced in the hives. Highly infested hives had 5 to 7 frames at the beginning of the experimentation.

Control hives were two years old and originally dedicated to queen breeding. Control hives had two honey supers throughout the experimentation. The control hives were treated with oxalic acid and strips (amitraz) in the preceding fall.

All hives shared similar genetics derived from sister queens of lineage 416 developed by the CRSAD. Queens from the highly infested hives were one year old at the time of sampling, and those from the control hives were two years old.

4.3.2 Parasitic Load

The parasitic load of *Varroa destructor* within each hive was monitored using a sticky board on the bottom floor of each beehive. Daily mite falls were recorded over periods of approximately 5 to 7 days (Table A2).

4.3.3 Honeybee Sampling

Although insects are not covered by the Canadian Council on Animal Care guidelines, all procedures were performed while respecting ethical considerations. Samples of worker honeybees were collected at different time points, as specified in the following sections. On each occasion, worker honeybees were captured from the honey super of each examined hive and placed in a jar with a net and a plastic lid. Samples (n = 250 worker honeybees/time/hive) were transported to the laboratory of the Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal (Saint-Hyacinthe, QC, Canada) by car. Upon reception, samples were immediately processed for hemolymph extraction. Additional worker honeybees (n = 10/time/hive) were stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ for further viral analysis.

4.3.4 Honeybee Sample

At three different time points (on 19 June, 2 August, and 18 September 2019), 40 worker honeybees were used. Honeybees were anesthetized with dry ice (CO_2) and their hemolymph was collected as per Borsuk and al [29]: the antenna was pulled out with clean tweezers, and finger pressure on the thorax created a hemolymph bulla, which was aspirated with a micropipette [29]. Hemolymph samples were pooled in an Eppendorf tube maintained at $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ (iced water) to limit melanization [30]. Pooled hemolymph samples from each hive were used for glucose and trehalose measurement and bacteriological culture.

4.3.5 Sugar Concentrations

Sugar concentrations in hemolymph were assessed at three time points (on 19 June, 2 August, and 18 September 2019), where $10\text{ }\mu\text{L}$ of pooled hemolymph was mixed with saline solution (0.9% NaCl) (1:4 dilution). The glucose concentration in hemolymph was measured five times with a human Accu-Chek glucometer, previously validated for honeybee hemolymph [31]. Trehalose concentrations were indirectly measured five times by the glucometer following trehalase hydrolyzation, which consisted of adding

commercial trehalase (Millipore Sigma, T8778, Burlington, MA, USA) to samples, followed by 3 h incubation at 30 °C [31].

4.3.6 Bacteriology

Hemolymph samples from each hive and time point (on 19 June, 2 August, and 18 September, 2019) were submitted for aerobic bacterial culture: 2 µL per sample of pooled, diluted 1:9 (0.9% NaCl) hemolymph was used to inoculate a Columbia agar medium with 5% sheep blood (CBA) (BD Difco, Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada) and a brain heart infusion (BHI) broth (BD Difco, Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada). Media were incubated at 35 °C ± 2 °C for 48 h. When turbid, the BHI broth was plated on CBA and MacConkey agar (BD Difco, Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada) and incubated at 35 °C ± 2 °C for 24 h. Bacteria were identified using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS, Bruker Daltonics, Bremen, Germany). A qualitative approach was used to quantify each bacterial isolate on Columbia Blood Agar (Excel File S1). Bacteria recovered only in BHI broth were recorded as present or absent.

4.3.7 Virology

Viral analyses on honeybees from the cohort study were conducted to assess the presence of specific viruses (DWV-A, DWV-B, BQCV, ABPV, KBV and IAPV) with RT-qPCR on honeybees collected on 18 July and 26–27 September 2019. Each sample consisted of a pool of 10 worker honeybees originating from each hive at each time point.

Frozen (−80 °C), pooled honeybee samples (n = 10) were placed in stainless metal tubes (P000952-LYSK0-A.0, Bertin Corp, Rockville, MD, USA) and lysed by bead beating (ceramic beads Bertin Corp, P000931-LYSK0-A.0, Bertin Corp, Rockville, MD, USA) with liquid nitrogen. Stainless tubes were transferred and homogenized during 10 s at 8800 rpm and 0 °C (Combo Precellys Evolution + Cryolys, K002198-PEVO0-A.0, Bertin Corp, Rockville, MD, USA). Each resulting homogenized and powdered sample (50 ± 5 mg) was

transferred to a 1.5 mL Eppendorf tube on dry ice. RNA was isolated using TriZol (Invitrogen, Waltham, MA, USA) and purified with a Direct-zol kit RNA miniprep (Zymo, Irvine, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Quantification and purity of extracted RNA were evaluated using the Infinite M200 Pro device (Tecan, Männedorf, Switzerland). Extracted RNA samples were stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

For reverse transcription (RT-PCR), extracted RNA samples were used to generate complementary DNA (cDNA) by using qScript cDNA SuperMix (Quantabio, Beverly, MA, USA) as per manufacturer's instructions; cDNA master mix was stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ and used for PCR assays.

For PCR assays, two multiplex PCR reactions were carried out using pairs of primers as described in Table S3. Primers were designed from viral genomic sequences in the GenBank database. For each multiplex PCR assay, $18\text{ }\mu\text{L}$ multiplex mix (complete formula in Table S3) and $2\text{ }\mu\text{L}$ of DNA were used for each reaction. The first multiplex reaction (IAPV, BQCV, KBV, and actin) required one cycle of denaturation and enzymatic activation at $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 3 min, followed by 40 cycles at $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ of 5 s and $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ of 45 s. The second multiplex reaction (DWV-A, DWV-B, ABPV, and actin) consisted of one cycle of denaturation and enzymatic activation at $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 3 min, followed by 40 cycles at $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ of 5 s and $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ of 20 s. Quantification of expressed genes from PCR was assessed with TaqMan qRT-PCR using the AriaMx software (Agilent, Santa Clara, CA, USA). Data from AriaMx software was exported into a Microsoft Excel file. Standard curves were prepared by 10-fold serial dilutions (103 to 109) of DNA segments that included target and referenced amplicons (gBlock, IDT, Coralville, IA, USA). The number of copies was reported for each amplification.

4.3.8 Statistical analysis

All analyses were performed within the R statistical environment. The Shapiro–Wilk test was used to determine if data or residuals were normally distributed (except for sugar concentration, where the Anderson–Darling test was used). A Levene test was used to

assess the variance in the homogeneity of data. If data followed a normal distribution, and variance was homogeneous, t-test, lineal model, or linear mixed models (LMM) were used. Otherwise, nonparametric methods (Mann–Whitney or Wilcoxon tests for paired data) were used.

Natural varroa mite fall in each group (Excel File S2) was compared over determined time periods. The average of natural varroa mite fall in each hive over each period was compared with a LMM with the group (control vs. varroa), periods, and the interaction between treatment and period as fixed factors. Hive identity was used as a random factor considering auto-replication. A posteriori comparison (post hoc Tukey test) was performed combined with a downward adjustment of the alpha level with the Bonferroni correction. Post hoc Tukey test helped to elucidate which specific period showed significant differences between group means.

For sugar (glucose + trehalose) concentration analysis, the average of the five replicates of combined sugar concentrations for each hive at each time point was compared using a LMM with the group (control vs. varroa), time (19 June, 2 August, or 18 September 2019), and the interaction between treatment and time as fixed factors and treatment nested within the hive as a random factor. A priori contrasts between pairs of means were performed combined with a downward adjustment of the alpha level with the Benjamini–Hochberg procedure.

Several statistical tests were used for the six studied viruses. A Mann–Whitney test was performed between ratios of KBV, ABPV, DWV-A, and DWV-B/actin in each group (control vs. varroa). A Wilcoxon test was performed for paired data (KBV, ABPV, DWV-A, and DWV-B/actin) to assess the effect of time. A linear model was used to determine the relationship between the ratios of BQCV/actin and both group and time. Mean ratios of IAPV/actin were compared between groups (control vs. varroa) with a t-test. Data from the highly infested hive No. 345 was removed from the analysis since a varroa mite was mistakenly included in the pooled honeybee sample.

4.4 Results

4.4.1 Parasitic Load

The natural daily varroa mite fall was significantly higher in infested hives (averaging 67–230 fallen varroa mites/day) compared to control hives (averaging 4.30–12.56 fallen varroa mites/day) from mid-July to late September ($p < 0.0001$), excluding June ($p = 1.00$, post hoc Tuckey test in LMM) (Figure 1). The number of fallen varroa at the bottom of the hives in the highly infested group significantly increased over time ($p < 0.0001$, post hoc Tuckey test in LMM) (Figure 1) from July to late September, with the highest count recorded in September with 230 fallen varroa mites/day.

4.4.2 Sugar Concentrations in Honeybee Hemolymph

Sugar (glucose and trehalose) concentrations at the first two time points (19 June and 2 August) were similar between groups and stayed relatively constant. At the third time point (18 September), highly infested hives showed a significantly lower concentration of sugars in hemolymph (mean concentration = 289.44 ± 46.39 mmol/L) compared to control hives (mean concentration = 390.11 ± 61.03 mmol/L) ($p < 0.001$, a priori contrasts in LMM) (Figure 2). Combined sugar concentration in hemolymph was significantly higher in the control hive group on 18 September compared to the first collection time points (19 June and 2 August) ($p \leq 0.0001$, a priori contrast in LMM) (Figure 2).

4.4.3 Bacteriology

There were no predominant bacteria detected in either highly infected or in control hives aside from nonpathogenic bacteria: *Lactobacillus* spp., *Staphylococcus epidermidis*, *Staph. aureus*, *Klebsiella* spp., or *Enterobacteriaceae*. *Serratia marcescens* was only identified in one control hive (No. 328) and one infested hive (No. 522) (Excel File S1).

4.4.4 Virology

Multiplex PCR results show viral co-infections (DWV-A, DWV-B, BQCV, ABPV, KBV, and IAPV) with higher viral loads when honeybees were highly infested by varroa. A significant difference in viral loads (copies/actin) between infested and control groups was observed at each sampling time ($p = 0.013, 0.036, 0.004,$ and <0.0001 ; t-test, Mann–Whitney and linear model) except for ABPV (Figure 3, Figure 4 and Figure 5). Viral loads were significantly higher ($p < 0.05$) in late September than in late July for DWV-A and BQCV (Figure 3a and Figure 4a). There was also a trend toward an increased viral load throughout time for KBV and ABPV (Figure 4b and Figure 5a) but not for DWV-B and IAPV.

The ratios (copies/actin) of DWV-A, DWV-B, BQCV, ABPV, KBV, and IAPV in control hives were near zero or non-detectable over time (from late July to late September) (Table S4).

DWV-A loads were significantly higher in infested hives at each time point ($p < 0.05$, Mann–Whitney test) than in the controls, with a significant increase ($p = 0.001$, Wilcoxon test) over time (from late July to late September) (Figure 3a). In July, most infested hives had DWV-A loads that were near zero, except for hives No. 345 and No. 593, with ratios of 2.33 and 3.11, respectively (Table S4). In late September, DWV-A ratios varied from 16.99 to 112.90 in the infested hive group (Table S4).

For each sampling time, DWV-B loads were significantly higher in the infested group than in the control ($p < 0.05$, Mann–Whitney test) (Figure 3b). Throughout the experiment (from late July to late September), the DWV-B loads in the infested group remained unchanged ($p > 0.10$, Wilcoxon test) (Figure 3b), with ratios (copies/actin) from 0.76 to 17.65 (Table S4).

BQCV loads was significantly different between the two studied groups ($p < 0.001$, linear model) (Figure 4a). From late July to late September, there was a great increase of BQCV

loads in highly infested hives ($p < 0.001$, linear model) (Figure 4a), with ratios (copies/actin) varying from 3.70 to 29.11 and reaching up to 170.36 for the hive No. 522 (Table S4).

KBV loads from the hives with severe parasitic loads were significantly higher than the controls ($p < 0.001$, Mann–Whitney test) and without an increase over time ($p > 0.05$, Wilcoxon test) (Figure 4b). In late July, KBV ratios were relatively low, from 2.66 to 5.63 in highly infested hives (Table S4). In late September, ratios remained similar to the first time point for most hives: ratios were from 4.49 to 31.38 but were much higher in the hive No. 522, with a ratio of 65.02 (Table S4).

In late September, ABPV ratios were 8.13 and 11.98 in infested hives No. 522 and No. 505 (Table S4). There were no significant differences between the two studied hive groups at each time point ($p > 0.10$, Mann–Whitney test) nor a significant increase in time ($p = 0.27$, Wilcoxon test) (Figure 5a).

In late September, IAPV loads were significantly higher in infested hives than in control hives ($p = 0.013$, t-test) (Figure 5b), with high ratios of 60 and 80 in the infested hives No. 522 and No. 505, respectively (Table S4).

However, ABPV and IAPV ratios were near zero or non-detectable in the other hives of both groups throughout the experimentation (Table S4).

4.5 Discussion

4.5.1 General Discussion

This study, including hives exposed to extreme loads of varroa mites, helps to understand the progression of viral infections and sugar concentrations in hemolymph throughout the season in correlation with the degree of infestation.

During the summertime (June and July), honeybees were able to maintain their homeostasis despite the parasitism, which was reflected by the stability of sugar concentrations in hemolymph. In the fall (late September), viral loads increased significantly, and the combination of a high parasitism and viral infections led to an alteration of their metabolism, demonstrated by the decreased sugar concentrations in hemolymph. This cohort study was initially planned to continue throughout overwintering. However, three weeks after the last time point (late September), four highly infested hives were dead, and the two others were very weak, containing only a handful of live bees.

The particularity of this study is its use of sugar concentrations in hemolymph as a predictive indicator of honeybee winter loss. However, further studies need to be performed to confirm this hypothesis.

4.5.2 Parasitic Load Monitoring

The infested beehives had an extremely high infection rate, with a mean drop of 145 mites/day (Figure 1), which greatly exceeds the maximal threshold of 15 fallen mites per day (end of June and early August) recommended to establish an immediate miticide treatment (Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec—MAPAQ). The fall rate of mites from the control hives was generally below 10 over the observational period, indicating a good miticide control as per the MAPAQ monitoring chart. As this cohort study included a group of hives that were exposed to extreme parasitic

conditions, the comparison between the two groups and the evaluation of the effects of varroa on honeybees are also enhanced.

This study stresses the importance of controlling mite infestation by mid-August as per the modeling of mite population elaborated by DeGrandi-Hoffman et al. [15,32]. The difference in varroa parasitic load between the studied groups was insignificant in the first week of the experimentation (June), supporting the importance of an early miticide control to prevent an excessive growth of mite populations later in the summer and fall.

The sticky board method for monitoring of varroa parasitic load is frequently used in Quebec since it is easy to install and has a high sensitivity. However, this technique shows a great inter-day variation and does not give a direct estimate of mites per bee within the hive since it represents only the dead parasites and does not consider varroas in their reproductive stages [15]. Therefore, the exact number of varroa mites within the hive is much higher.

4.5.3 Sugar Concentrations in Hemolymph

According to Božič and Woodring, trehalose concentrations are higher in the fall than in the spring since foraging activity is less important later [33]. Similar observations were seen in this study. Concentrations in the control group were higher in late September than in late July and early August and higher than the infected bees in late September (Figure 2). As trehalose is a major part of the total sugar concentration, this could explain the higher concentrations observed in the control group in late September (Figure 2).

Regulation of the relationship between trehalose and appetite and sugar mobilization in fat bodies might be disrupted when honeybees are parasitized, especially in association with a high viral charge leading to decreased trehalose concentrations [34,35]. On the other hand, insects under high stress can better resist when sugar concentrations are higher [36], which might explain the weakness and death of highly infested hives.

4.5.4 Bacteriology

Most of the hemolymph samples contained scarce bacteria from the normal honeybee flora, likely from contamination, such as *Lactobacillus* spp., *Staphylococcus epidermidis*, *Staph. aureus*, *Klebsiella* spp., or *Enterobacteriaceae* [37,38,39]. These bacteria come from contamination from the bees' gut or from the non-sterile manipulation of the honeybee during hemolymph collection from antenna.

Serratia marcescens was isolated in one highly infested hive (No. 522) as well as one control hive (No. 328). Based on the data obtained herein, our study does not support the transmission of *S. marcescens* in the hemolymph by varroa.

4.5.5 Virology

A strong correlation between varroa parasitism and viral loads was observed in this study. There were also simultaneous viral infections (DWV-A, DWV-B, BQCV, ABPV, KBV, and IAPV) with charges that were more important when honeybees were heavily infested by varroa mites (Figure 3, Figure 4 and Figure 5). Viral loads were significantly higher in highly infested hives than in the controls for most studied viruses (Figure 3, Figure 4 and Figure 5) except for ABPV (Figure 5a). Consequences of these high viral loads are also more evident in highly infested hives, as demonstrated by the death of colonies in the fall.

Fall is an optimal period for the increase of viral charges, where the number of phoretic varroa mites is much higher in the colony, combined with a great number of honeybees infected by viruses that are available to feed on [40,41]. In other words, the higher density of varroa mites increased the transmission of viruses [42]. According to Francis et al. [43], viral titers for ABPV, KBV, IAPV, and DWV increase from spring to fall, as observed in our study for DWV and KBV. In this study, the increase of KBV loads until fall was not statistically significant, as previously seen in other studies [44,45]. European studies also present increased DWV charges in the fall [46] as well as for ABPV, showing seasonal variation in the viral prevalence and charges [43,47,48].

Fall is also a critical season for colony weakening and mortality since honeybee reproduction decreases. Overall, exposure to varroa [49,50] and higher DWV and ABPV titers in the fall are correlated with overwintering mortality [43,50,51]. Further studies need to be performed to establish a correlation between viral charges and overwintering mortality in Canadian territory.

The dissemination of viruses in the colony is intensified by the presence of *Varroa destructor*. As demonstrated by many studies, *V. destructor* is a major contributor of horizontal transmission of viruses, including DWV, ABPV, KBV and IAPV [15,18,44,48,52,53,54,55,56,57]. Phoretic and reproductive varroa mites ingest viral particles when feeding on an infected honeybee and can subsequently inject saliva containing viral particles into another healthy bee [58]. This inoculation directly into the hemolymph increases the pathogenicity of most viruses [45,48,52,55,59,60,61,62,63].

Among those viruses, it is mostly accepted that DWV also replicates in varroa mites [57,64,65] (Table A1). It has been suggested that other viruses, including KBV and IAPV, can also replicate within mites [48,53,66] (Table A1).

RT-PCR analysis demonstrates that honeybees can be constantly exposed to small viral charges even with a controlled parasitic load. Indeed, viruses were detected throughout the experiment, albeit with small ratios. As seen in the control hives, a good management of varroa controls viral infections and subsequent mortality [67], supporting the importance of varroa treatment to limit the viral loads within the colony [15,43].

The results show a strong correlation between DWV loads and varroa infestation (Figure 3a,b), as also demonstrated by other researchers [47,49,57,68,69] and for which a synergistic interaction has been previously demonstrated [64].

This study helps to evaluate, chronologically, the genetic dynamic of two DWV genotypes (DWV-A and DWV-B) in the honeybee colonies of a specific area, i.e., Quebec, Canada. This study shows a decreased DWV genotype diversity under severe varroa infestation.

The two DWV genetic variants co-exist with an exposure to a high parasitic load, with a predominance of DWV-A in September. Varroa might be involved in the selection of some genotypes that are better replicated [70,71,72], which thus diminishes genetic diversity [69]. The impact of this genotype shift on colony mortality would need further studies [73], and a closer evaluation of the DWV genotype variation in Quebec apiaries would be useful.

Data from this study show a significant increase of BQCV loads in highly infested hives over time (Figure 4a), as observed in a previous Spanish study [74]. BQCV might be an opportunistic infectious agent, as seen in immunosuppressed honeybees [41,74]. Although a clear correlation between BQCV and varroa infestation has not been established [18,52,64], a recent study suggests its role as a mechanical vector [66]. Our study also suggests that varroa infestation loads influence BQCV loads in honeybees.

4.6 Conclusion

In conclusion, this study demonstrates that honeybees exposed to high loads of Varroa destructor have a higher load of different viruses, with charges increasing through time but without increasing the risk of bacterial infections. This long exposure to combined parasitism and viral infections leads to decreased sugar concentrations in hemolymph and colony mortality. These life-threatening parameters, particularly in the fall, might be potential predictors of overwintering colony losses in Canada.

4.7 Figures

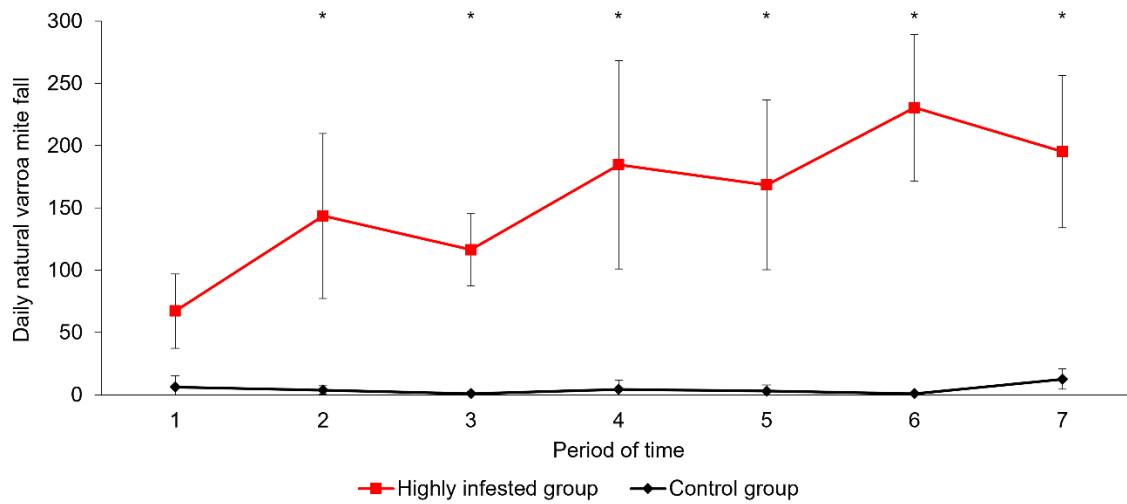


Figure 1. Daily varroa mite fall in highly infested and control hives over time. Average data (\pm SD) over determined periods for each group are shown in the figure. Daily varroa mite fall was significantly higher in infested hives compared to control hives for most periods (*, $p < 0.0001$, post hoc Tukey test in LMM) except for the first period ($p = 1.00$, post hoc Tukey test in LMM).

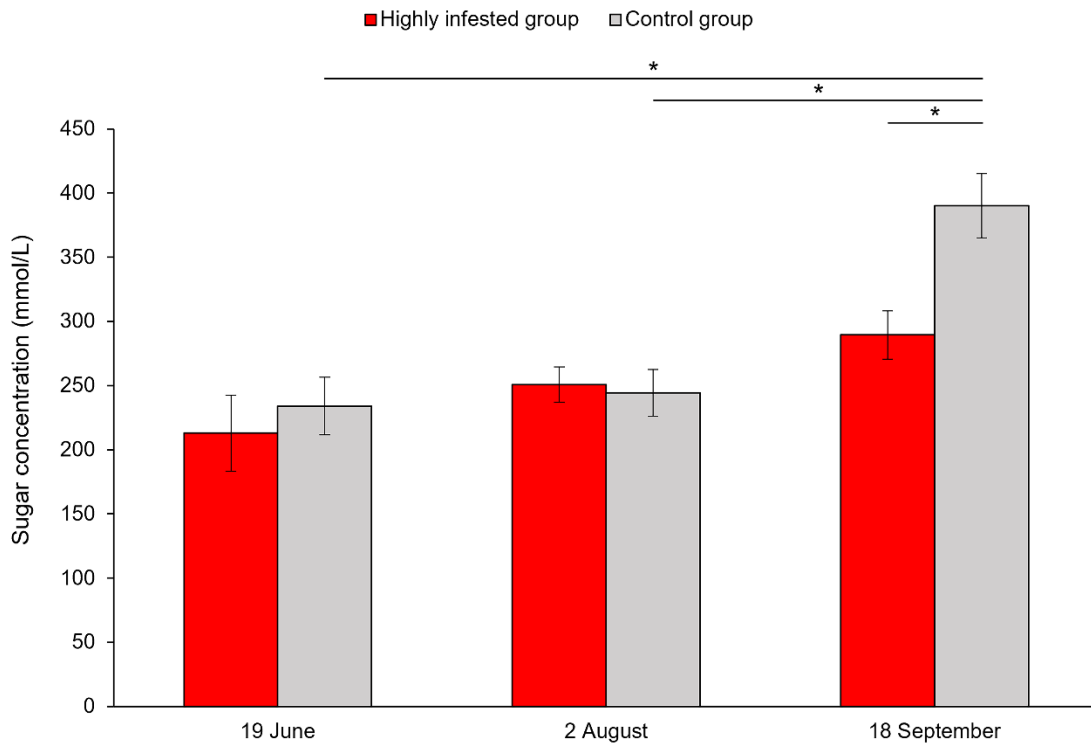


Figure 2. Sugar (glucose and trehalose) concentrations in hemolymph through time. On 18 September 2019, highly infested hives showed a significantly lower concentration of combined sugars in hemolymph compared to control hives (*, $p < 0.001$, a priori contrasts in LMM).

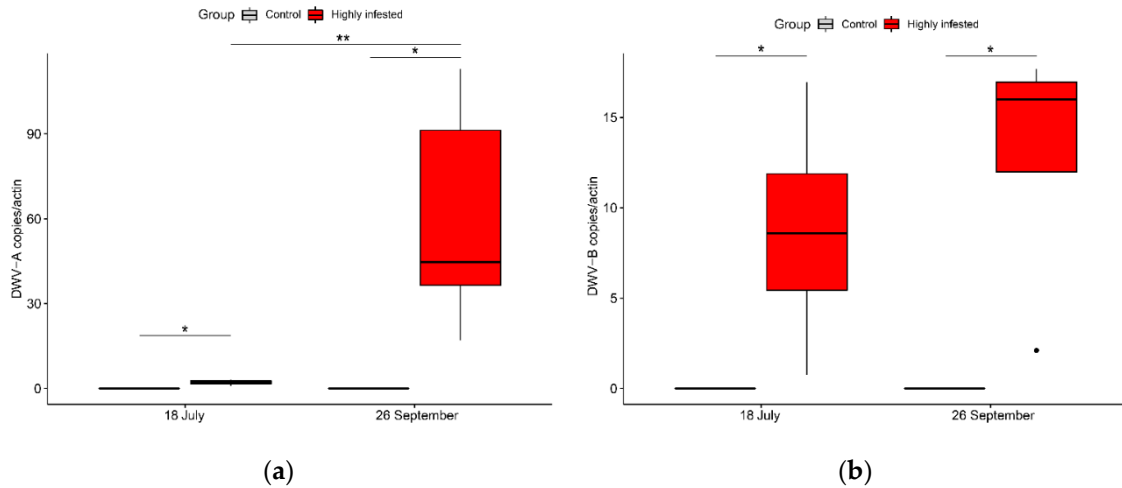


Figure 3. DWV loads on July and September in honeybees of highly infested and control hives: (a) DWV-A loads (copies/actin); (b) DWV-B loads (copies/actin). Overall, a predominance of DWV variant A is seen. DWV-A and DWV-B copies/actin were significantly higher in infested hives than in controls (*, $p < 0.05$, Mann–Whitney test), with a significant increase over time (**, $p = 0.001$, Wilcoxon test) for DWV-A.

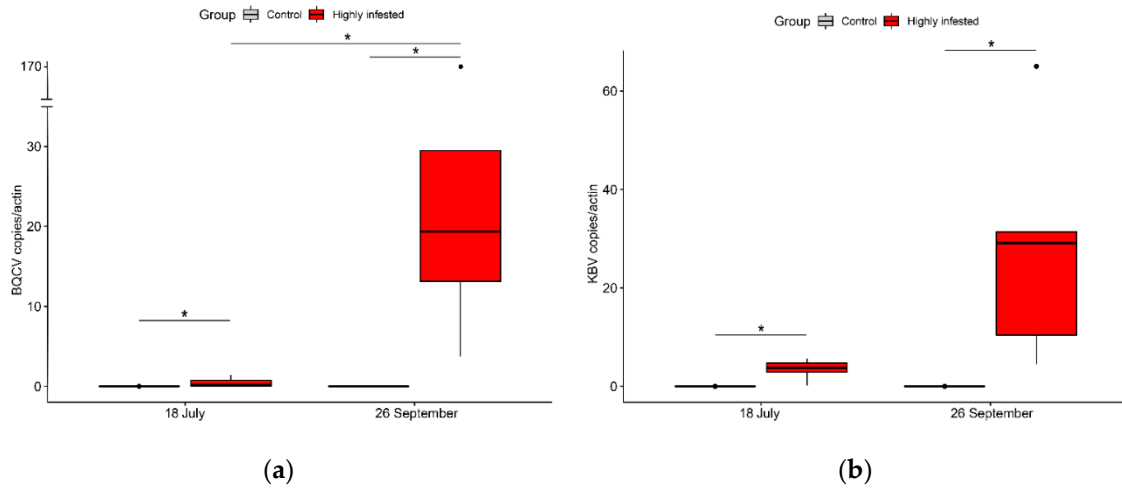


Figure 4. Viral loads in in honeybees of highly infested and control hives over time: (a) BQCV loads (copies/actin); (b) KBV loads (copies/actin). Viral copies/actin for BQCV and KBV were significantly different between the two studied groups (*, $p < 0.001$, linear model and Mann–Whitney test) at each period of the cohort study. There was a great increase of BQCV copies/actin in highly infested hives over time (*, $p < 0.001$, linear model).

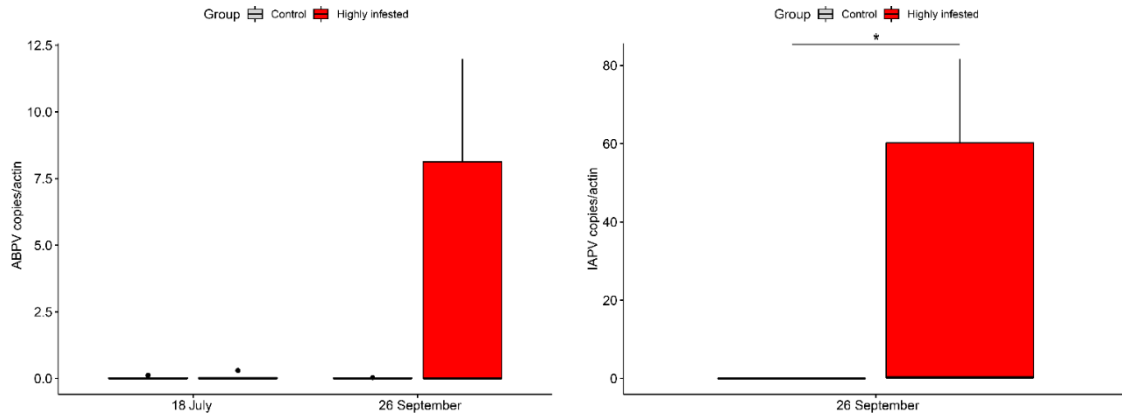


Figure 5. Viral loads in in honeybees of highly infested and control hives over time: (a) ABPV loads (copies/actin); (b) IAPV loads (copies/actin). Infested hives Nos. 522 and 505 showed a high ratio of viral copies in September for both ABPV and IAPV. A significant difference (*, $p < 0.05$, t-test) between studied groups was seen for IAPV.

4.8 Supplementary Materials

The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/app122211630/s1>, Excel file S1: Bacteriological results; Excel file S2: Varroa mite monitoring; Table S3: Primers and probes used for viral analysis; Table S4: Summary of the viral infection results between highly infested and control hives over time. References [75,76,77,78,79,80] are cited in the supplementary materials.

Excel File S1. Bacteriological results

Pooled sample ID	Brain heart infusion (HBI) broth	Columbia agar medium (CBA)	Quantity	MacConkey agar medium
2019-06-19				
208	Bacilli Gram +	<i>Lactobacillus spp.</i>	1+	NG
258	NG	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Rare	NG
277	NG	<i>Lactobacillus spp.</i>	Few	NG
321	Bacilli Gram +	<i>Lactobacillus spp.</i>	1+	NG
328	<i>Staphylococcus spp. / Staphylococcus warneri</i>	<i>Lactobacillus spp. / Staphylococcus warneri</i>	1+ / Few	NG
465	NG	NG		NG
345	NG	NG		NG
427	NG	NG		NG
503	NG	NG		NG
505	NG	NG		NG
522	<i>Staphylococcus spp.</i>	NG		NG
593	NG	NG		NG
2019-08-09*				
208	NA	1	1+	NG
258	NA	3	1+	NG
277	NA	4 (with <i>Klebsiella oxytoca</i>)	1+	NG
321	NA	5 (with <i>Citrobacter spp.</i>)	1+	NG
328	<i>Serratia marcescens</i>	1 / <i>Pantoea agglomerans</i>	1+ / 1+	NG
465	<i>Klebsiella oxytoca</i>	4 (with <i>Klebsiella oxytoca</i>)	1+	NG
345	NA	3	1+	NG
427	NA	3	1+	NG
503	NA	3	1+	NG

505	<i>Enterobacter cloacae complex</i>	2	1+	NG
522	<i>Pantoea agglomerans</i>	5 / <i>Serratia marcescens</i>	1+ / Rare	NG
593	<i>Enterobacteriaceae</i> , not identified	3	1+	NG
2019-12-19				
208	NG	AC		NG
258	NG	<i>Staphylococcus spp.</i>	Rare	NG
277	NG	<i>Staphylococcus aureus</i>	1+	NG
321	NG	1	Rare	NG
328	NG	NG		NG
465	NG	NG		NG
345	NG	NG		NG
427	NG	<i>Lactobacillus spp</i>	1+	NG
503	NG	2	1+	NG
505	NG	NG		NG
522	<i>Staphylococcus spp.</i>	2	1+	NG
593	NG	<i>Lactobacillus spp.</i>	Rare	NG

Qualitative scale	
NG	No growth
Rare	1 colony per agar plate
Few	2-4 colonies per agar plate
1+	5 or more colonies per agar plate

Hive group	Colour
Control	
Highly infested	

Abbreviation used for results from 2019-08-09	
NA	Absence of enterobacteriaceae
1	1 bacterial species without any possible identification
2	2 bacterial species without any possible identification
3	3 bacterial species without any possible identification
4	4 bacterial species without any possible identification
5	5 bacterial species without any possible identification

*For the sampling of 2019-08-09, only enterobacteriaceae (including Serratia) or bacteria of high predominance have been identified. Most samples contain multiple bacteria species without predominance (i.e. contamination)

Excel file S2: Varroa mite monitoring

Hive number	Group	Daily natural fall of Varroa mites				Daily natural fall of Varroa mites			Daily natural fall of Varroa mites	07-10-2019
		June 13- 18	June 18- 28	July 11-17	July 24- August 08	August 21-28	August 26 - September 5	September 5-20		
505	HI	52.60	56.20	151.00	95.00	178.40	101.40	275.00	228.00	Dead
593	HI	72.00	90.10	136.00	101.00	162.80	224.80	204.00	228.89	Dead
503	HI	53.20	53.40	Orphan	149.00	240.20	254.60	200.00	225.78	Dead
522	HI	20.80	19.30	37.00	115.00	319.40	206.20	330.00	244.44	Dead
345	HI	51.00	85.90	210.00	154.00	109.40	124.00	187.00	87.56	Very weak
427	HI	118.20	98.30	184.00	85.00	98.00	100.00	187.00	156.89	Very weak
465	Control	n/a	0.50	0.50	0.20	0.40	0.38	0.50	8.80	Healthy
208	Control	n/a	2.00	1.00	0.00	0.40	0.25	0.20	8.80	Healthy
258	Control	n/a	2.70	0.67	0.20	2.60	3.00	2.40	28.90	Healthy
328	Control	n/a	3.20	6.00	0.30	4.00	0.75	1.10	11.30	Healthy
277	Control	n/a	24.90	8.17	4.50	18.80	12.88	1.30	9.20	Healthy
321	Control	n/a	4.60	6.83	0.50	0.60	1.00	0.90	8.40	Healthy

Legend:

HI = Highly infested

Table S3. Primers and probes used for viral analysis

		Forward primer (5' -> 3')	Reverse primer (5' -> 3')	Probe (5' -> 3')	Reference	Genbank Access No.
Multiplex 1	ABPV	CATATTG GCGAGCC ACTATG	CTACCAG GTTCAAAG AAAATTTT	ATAGTTA AAACAGC TTTTCAC ACTGG	Jamnikar-Ciglenecki et Toplak, 2012 [75]	AF4860 72.2
	DWV-A	TTCATTAA AGCCACC TGGAACA TC	TTTCCTCA TTAACTGT GTCGTTGA	TGTTATC TCCTGCG TGGAATG CGT	Locke et al., 2012* [76]	MT4159 49.1
	DWV-B	TATCTTCA TTAAAAC CGCCAGG CT	CTTCCTCA TTAACTGA GTTGTTGT C	TGAGAGG GATGAGA CCTGAAC TTG	McMahon et al., 2015 [77]	MT4159 52.1
Multiplex 2	BQCV	GGTGCGG GAGATGA TATGGA	GCCGTCTG AGATGCAT GAATAC	TTTCCAT CTTTATC GGTACGC CGCC	Chantawanakul et al., 2006 [78]	MT4824 76.1
	IAPV	GCGGAGA ATATAAG GCTCAG	CTTGCAAG ATAAGAA AGGGGG	CGCCTGC ACTGTTCG ACATTAG TTA*	Di Prisco et al., 2011 [53]	KY2439 33.1
	KBV	ACCAGGA AGTATTCC CATGGTA AG	TGGAGCTA TGGTTCCG TTCAG	CCGCAGA TAACTTA GGACCAG ATCAATC ACA	Ward et al., 2007 [79]	AF2637 23.1
Multiplex 1 and 2	-actin	AGGAATG GAAGCTT GCGGTA	AATTTTCA TGGTGGAT GGTGC	ATGCCAA CACTGTC CTTTCTG GAGGTA	Chen et al., 2005 [80]	AB0230 25.1

* Difference of 1 nucleotide

Table S4. Summary of the of viral infection results between highly infested and control hives over time.

Viruses	Difference between groups					Increase over time in infested hives (July to September)		
	18 July		26 September		<i>p</i> value	July 18	September 26	<i>p</i> value
	Control	Infested hives	Control	Infested hives				
DWV-A	Near zero	2.15	0.0007	60.44	0.036	2.15	60.44	0.001
DWV-B	Near zero	8.72	Near zero	12.94	0.004	8.72	12.94	> 0.05
BQCV	Near zero	0.44	0.0002	47.20	< 0.001	0.44	47.20	< 0.001
KBV	Near zero	3.50	Near zero	28.08	< 0.001	3.50	28.08	> 0.05
IAPV	No seq. ²	No seq. ²	Near zero	28.46	0.013	n/a ³	n/a ³	n/a ³
ABPV	0.03	0.06	0.01	4.02	> 0.05	0.06	4.02	> 0.05

¹ Ratios = viral copies/actin

² No seq. = No sequences detected

³ n/a = Data not available

⁴ M-W : Mann-Whitney test

⁵ LM = Linear model

4.8 Author Contributions

Conceptualization, A.C., L.B.-G., A.D., P.D. and M.-O.B.-B.; formal analysis, A.C., L.B.-G., A.D., P.D. and M.-O.B.-B.; investigation, A.C., L.B.-G., A.D., P.D. and M.-O.B.-B.; resources, A.C., L.B.-G., A.D., P.D. and M.-O.B.-B.; data curation, A.C. and L.P.; writing—original draft preparation, A.C.; writing—review and editing, A.C., L.B.-G., A.D., P.D. and M.-O.B.-B.; visualization, A.C.; supervision, L.B.-G., A.D., P.D. and M.-O.B.-B.; funding acquisition, L.B.-G., P.D. and M.-O.B.-B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

4.10 Funding

This research was funded by Programme Innov’action agroalimentaire 2018–2023 from Ministère de l’Agriculture, des Pêcheries et de l’Alimentation du Québec (MAPAQ), project number IA119056.

4.11 Acknowledgments

We thank the CRSAD for providing the honeybee colonies (Deschambault, QC, Canada). We thank Marie-Lou Gauthier, Jonathan Massé, and their technical team for the bacterial culture and identification (Complexe de Diagnostic et d’Épidémiosurveillance Vétérinaires du Québec, QC, Canada). We thank Guy Beauchamp and Tristan Juette for their help in statistical analyses (Université de Montréal, QC, Canada). We thank Siavash Maghsoudi for his participation in the project.

4.12 Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

4.13 Appendix A

Table A1. Review of the vector role of varroa in transmission of honeybee viruses.

Analyzed Virus	Vectorial Role of Varroa *	
	Mechanical	Multiplicative
Deformed wing virus (DWV)	Yes ^{a-g}	Demonstrated for • DWV-A ^h • DWV-B ^{g, i-k}
Acute bee paralysis virus (ABPV)	Yes ^{d, l-n}	No ^d
Cashmere bee virus (KBV)	Yes ^{d, p-q}	Suggested ^o
Israeli acute paralysis virus (IAPV)	Yes ^{r-s}	Suggested ^r
Bee queen cell virus (BQCV)	No ^{t-u} Possible ^o	Uncertain ^o

References (author, date) * Complete references are available in the main article. a. Bowen-Walker et al., 1999 [65]; b. Erban et al., 2005 [75]; c. Nordström, 2003 [76]; d. Ribière, 2008 [48]; e. Santillán et al., 2008 [58]; f. Tentcheva et al., 2004 [47]; g. Yue and Genersh, 2005 [77]; h. Annoscia et al., 2019 [78]; i. Gisder and Genersh, 2020 [79]; j. Gisder et al., 2009 [72]; k. Ongus et al., 2004 [80]; l. Ball, 1983 [81]; m. De Miranda et al., 2010 [44]; n. Wieggers, 1988 [56]; o. Lester et al., 2022 [66]; p. Shen et al., 2005 (1) [54]; q. Shen et al., 2005 (2) [55]; r. Di Prisco, 2011 [53]; s. McMenamin and Genersh, 2015 [82]; t. Amiri et al., 2021 [52]; u. Vidal-Naquet, 2015 [18].

Table A2. Timeframes used for the comparison of daily varroa mite fall per group.

Timepoint	Highly Infested Group	Control Group
June	18–28 June	18–28 June
Mid-July	11–17 July	11–17 July
Late July	24–29 July	July 29–8 August
Late August	21–26 August	23–26 August
Early September	26 August–5 September	28 August–5 September
Mid-September	5–17 September	5–20 September
Late September	17–26 September	20–30 September

4.14 References

1. Knoll, S.; Pinna, W.; Varcasia, A.; Scala, A.; Cappai, M.G. The honey bee (*Apis mellifera* L., 1758) and the seasonal adaptation of productions. Highlights on summer to winter transition and back to summer metabolic activity. A review. *Livest. Sci.* 2020, 235, 104011. [Google Scholar] [CrossRef]
2. Radcliffe, R.M. Physiology of the Honey Bee—Principles for the Beekeeper and Veterinarian. In *Honey Bee Medicine for the Veterinary Practitioner*; Kane, T., Faux, C., Eds.; John Wiley & Sons Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2021; pp. 41–53. [Google Scholar]
3. Mattila, H.R.; Harris, J.L.; Otis, G.W. Timing of production of winter bees in honey bee (*Apis mellifera*) colonies. *Insectes Sociaux* 2001, 48, 88–93. [Google Scholar] [CrossRef]
4. Winston, M.L. *The Biology of the Honey Bee*; Harvard University Press: Cambridge, MA, USA, 1987; p. 281. [Google Scholar]
5. Radcliffe, R.W. The Superorganism and Herd Health for the Honey Bee. In *Honey Bee Medicine for the Veterinary Practitioner*; Kane, T., Faux, C., Eds.; John Wiley & Sons Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2021; pp. 21–31. [Google Scholar]
6. Fluri, P.; Lüscher, M.; Wille, H.; Gerig, L. Changes in weight of the pharyngeal gland and haemolymph titres of juvenile hormone, protein and vitellogenin in worker honey bees. *J. Insect Physiol.* 1982, 28, 61–68. [Google Scholar] [CrossRef]
7. Döke, M.A.; Frazier, M.; Grozinger, C.M. Overwintering honey bees: Biology and management. *Curr. Opin. Insect Sci.* 2015, 10, 185–193. [Google Scholar] [CrossRef]
8. Fluri, P.; Bogdanov, S. Age dependence of fat body protein in summer and winter bees. In *Proceedings of the 10th International Congress of IUSSI, München, Germany, 18–22 August 1986*. [Google Scholar]
9. Hrassnigg, N.; Crailsheim, K. Differences in drone and worker physiology in honeybees (*Apis mellifera*). *Apidologie* 2005, 36, 255–277. [Google Scholar] [CrossRef]
10. Heinrich, B.; Esch, H. Thermoregulation in Bees. *Am. Sci.* 1994, 82, 164–170. [Google Scholar]

11. Gray, A.; Adjlane, N.; Arab, A.; Ballis, A.; Brusbardis, V.; Charriere, J.D.; Chlebo, R.; Coffey, M.F.; Cornelissen, B.; da Costa, C.A.; et al. Honey bee colony winter loss rates for 35 countries participating in the COLOSS survey for winter 2018–2019, and the effects of a new queen on the risk of colony winter loss. *J. Apic. Res.* 2020, 59, 744–751. [Google Scholar] [CrossRef]
12. Ferland, J.; Kempers, M.; Kozak, P.; Lafrenière, R.; Maund, C.; Menzies, C.; Mesher, C.; Muirhead, S.; Pernal, S.; Sproule, J.; et al. Canadian Association of Professional Apiculturists Statement on Honey Bee Wintering Losses in Canada (2022); Canadian Association of Professional Apiculturists National Survey Committee and Provincial Apiarists: Ottawa, ON, Canada, 2022; p. 24. [Google Scholar]
13. Ferland, J.; Kempers, M.; Kennedy, K.; Kozak, P.; Lafrenière, R.; Maund, C.; Menzies, C.; Muirhead, S.; Nasr, M.; Pernal, S.; et al. Canadian Association of Professional Apiculturists Statement on Honey Bee Wintering Losses in Canada (2019); Canadian Association of Professional Apiculturists National Survey Committee and Provincial Apiarists: Ottawa, ON, Canada, 2019; p. 19. [Google Scholar]
14. Amdam, G.V.; Hartfelder, K.; Norberg, K.; Hagen, A.; Omholt, S.W. Altered physiology in worker honey bees (Hymenoptera: Apidae) infested with the mite *Varroa destructor* (Acari: Varroidae): A factor in colony loss during overwintering? *J. Econ. Entomol.* 2004, 97, 741–747. [Google Scholar] [CrossRef]
15. Peck, D.T. The Parasitic Mite *Varroa destructor*. In *Honey Bee Medicine for the Veterinary Practitioner*; Kane, T., Faux, C., Eds.; John Wiley & Sons Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2021; pp. 235–251. [Google Scholar]
16. Noel, A.; Le Conte, Y.; Mondet, F. *Varroa destructor*: How does it harm *Apis mellifera* honey bees and what can be done about it? *Emerg. Top. Life Sci.* 2020, 4, 45–57. [Google Scholar] [CrossRef]
17. Mondet, F.; de Miranda, J.R.; Kretzschmar, A.; Le Conte, Y.; Mercer, A.R. 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.* 2014, 10, e1004323. [Google Scholar] [CrossRef]
18. Vidal-Naquet, N.; Lewbart, G.; Vallat, B. *Honeybee Veterinary Medicine: Apis Mellifera*, 1st ed.; 5M Publishing: Sheffield, UK, 2015; p. 260. [Google Scholar]

19. Ramsey, S.D.; Ochoa, R.; Bauchan, G.; Gulbronson, C.; Mowery, J.D.; Cohen, A.; Lim, D.; Joklik, J.; Cicero, J.M.; Ellis, J.D.; et al. *Varroa destructor* feeds primarily on honey bee fat body tissue and not hemolymph. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2019, 116, 1792–1801. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
20. Arrese, E.L.; Soulages, J.L. Insect fat body: Energy, metabolism, and regulation. *Annu. Rev. Entomol.* 2010, 55, 207–225. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
21. Li, S.; Yu, X.; Feng, Q. Fat Body Biology in the Last Decade. *Annu. Rev. Entomol.* 2019, 64, 315–333. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
22. Mayack, C.; Naug, D. Parasitic infection leads to decline in hemolymph sugar levels in honeybee foragers. *J. Insect Physiol.* 2010, 56, 1572–1575. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
23. Even, N.; Devaud, J.M.; Barron, A.B. General stress responses in the honey bee. *Insects* 2012, 3, 1271–1298. [Google Scholar] [CrossRef]
24. Marche, M.G.; Satta, A.; Floris, I.; Pusceddu, M.; Buffa, F.; Ruiu, L. Quantitative variation in the core bacterial community associated with honey bees from *Varroa*-infested colonies. *J. Apic. Res.* 2019, 58, 444–454. [Google Scholar] [CrossRef]
25. Zaobidna, E.A.; Żółtowska, K.; Łopieńska-Biernat, E. *Varroa destructor* induces changes in the expression of immunity-related genes during the development of *Apis mellifera* worker and drone broods. *Acta Parasitol.* 2017, 62, 779–789. [Google Scholar] [CrossRef]
26. Koleoglu, G.; Goodwin, P.H.; Reyes-Quintana, M.; Hamiduzzaman, M.M.; Guzman-Novoa, E. *Varroa destructor* parasitism reduces hemocyte concentrations and prophenol oxidase gene expression in bees from two populations. *Parasitol. Res.* 2018, 117, 1175–1183. [Google Scholar] [CrossRef]
27. Raymann, K.; Coon, K.L.; Shaffer, Z.; Salisbury, S.; Moran, N.A. Pathogenicity of *Serratia marcescens* Strains in Honey Bees. *mBio* 2018, 9, e01649-18. [Google Scholar] [CrossRef]
28. Burritt, N.L.; Foss, N.J.; Neeno-Eckwall, E.C.; Church, J.O.; Hilger, A.M.; Hildebrand, J.A.; Warshauer, D.M.; Perna, N.T.; Burritt, J.B. Sepsis and Hemocyte Loss in Honey Bees (*Apis mellifera*) Infected with *Serratia marcescens* Strain Sicaria. *PLoS ONE* 2016, 11, e0167752. [Google Scholar] [CrossRef]

29. Borsuk, G.; Ptaszynska, A.A.; Olszewski, K.; Domaciuk, M.; Krutmuang, P.; Paleolog, J. A New Method for Quick and Easy Hemolymph Collection from Apidae Adults. *PLoS ONE* 2017, 12, e0170487. [Google Scholar] [CrossRef]
30. Ryazanova, A.D.; Alekseev, A.A.; Slepneva, I.A. The phenylthiourea is a competitive inhibitor of the enzymatic oxidation of DOPA by phenoloxidase. *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.* 2012, 27, 78–83. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
31. Cournoyer, A.; Deschamps, A.; Bau-Gaudreault, L.; Dubreuil, P.; Benoit-Biancamano, M.O. Analytical validation of a portable human Accu-Chek glucometer in honeybee hemolymph. *J. Vet. Diagn. Investig.* 2022, 34, 789–795. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
32. Currie, R.W.; Gatién, P. Timing acaricide treatments to prevent *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) from causing economic damage to honey bee colonies. *Can. Entomol.* 2006, 138, 238–252. [Google Scholar] [CrossRef]
33. Božič, J.; Woodring, J. Effect of activity on the haemolymph sugar titres in honey bees. *J. Apic. Res.* 1997, 36, 33–39. [Google Scholar] [CrossRef]
34. Bowen-Walker, P.L.; Gunn, A. The effect of the ectoparasitic mite, *Varroa destructor* on adult worker honeybee (*Apis mellifera*) emergence weights, water, protein, carbohydrate, and lipid levels. *Entomol. Exp. Appl.* 2001, 101, 207–217. [Google Scholar] [CrossRef]
35. Zachariah, T.T. Terrestrial Invertebrates. In *Exotic Animal Laboratory Diagnosis*; Heatley, J.J., Russell, K.E., Eds.; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2020; pp. 409–428. [Google Scholar]
36. Mayack, C.; Carmichael, K.; Phalen, N.; Khan, Z.; Hirche, F.; Stangl, G.I.; White, H.K. Gas chromatography—Mass spectrometry as a preferred method for quantification of insect hemolymph sugars. *J. Insect Physiol.* 2020, 127, 104115. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
37. Corby-Harris, V.; Maes, P.; Anderson, K.E. The Bacterial Communities Associated with Honey Bee (*Apis mellifera*) Foragers. *PLoS ONE* 2014, 9, e95056. [Google Scholar] [CrossRef]

38. Kešnerová, L.; Emery, O.; Troilo, M.; Liberti, J.; Erkosar, B.; Engel, P. Gut microbiota structure differs between honeybees in winter and summer. *ISME J.* 2020, 14, 801–814. [Google Scholar] [CrossRef]
39. Kwong, W.K.; Moran, N.A. Gut microbial communities of social bees. *Nat. Rev. Microbiol.* 2016, 14, 374–384. [Google Scholar] [CrossRef]
40. Posada-Florez, F.; Childers, A.K.; Heerman, M.C.; Egekwu, N.I.; Cook, S.C.; Chen, Y.; Evans, J.D.; Ryabov, E.V. Deformed wing virus type A, a major honey bee pathogen, is vectored by the mite *Varroa destructor* in a non-propagative manner. *Sci. Rep.* 2019, 9, 12445. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
41. Obbink, K.K.; Roth, J.A. Epidemiology and Biosecurity. In *Honey Bee Medicine for the Veterinary Practitioner*; Kane, T., Faux, C., Eds.; John Wiley & Sons Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2021; pp. 209–218. [Google Scholar]
42. Grozinger, C.M.; Flenniken, M.L. Bee Viruses: Ecology, Pathogenicity, and Impacts. *Annu. Rev. Entomol.* 2019, 64, 205–226. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
43. Francis, R.M.; Nielsen, S.L.; Kryger, P. *Varroa*-virus interaction in collapsing honey bee colonies. *PLoS ONE* 2013, 8, e57540. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
44. de Miranda, J.R.; Cordoni, G.; Budge, G. The Acute bee paralysis virus-Kashmir bee virus-Israeli acute paralysis virus complex. *J. Invertebr. Pathol.* 2010, 103 (Suppl. S1), S30–S47. [Google Scholar] [CrossRef]
45. Todd, J.H.; De Miranda, J.R.; Ball, B.V. Incidence and molecular characterization of viruses found in dying New Zealand honey bee (*Apis mellifera*) colonies infested with *Varroa destructor*. *Apidologie* 2007, 38, 354–367. [Google Scholar] [CrossRef]
46. Gauthier, L.; Tentcheva, D.; Tournaire, M.; Dainat, B.; Cousserans, F.; Colin, M.E.; Bergoin, M. Viral load estimation in asymptomatic honey bee colonies using the quantitative RT-PCR technique. *Apidologie* 2007, 38, 426–435. [Google Scholar] [CrossRef]
47. Tentcheva, D.; Gauthier, L.; Zappulla, N.; Dainat, B.; Cousserans, F.; Colin, M.E.; Bergoin, M. Prevalence and seasonal variations of six bee viruses in *Apis mellifera* L. and *Varroa destructor* mite populations in France. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004, 70, 7185–7191. [Google Scholar] [CrossRef]

48. Ribière, M.; Ball, B.; Aubert, M. Natural history and geographical distribution of honey bee viruses. In *Virology and the Honey Bee; European Communities: Luxembourg, 2008*; pp. 15–84. [Google Scholar]
49. Yang, X.; Cox-Foster, D. Effects of parasitization by *Varroa destructor* on survivorship and physiological traits of *Apis mellifera* in correlation with viral incidence and microbial challenge. *Parasitology* 2007, 134, 405–412. [Google Scholar] [CrossRef]
50. Dainat, B.; Evans, J.D.; Chen, Y.P.; Gauthier, L.; Neumann, P. Dead or alive: Deformed wing virus and *Varroa destructor* reduce the life span of winter honeybees. *Appl. Environ. Microbiol.* 2012, 78, 981–987. [Google Scholar] [CrossRef]
51. Genersch, E.; Ohe, W.v.d.; Kaatz, H.; Schroeder, A.; Otten, C.; Büchler, R.; Berg, S.; Ritter, W.; Mühlen, W.; Gisder, S.; et al. The German bee monitoring project: A long term study to understand periodically high winter losses of honey bee colonies. *Apidologie* 2010, 41, 332–352. [Google Scholar] [CrossRef]
52. Amiri, E.; Rueppell, O.; Tarpy, D.R. Honey Bee Viral Diseases. In *Honey Bee Medicine for the Veterinary Practitioner*; Kane, T., Faux, C., Eds.; John Wiley & Sons Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2021; pp. 253–275. [Google Scholar]
53. Di Prisco, G.; Pennacchio, F.; Caprio, E.; Boncristiani, H.F.; Evans, J.D.; Chen, Y. *Varroa destructor* is an effective vector of Israeli acute paralysis virus in the honeybee, *Apis mellifera*. *J. Gen. Virol.* 2011, 92, 151–155. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
54. Shen, M.; Cui, L.; Ostiguy, N.; Cox-Foster, D. Intricate transmission routes and interactions between picorna-like viruses (Kashmir bee virus and sacbrood virus) with the honeybee host and the parasitic varroa mite. *J. Gen. Virol.* 2005, 86, 2281–2289. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
55. Shen, M.; Yang, X.; Cox-Foster, D.; Cui, L. The role of varroa mites in infections of Kashmir bee virus (KBV) and deformed wing virus (DWV) in honey bees. *Virology* 2005, 342, 141–149. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
56. Wiegers, F. Transmission of honeybee viruses by *Varroa jacobsoni* Oud. In *European Research on Varroa Control*; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 1988; pp. 99–104. [Google Scholar]

57. Chen, Y.P.; Pettis, J.S.; Collins, A.; Feldlaufer, M.F. Prevalence and transmission of honeybee viruses. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006, 72, 606–611. [Google Scholar] [CrossRef]
58. Santillán-Galicia, M.T.; Carzaniga, R.; Ball, B.V.; Alderson, P.G. Immunolocalization of deformed wing virus particles within the mite *Varroa destructor*. *J. Gen. Virol.* 2008, 89, 1685–1689. [Google Scholar] [CrossRef]
59. Tehel, A.; Quynh, V.; Bigot, D.; Gogol-Döring, A.; Koch, P.; Jenkins, C.; Doublet, V.; Theodorou, P.; Paxton, R. The two prevalent genotypes of an emerging infectious disease, Deformed wing virus, cause equally low pupal mortality and equally high wing deformities in host honey bees. *Viruses* 2019, 11, 114. [Google Scholar] [CrossRef]
60. McMahon, D.P.; Natsopoulou, M.E.; Doublet, V.; Fürst, M.; Weging, S.; Brown, M.J.; Gogol-Döring, A.; Paxton, R.J. Elevated virulence of an emerging viral genotype as a driver of honeybee loss. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 2016, 283, 20160811. [Google Scholar] [CrossRef]
61. Bailey, L.; Ball, B.V.; Perry, J.N. Association of viruses with two protozoal pathogens of the honey bee. *Ann. Appl. Biol.* 1983, 103, 13–20. [Google Scholar] [CrossRef]
62. Bailey, L.; Gibbs, A.J.; Woods, R.D. Two viruses from adult honey bees (*Apis mellifera* Linnaeus). *Virology* 1963, 21, 390–395. [Google Scholar] [CrossRef]
63. Maori, E.; Lavi, S.; Mozes-Koch, R.; Gantman, Y.; Peretz, Y.; Edelbaum, O.; Tanne, E.; Sela, I. 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.* 2007, 88, 3428–3438. [Google Scholar] [CrossRef]
64. López-Urbe, M.M. Wild Bees: Diversity, Ecology, and Stressors of Non-Apis Bees. In *Honey Bee Medicine for the Veterinary Practitioner*; Kane, T., Faux, C., Eds.; John Wiley & Sons Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2021; pp. 81–91. [Google Scholar]
65. Bowen-Walker, P.L.; Martin, S.J.; Gunn, A. The transmission of deformed wing virus between honeybees (*Apis mellifera* L.) by the ectoparasitic mite *Varroa jacobsoni* Oud. *J. Invertebr. Pathol.* 1999, 73, 101–106. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
66. Lester, P.J.; Felden, A.; Baty, J.W.; Bulgarella, M.; Haywood, J.; Mortensen, A.N.; Remnant, E.J.; Smeele, Z.E. Viral communities in the parasite *Varroa destructor* and in

colonies of their honey bee host (*Apis mellifera*) in New Zealand. *Sci. Rep.* 2022, 12, 8809. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]

67. Nazzi, F.; Pennacchio, F. Honey Bee Antiviral Immune Barriers as Affected by Multiple Stress Factors: A Novel Paradigm to Interpret Colony Health Decline and Collapse. *Viruses* 2018, 10, 159. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]

68. Barroso-Arévalo, S.; Vicente-Rubiano, M.; Ruiz, J.A.; Bentabol, A.; Sánchez-Vizcaíno, J.M. Does pollen diversity influence honey bee colony health? *Span. J. Agric. Res.* 2019, 17, e0504. [Google Scholar] [CrossRef]

69. Ryabov, E.V.; Wood, G.R.; Fannon, J.M.; Moore, J.D.; Bull, J.C.; Chandler, D.; Mead, A.; Burroughs, N.; Evans, D.J. A virulent strain of deformed wing virus (DWV) of honeybees (*Apis mellifera*) prevails after *Varroa destructor*-mediated, or in vitro, transmission. *PLoS Pathog.* 2014, 10, e1004230. [Google Scholar] [CrossRef]

70. Martin, S.J.; Highfield, A.C.; Brettell, L.; Villalobos, E.M.; Budge, G.E.; Powell, M.; Nikaido, S.; Schroeder, D.C. Global honey bee viral landscape altered by a parasitic mite. *Science* 2012, 336, 1304–1306. [Google Scholar] [CrossRef]

71. Yue, C.; Genersch, E. RT-PCR analysis of Deformed wing virus in honeybees (*Apis mellifera*) and mites (*Varroa destructor*). *J. Gen. Virol.* 2005, 86, 3419–3424. [Google Scholar] [CrossRef]

72. Gisder, S.; Aumeier, P.; Genersch, E. Deformed wing virus: Replication and viral load in mites (*Varroa destructor*). *J. Gen. Virol.* 2009, 90, 463–467. [Google Scholar] [CrossRef]

73. Paxton, R.J.; Schäfer, M.O.; Nazzi, F.; Zanni, V.; Annoscia, D.; Marroni, F.; Bigot, D.; Laws-Quinn, E.R.; Panziera, D.; Jenkins, C.; et al. Epidemiology of a major honey bee pathogen, deformed wing virus: Potential worldwide replacement of genotype A by genotype B. *Int. J. Parasitol. Parasites Wildl.* 2022, 18, 157–171. [Google Scholar] [CrossRef]

74. Barroso-Arévalo, S.; Fernández-Carrión, E.; Goyache, J.; Molero, F.; Puerta, F.; Sánchez-Vizcaíno, J.M. High Load of Deformed Wing Virus and *Varroa destructor* Infestation Are Related to Weakness of Honey Bee Colonies in Southern Spain. *Front. Microbiol.* 2019, 10, 1331. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]

75. Jamnikar Ciglencečki, U.; Toplak, I. Development of a real-time RT-PCR assay with TaqMan probe for specific detection of acute bee paralysis virus. *J. Virol. Methods* 2012, 184, 63–68. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
76. Locke, B.; Forsgren, E.; Fries, I.; de Miranda, J.R. Acaricide treatment affects viral dynamics in *Varroa destructor*-infested honey bee colonies via both host physiology and mite control. *Appl. Environ. Microbiol.* 2012, 78, 227–235. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
77. McMahon, D.P.; Fürst, M.A.; Caspar, J.; Theodorou, P.; Brown, M.J.F.; Paxton, R.J. A sting in the spit: Widespread cross-infection of multiple RNA viruses across wild and managed bees. *J. Anim. Ecol.* 2015, 84, 615–624. [Google Scholar] [CrossRef]
78. Chantawannakul, P.; Ward, L.; Boonham, N.; Brown, M. A scientific note on the detection of honeybee viruses using real-time PCR (TaqMan) in *Varroa* mites collected from a Thai honeybee (*Apis mellifera*) apiary. *J. Invertebr. Pathol.* 2006, 91, 69–73. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
79. Ward, L.; Waite, R.; Boonham, N.; Fisher, T.; Pescod, K.; Thompson, H.; Chantawannakul, P.; Brown, M. First detection of Kashmir bee virus in the UK using real-time PCR. *Apidologie* 2007, 38, 181–190. [Google Scholar] [CrossRef]
80. Chen, Y.P.; Higgins, J.A.; Feldlaufer, M.F. Quantitative real-time reverse transcription-PCR analysis of deformed wing virus infection in the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Appl. Environ. Microbiol.* 2005, 71, 436–441. [Google Scholar] [CrossRef]
81. Erban, T.; Harant, K.; Hubalek, M.; Vitamvas, P.; Kamler, M.; Poltronieri, P.; Tyl, J.; Markovic, M.; Titera, D. In-depth proteomic analysis of *Varroa destructor*: Detection of DWV-complex, ABPV, VdMLV and honeybee proteins in the mite. *Sci. Rep.* 2015, 5, 13907. [Google Scholar] [CrossRef]
82. Nordström, S. Distribution of deformed wing virus within honey bee (*Apis mellifera*) brood cells infested with the ectoparasitic mite *Varroa destructor*. *Exp. Appl. Acarol.* 2003, 29, 293–302. [Google Scholar] [CrossRef]
83. Annoscia, D.; Brown, S.P.; Di Prisco, G.; De Paoli, E.; Del Fabbro, S.; Frizzera, D.; Zanni, V.; Galbraith, D.A.; Caprio, E.; Grozinger, C.M. Haemolymph removal by *Varroa* mite destabilizes the dynamical interaction between immune effectors and virus in

bees, as predicted by Volterra's model. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 2019, 286, 20190331. [Google Scholar] [CrossRef]

84. Gisder, S.; Genersch, E. Direct Evidence for Infection of *Varroa destructor* Mites with the Bee-Pathogenic Deformed Wing Virus Variant B—But Not Variant A—Via Fluorescence-in situ-Hybridization Analysis. *J. Virol.* 2020, 95, e01786-20. [Google Scholar] [CrossRef]

85. Ongus, J.R.; Peters, D.; Bonmatin, J.-M.; Bengsch, E.; Vlak, J.M.; van Oers, M.M. Complete sequence of a picorna-like virus of the genus Iflavirus replicating in the mite *Varroa destructor*. *J. Gen. Virol.* 2004, 85, 3747–3755. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]

86. Ball, B. Association of *Varroa jacobsoni* with virus diseases of honey bees. *Exp. Appl. Acarol.* 1983, 19, 607–613. [Google Scholar]

87. McMenemy, A.J.; Genersch, E. Honey bee colony losses and associated viruses. *Curr. Opin. Insect Sci.* 2015, 8, 121–129. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]

4.15 Commentaires

Dans la figure 2, les barres d'erreur représentent l'erreur-type (SEM). Dans les figures 3 et 4, les points noirs correspondent à une donnée aberrante.

Chapitre 5 – Discussion

5.1 Innovations de ce projet

5.1.1 Approche méthodologique

Les études qui visent à développer une meilleure compréhension des effets des agents pathogènes sur les abeilles sont souvent de nature épidémiologique (prospectives ou rétrospectives) ou fondamentale (études *in vitro*, biologiques) (270). Ce projet de recherche est une étude expérimentale prospective de type cohorte dans laquelle le niveau d'exposition au varroa a été contrôlé dans les ruches. En effet, cette étude a comparé, dans le temps, l'état de santé des colonies d'abeilles soumises à des conditions de parasitisme extrêmes. La particularité de ce projet de recherche réside dans l'utilisation d'une méthodologie appliquée qui prend en compte un suivi rapproché de ruches. Les résultats obtenus de cette recherche sont plus pertinents d'un point de vue clinique que des études *in vitro*, tout en permettant d'approfondir des impacts physiologiques de varroa sur l'abeille qui ne peuvent pas nécessairement être étudiés dans des études épidémiologiques.

Cette méthodologie fait des liens entre l'implication de différents pathogènes (l'acarien *Varroa destructor*, les virus et les bactéries), la physiologie de l'abeille, ainsi que l'affaiblissement et l'effondrement des colonies. Grâce à cette étude cohorte, il a été possible de mieux comprendre l'interaction et l'évolution temporelle de varroa avec les virus, la bactériologie et les concentrations sériques en sucres.

Les groupes de ruches étudiés proviennent d'un centre de recherche, ainsi plusieurs paramètres influençant la santé des abeilles ont été contrôlés : l'environnement, la physiologie, la génétique et les pratiques d'élevage. Ainsi, la corrélation entre le parasitisme et les changements temporels des paramètres étudiés sont plus probants statistiquement en limitant le nombre de paramètres externes pouvant interférer les données.

Étant donné que l'environnement et la géolocalisation peuvent influencer l'évolution de ruchers, cette étude réalisée au Québec est d'autant plus pertinente pour les vétérinaires et les apiculteurs régionaux.

5.1.2 Innovations rencontrées lors de ce projet

Depuis la mise en place de la réglementation canadienne sur l'utilisation des antibiotiques chez les abeilles, en décembre 2008, les vétérinaires, qui sont formés pour traiter plusieurs espèces animales de production, sont de plus en plus sollicités à soigner les abeilles (271). Le concept de médecine comparée est une partie intégrante de la médecine vétérinaire (271). Il a été mis en application dans ce projet sur les abeilles, qui sont considérées comme un animal de production (271). Des instruments diagnostiques appliqués chez les mammifères ont été adaptés à l'abeille et pourraient potentiellement prédire les risques de mortalités hivernales, comme le démontrent certaines études européennes (246, 272, 273). Cependant, les données obtenues avec ces appareils (comme ceux du RT-qPCR) pouvant être transposées à la réalité du climat québécois sont manquantes.

Les analyses sanguines sont depuis longtemps utilisées pour évaluer l'état de santé des mammifères, mais les études visant à évaluer la fluctuation des composantes biochimiques, dont le glucose, dans l'hémolymphe des abeilles sont peu nombreuses (47, 56, 63, 64, 274, 275). Ce projet a permis de valider l'utilisation d'un glucomètre pour mesurer les taux de sucres dans l'hémolymphe d'abeilles, avec une bonne sensibilité et une bonne précision. Le développement de cette technique d'évaluation complémentaire au comptage parasitaire et accessible sur le terrain pourrait aider au suivi de la santé des ruchers (276).

Les outils de diagnostic moléculaires et bactériologiques offrent des informations probantes aux vétérinaires pour guider leur diagnostic et améliorer les pratiques d'élevage des animaux. Les méthodes basées sur la PCR, dont la RT-qPCR, sont les plus couramment utilisées en médecine apicole (180, 270). Par exemple, l'extraction et le séquençage génomique via la PCR ont déjà permis de mieux comprendre l'évolution saisonnière des virus dans les ruchers tout en recensant la prévalence des virus sur un territoire donné (194,

206, 214, 228, 229, 246, 272, 273, 277-281). L'application de diverses méthodes diagnostiques vétérinaires dans ce projet a ainsi permis d'établir un portrait global de la santé des ruches étudiées durant la saison apicole.

L'utilisation de tests RT-qPCR multiplexes dans ce projet a permis d'amplifier simultanément plusieurs séquences cibles de virus dans une même réaction (270). Cette technique est moins coûteuse et requiert un plus petit échantillonnage tout en sauvant du temps de préparation (270). Cependant, le test PCR multiplexe est moins sensible qu'un test PCR uniplexe (270). En effet, le test PCR multiplexe diminue l'amplification de séquences cibles génomiques en faible abondance dans l'échantillon au détriment de celles en grande abondance (270).

5.2 Retour sur les résultats

5.2.1 Rappel des hypothèses de l'étude

Cette étude a permis de répondre à l'hypothèse globale stipulée comme suit : les concentrations en sucres sériques et l'état de santé des abeilles sont corrélés avec la charge parasitaire de *Varroa destructor*.

Deux sous-hypothèses sont validées :

- 1) Les abeilles provenant de ruches hautement infestées par *Varroa destructor* présentent des changements en concentrations en sucres, à l'automne seulement.
- 2) Les abeilles fortement infestées présentent un plus grand risque d'infection virale secondaire.

Une sous-hypothèse a été invalidée :

L'hypothèse selon laquelle varroa influencerait les infections bactériennes a été infirmée dans ce projet.

En d'autres mots, ce projet a permis de mieux comprendre l'impact temporel de *Varroa destructor* sur l'hémolymphe (sucres sériques) et les infections virales chez l'abeille.

5.2.2 Sous-objectif 1 : Validation de l'utilisation du glucomètre chez les abeilles

De plus amples informations sont présentes dans l'article intitulé *Analytical validation of a portable human Accu-Chek glucometer in honeybee hemolymph* et publié dans le *Journal of Veterinary Investigation* (**Chapitre 3 – Article 1 : Validation de l'utilisation du glucomètre chez les abeilles (sous-objectif 1)**).

Le glucomètre est un instrument avantageux puisqu'il requiert un faible volume d'échantillon chez les mammifères (276). Cependant, le volume d'hémolymphe et le nombre d'abeilles requis pour une mesure doivent être relativement plus élevés afin que la concentration mesurée par l'instrument soit le plus représentatif possible du statut de la colonie. Le glucomètre fournit également une réponse rapide de la concentration en sucres sériques (276). La mesure des concentrations en sucres circulatoires donne un indice sur le statut physiologique, l'état métabolique et l'homéostasie chez l'abeille (274).

À partir des lignes directrices de validation d'outils diagnostiques établies par l'ASVCP (282), il est possible de conclure que le glucomètre humain Accu-Chek est un instrument scientifiquement valide pour mesurer la concentration en sucres (glucose et tréhalose) dans l'hémolymphe des abeilles.

Le faible intervalle de confiance résultant de notre analyse de concordance (régression de Passing-Bablok) avec un instrument de référence indique une bonne précision du glucomètre humain. Les coefficients de variations en bas de 10% indiquent une bonne reproductivité du glucomètre dans le temps (283). De plus, le glucomètre est spécifique, avec un recouvrement entre 80-120% (283). Finalement, le glucomètre Accu-Chek mesure le glucose, sans toutefois réagir avec les autres sucres circulants connus chez l'abeille : le tréhalose et le fructose (51).

Le glucomètre Accu-Chek sous-estime la concentration en glucose dans l'hémolymphe au-dessus des valeurs physiologiques de 100 mmol/L (valeur mesurée de 20 mmol/L). Étant donné que l'exactitude du glucomètre Accu-Chek est meilleure en bas de 20 mmol/L (valeur physiologique = 100 mmol/L), l'échantillon doit être dilué en dessous de ce niveau (0-20 mmol/L) pour obtenir des résultats exacts et concordants avec l'instrument de référence (spectrophotomètre) (274). La dilution des échantillons d'hémolymphe est importante afin d'atteindre l'intervalle de linéarité (0-20 mmol/L) parce que les concentrations physiologiques en glucose dans l'hémolymphe de l'abeille peuvent excéder l'intervalle de quantification du glucomètre. En effet, les concentrations en sucres sériques sont variables chez l'abeille, soit de 5 à 80 mmol/L et peuvent atteindre près de 100 mmol/L pour le tréhalose (200 mmol/L en glucose) (43, 53, 56, 59, 65-67). La valeur réelle en glucose dans l'hémolymphe de l'abeille peut alors être calculée après la correction pour le facteur de dilution.

Étant donné que le tréhalose est le sucre plus important en circulation dans l'hémolymphe chez l'abeille (44, 48, 52, 53), il est alors pertinent de développer un protocole afin de le mesurer indirectement. Pour ce faire, un protocole enzymatique utilisant une tréhalase porcine commerciale a été développé en scindant la molécule de tréhalose en deux molécules de glucose (glucose-1-phosphate et glucose-6-phosphate) (44, 48, 52, 53, 72, 73). La mesure de la concentration en glucose et en tréhalose dans l'abeille permet de mieux refléter l'état physiologique de l'abeille.

La tréhalase commerciale permet d'hydrolyser le tréhalose présent dans l'hémolymphe en deux molécules de glucose (71), avec un recouvrement de 77%, ce qui permet de mesurer indirectement le tréhalose par le glucomètre Accu-Chek. Étant donné que le recouvrement est de 70% (en dessous de 100%), la concentration en tréhalose mesurée par le glucomètre est alors sous-estimée.

La tréhalase endogène, sous forme soluble dans l'hémolymphe (71), modifie grandement la concentration en glucose de l'échantillon d'hémolymphe. Cet enzyme continue son activité lorsque l'échantillon d'hémolymphe est entreposé à température pièce (24°C),

voire même à 4°C. À ces températures, le tréhalase scinde la molécule de tréhalose en deux molécules de glucose; la concentration en tréhalose sérique est ainsi faussement diminuée, tandis que celle du glucose augmente. L'activité de cet enzyme dépend de la température et du temps après la collecte d'échantillon. Selon les résultats de notre expérimentation, la faible température peut ralentir (-20°C) ou arrêter (-80°C) l'activité de la tréhalase.

5.2.3 Sous-objectif 2 : Sucres sériques en fonction de varroa

De plus amples informations sont présentes dans la section **4.4.2 Sugar Concentrations in Honeybee Hemolymph** de l'article intitulé *Effects of Varroa destructor on hemolymph sugars and secondary infections in honeybees (Apis mellifera)* et soumis pour l'édition spéciale *Frontier Research in Apiculture (Diagnosis and Control of Bee Diseases, Bee Products, Environmental Monitoring)*.

Grâce à l'instrument diagnostique validé (le glucomètre Accu-Chek), une corrélation a été établie entre les changements dans les concentrations en sucres sériques en fonction de la charge parasitaire de *Varroa destructor* à l'automne. Aucune différence significative n'a été observée pour les concentrations en sucres dans l'hémolymphe des abeilles provenant des ruches infestées et témoins en été (juillet et août). En revanche, les concentrations en sucres sériques étaient plus élevées chez les ruches témoins que chez les ruches fortement infestées par varroa, à l'automne (septembre). Selon Božič et Woodring, les concentrations en tréhalose, composant la majeure partie des sucres de l'hémolymphe, sont plus élevées en automne qu'au printemps, en raison d'une faible activité de butinage (56).

La faible concentration en sucres chez les abeilles fortement parasitées pourrait être expliquée en raison du compte parasitaire et des charges virales élevées à cette période. Étant donné que le parasitisme augmente les demandes énergétiques (63) et que varroa diminue les stockages de sucres dans le corps gras (51, 167), moins de réserves énergétiques sont alors disponibles pour l'abeille parasitée. La fragilité des abeilles peut

être également expliquée par la diminution des concentrations en sucres, donc les abeilles résistent moins au stress infectieux (71).

5.2.4 Sous-objectif 3 : Corrélation des infections (virales et bactériennes) avec varroa

De plus amples informations sont présentes dans les sections **4.5.4 Bacteriology** et **4.5.5 Virology** de l'article intitulé *Effects of Varroa destructor on hemolymph sugars and secondary infections in honeybees (Apis mellifera)* et soumis pour l'édition spéciale *Frontier Research in Apiculture (Diagnosis and Control of Bee Diseases, Bee Products, Environmental Monitoring)*.

Une forte corrélation est démontrée entre l'infestation par *Varroa destructor* et l'incidence des infections virales. Cette étude présente une infection virale simultanée où les charges virales sont plus grandes chez les abeilles des ruches fortement parasitées. Une différence significative est observée entre les charges virales (quantité de copies virales par actine) chez les deux groupes de ruches étudiées ($p < 0.05$) pour le DWV-A, DWV-B, IAPV, KBV et BQCV, mais pas pour le ABPV. Les abeilles témoins, où le taux parasitaire de varroa est contrôlé, sont exposées à des charges virales faibles.

De plus, les ruches exposées à un parasitisme élevé présentent des charges virales statistiquement plus élevées en automne qu'en été ($p \leq 0.001$) pour le DWV-A et BQCV. En comparaison, les charges virales pour le ABPV, KBV, IAPV et DWV enregistrées par Francis *et al.* augmentent entre le printemps et l'automne, ce qui est également observé pour le DWV et KBV dans notre étude (272). Plusieurs études européennes démontrent aussi des variations saisonnières de la prévalence et des charges virales, où on note une augmentation des virus en automne, dont pour DWV et ABPV (182, 206, 272).

Comme précédemment démontré par plusieurs études, varroa favorise la dissémination des virus au sein d'une colonie d'abeilles, majoritairement par transmission horizontale, dont le DWV, ABPV, KBV et IAPV (6, 107, 180-187). En d'autres termes, varroa est un vecteur

de virus : il ingère des particules virales lorsqu'il se nourrit d'une abeille infestée et injecte des particules virales via sa salive à une autre abeille saine, autant en phase reproductive et qu'en phase phorétique (188). Cette inoculation directement dans l'hémolymphe de l'abeille augmente la pathogénicité de la majorité des virus (180, 182, 184, 189-194).

Cette étude a permis d'observer l'évolution des variants génétiques de DWV lors d'une longue et forte exposition à varroa : les génotypes A et B du DWV co-existent, avec une diminution de leur diversité et une prédominance du DWV-A en septembre. Cette sélection de certains génotypes pourrait être expliquée par une meilleure adaptation du variant autant à varroa qu'à l'abeille (204) et par une meilleure capacité répliatrice dans le parasite (198, 213, 230).

Les extractions virales démontrent une augmentation significative temporelle du BQCV dans les ruches fortement infestées. Cette observation a également été notée lors d'une étude espagnole (280). Le BQCV semblerait être un agent opportuniste chez les abeilles immunosupprimées (197, 280). Malgré l'absence de corrélation entre varroa et BQCV rapportée dans plusieurs études, nos données suggèrent le contraire : une infestation par varroa influence les charges virales de BQCV. D'ailleurs, Lester *et al.* ont isolé le BQCV dans varroa, sans capacité répliatrice, ce qui laisse suggérer un certain rôle vectoriel de l'acarien pour ce virus.

Des quantités élevées de ABPV et IAPV ont été observées dans deux ruches à l'automne (n° 505 et n° 522). Ces ruches présentaient le nombre le plus élevé de chutes naturelles de varroa (228-320 varroas par jour). Plusieurs facteurs (environnement, technique d'analyse, etc.) pourraient expliquer les charges virales élevées de ABPV et IAPV dans les ruches n° 505 et n° 522. Cependant, l'analyse de ces facteurs ne faisait pas l'objet de cette étude. La faible quantité de ABPV et IAPV dans les autres ruches étudiées pourrait être expliquée par la létalité de ces virus après qu'ils soient injectés directement dans l'hémolymphe de l'abeille (182, 185, 186, 192, 193), ce qui provoque la mort rapide des adultes et des nymphes (233). La mort des abeilles infectées brise le cycle de vie du varroa, limitant ainsi la transmission horizontale du virus dans la ruche (233, 272, 284). Par conséquent, atteindre

des charges élevées de ABPV et IAPV prend alors plus de temps et est plus difficile à se répandre à grande échelle (198, 222, 284).

Dans cette étude, l'augmentation des charges virales de KBV jusqu'à l'automne n'est pas statistiquement significative, comme précédemment démontré par d'autres chercheurs (185, 194).

Les résultats bactériologiques n'ont révélé aucune prédominance de bactéries pathogènes ou non, mis à part des bactéries de la flore intestinale ou externe, probablement expliquée par une contamination lors de la collecte d'hémolymphe qui est une technique non stérile. Compte tenu de nos résultats bactériologiques, varroa ne semble pas jouer un rôle dans la transmission de *Serratia marsences*. Cette bactérie a été isolée à la fois dans une ruche fortement infestée (n° 522) et dans une ruche témoin (n° 328).

5.2.5 Corrélation entre les différents paramètres étudiés et l'évolution temporelle

De plus amples informations sont présentes dans la section **4.5 Discussion** de l'article intitulé *Effects of Varroa destructor on hemolymph sugars and secondary infections in honeybees (Apis mellifera)* et soumis pour l'édition spéciale *Frontier Research in Apiculture (Diagnosis and Control of Bee Diseases, Bee Products, Environmental Monitoring)*

À partir des données récoltées de ruches soumises à des conditions parasitaires extrêmes, nous pouvons établir un portrait global de l'évolution temporelle de l'état de santé des ruches en corrélant différents paramètres. Il est alors possible de mieux comprendre la progression des charges virales et des concentrations en sucres dans le temps, en corrélation avec le taux d'infestation par varroa.

En résumé, des ruches fortement infestées par *Varroa destructor* présentent en été (juin à août 2019) une faible charge virale. Ainsi, les abeilles parasitées seraient capables de

surmonter le stress parasitaire et maintenir leur métabolisme, ce qui est reflété par des concentrations en sucres sériques dans l'hémolymphe similaires aux ruches témoins (274). Il est important de se rappeler que les abeilles adultes puisent leurs sources d'énergie principalement des sucres (glucose, tréhalose et fructose) parce qu'elles ont de faibles réserves glycogéniques, protéiques et lipidiques (38, 47, 275, 285). En d'autres mots, les abeilles utilisent les sucres pour fournir l'énergie nécessaire afin d'accomplir leurs activités comme le butinage et la prise de nourriture (275). Ainsi, une abeille saine maintient son homéostasie en augmentant la mobilisation de réserves en sucres du corps gras et en modulant son appétit (48-50, 52, 60, 61).

L'affaiblissement graduel des colonies d'abeilles fortement infestées peut être expliqué par l'effet synergétique de varroa et des virus isolés. En effet, l'infestation par varroa et les virus qui l'accompagnent (6, 107, 180-187) ont fort probablement altéré le développement de plusieurs organes des abeilles en développement durant l'été : le corps gras, les glandes hypopharyngiennes, les ailes et le système nerveux (23, 88, 164, 165). Ainsi, les abeilles émergentes sont plus petites et affaiblies, avec une espérance de vie diminuée (23, 88, 111, 172).

En automne (septembre et octobre 2019), une augmentation significative des charges virales déstabilise l'équilibre subsistant entre varroa et l'abeille. Il est bien connu que varroa occasionne des changements physiologiques et morphologiques chez l'abeille infestée. Cette longue exposition altère le métabolisme et les réserves énergétiques du corps gras, organe clé dont varroa se nourrit (80), ce qui est reflété par la diminution des concentrations en sucres totaux dans l'hémolymphe (274).

Comme le démontrent plusieurs études épidémiologiques (182, 206, 214, 272), les effets secondaires de la varroase s'observent à long terme, à la fin de la saison apicole (automne), une période critique pour les abeilles d'hivernage. Selon nos résultats, la combinaison d'une infestation sévère par varroa, de charges virales élevées de plusieurs virus (DWV-A, DWV-B, IAPV, KBV et BQCV) et d'une diminution des concentrations sériques en sucres a provoqué, en à peine trois semaines, la fragilité, voire la mort de toutes les colonies

d'abeilles de l'étude avant l'hiver. En comparaison, des études européennes (Allemagne, Danemark et Suisse) ont permis de corréliser les titres viraux élevés et les mortalités hivernales pour deux virus seulement (DWV et ABPV) (246, 272, 273).

5.2.6 Limites

Bien que la méthodologie utilisée permette de contrôler certains paramètres influençant la santé des abeilles comme l'environnement, la géolocalisation et les pratiques d'élevage (286), cette étude compare deux groupes de colonies d'abeilles au sein du même rucher. Cette particularité doit être considérée comme une limite du projet parce que les abeilles peuvent interagir entre les ruches du même groupe par le pillage et la dérive (39, 107, 139). Cette interaction augmente lors d'une infestation parasitaire sévère (140), comme observée dans ce projet.

Pour ce qui est de l'échantillonnage, il aurait été intéressant d'utiliser une plus grande taille d'échantillon, pour augmenter la précision et la probabilité de détecter des abeilles infectées chez les ruches témoins. Un plus grand nombre de ruchers soumis à des conditions extrêmes de parasitisme aurait permis d'augmenter la précision des effets observés. D'un autre côté, la collecte d'abeilles dans la hausse à miel permet d'obtenir des sujets de la même caste, sans toutefois garantir le même âge (286). En effet, une grande plasticité d'âge existe en fonction du temps (la saisonnalité) (29, 286).

Étant donné que les mortalités hivernales des colonies d'abeilles demeurent élevées au Canada (3), le développement d'outils diagnostiques est crucial. Ces outils permettraient de suivre et d'évaluer l'état de santé des ruches et conséquemment d'ajuster les pratiques d'élevage afin d'optimiser les chances de survie hivernale. Dans ce projet, des analyses biochimiques (concentrations en sucres dans l'hémolymphe) et des analyses moléculaires (RT-PCR multiplex) ont été mises en application chez les abeilles. Cependant, il reste à établir des valeurs de référence chez l'abeille, comme les concentrations en sucres dans l'hémolymphe et la corrélation entre les quantités virales (copies virales par actine ou seuil

de CT) et les signes cliniques. Ces données de référence pourront être directement utiles pour les apiculteurs et les vétérinaires afin d'optimiser le suivi rapproché des ruches.

Les spécialistes comme les vétérinaires, les entomologistes, les apiculteurs et les agronomes doivent collaborer pour améliorer les connaissances diagnostiques et la médecine préventive des abeilles. Le développement d'autres outils pertinents pourrait résulter de tels échanges. Par exemple, il serait intéressant de développer une méthode accessible afin de mesurer les concentrations en vitellogénine, la protéine plus abondamment entreposée dans le corps gras de l'abeille (13, 19, 23) et influençant sa longévité (274). Cette méthode pourrait s'inspirer de la technique Bradford, qui est simple, peu coûteuse et sensible, pour mesurer les protéiques dans l'hémolymphe (274, 287).

Cette étude cohorte aide à démontrer la causalité entre les infections virales, varroa et les concentrations en sucres sériques. Cependant, la relation entre les différents paramètres demeure à être mieux définie. L'effet des charges virales est également confondu avec l'infestation par varroa ; il n'a pas été possible de déterminer la causalité entre la mortalité et chaque paramètre séparément (chutes journalières de varroa et charges virales). Le projet initial prévoyait récolter des données sur une plus longue période : sur toute la période hivernale jusqu'au début du printemps. En revanche, les ruches fortement parasitées n'ont pas survécu après le prélèvement de données en automne; il n'a donc pas été possible de les étudier aussi longtemps que prévu.

En raison de l'absence de données provenant des ruches fortement infestées avant l'hiver, il serait intéressant de reproduire la même méthodologie en contrôlant le parasitisme des ruches infestées. Étant donné qu'une étude allemande a clairement observé que la mortalité hivernale est corrélée avec le taux de parasitisme par varroa (246), il serait alors possible de collecter des échantillons jusqu'à la fin de l'hiver afin d'établir des éléments prédictifs des mortalités en hiver canadien. Un suivi des ruches à plus long terme permettrait aussi de suivre l'évolution des infections virales. D'un point de vue pratique, prédire la mortalité des ruches permettrait d'intervenir plus rapidement auprès des apiculteurs pour ajuster la

régie avant que les signes cliniques irréversibles apparaissent. Cette intervention pourrait potentiellement aider à la survie des abeilles en hiver.

Les mortalités hivernales demeurent un sujet d'actualité et inquiétant au fil des ans (3). Plusieurs autres facteurs qui contribuent à la vulnérabilité des abeilles comme la nutrition, le climat et l'exposition aux pesticides n'ont pas été étudiés dans ce projet de recherche (3). Or, la validation d'un glucomètre pour mesurer les sucres circulant dans l'hémolymphe des abeilles peut être utile pour d'autres chercheurs qui envisagent d'étudier l'effet de xénobiotiques ou de pesticides sur le métabolisme énergétique.

Les abeilles parcourent de grandes distances pour polliniser et s'exposent à plusieurs produits chimiques dont les pesticides, comme les néonicotinoïdes qui ont attiré l'attention de la communauté scientifique en recherche (288, 289). L'exposition à de petites doses de ces substances chimiques présente un effet synergétique (288). Ils entraînent une altération de leur système nerveux (comportement, réponse aux stimuli, apprentissage, mémoire), leur espérance de vie, leur système immunitaire (défenses antivirales, comportement hygiénique) et leur développement larvaire (délai d'émergence des abeilles, diminution du poids) (288, 290-296). Les pesticides causent une immunosuppression (néonicotinoïdes) ou changent le microbiote intestinal (glyphosate), ce qui favorise l'infection à des pathogènes comme les virus (290, 297). De plus, le corps gras est un organe cible pour la détoxification des pesticides (33, 288), en utilisant des enzymes comme le cytochrome P450 (294).

Étant donné que les concentrations en glucose reflètent l'équilibre du métabolisme ainsi que les réserves énergétiques de l'abeille, il serait intéressant d'étudier la fluctuation des sucres sériques en fonction de l'exposition aux pesticides. Peu d'études ont abordé ce sujet. Par exemple, une étude italienne a observé que les niveaux de sucres sériques diminuent après l'exposition à une dose sous-létale de néonicotinoïdes (298). Une étude française présente qu'une injection de pyréthrianoïdes diminue de façon significative la concentration sérique en glucose et en tréhalose chez des abeilles émergentes en 15 minutes (299). En

contrepartie, une injection intra-abdominale d'amtiraz chez une abeille provoque une augmentation significative des sucres sériques (tréhalose et glucose) (299, 300).

Un des grands défis consiste à établir des données de références correspondant aux valeurs physiologiques de tréhalose et de glucose chez l'abeille, ce qui pourrait aider à mieux interpréter les valeurs mesurées par le glucomètre et par conséquent l'état physiologique de l'abeille. Selon les travaux de certains chercheurs, la concentration sérique en glucose et en fructose varie de 11 à 80 mmol/L (64, 71), tandis que celle du tréhalose peut atteindre 100 mmol/L (43, 53, 56, 59, 66, 67). La variabilité de ces valeurs peut être expliquée par la physiologie, comme les besoins énergétiques, les saisons, le repas, le comportement, et le stress (parasitisme, manipulation expérimentale) (47, 56, 63). L'utilisation de différentes méthodes de mesure (sur base colorimétrique, chromatographique ou enzymatique) par les chercheurs peut également expliquer cette variabilité (47, 56, 63, 64, 274, 275).

Selon les lignes directrices de l'ASCVP, établir des intervalles de références demande préalablement des tests préliminaires comme l'analyse des interférences ainsi que le choix de critères de sélection et de la taille d'échantillon (301). Ce projet de recherche valide l'utilisation du glucomètre Accu-Chek qui pourrait être l'instrument de choix pour l'établissement de données de référence, ce qui constitue un projet de grande envergure. Tout d'abord, la validation du glucomètre a permis d'exclure la réaction croisée des sucres comme le tréhalose et le fructose sur les bandelettes de mesure du glucomètre Accu-Chek. Cependant, il reste à déterminer l'interférence de la mélanisation sur l'activité enzymatique de la bandelette. Par la suite, il faudra dresser une liste de critères de sélection et d'exclusion des individus (ou des regroupements d'individus) (301). Le tout permettra d'avoir une population d'abeilles plus représentative afin d'établir l'intervalle de référence (301). L'espèce, l'âge, le rucher d'origine et l'historique médical sont des exemples de critères à établir durant un protocole de détermination d'un nouvel intervalle de référence (301).

L'effet de la mélanisation sur la mesure du glucose n'a pas été étudié dans la validation analytique du glucomètre. La mélanisation est une activité enzymatique du système

immunitaire des insectes (96). Elle s'active lorsque l'hémolymphe est exposée à l'air durant son prélèvement (extraction de l'antenne) (44, 97, 98). Ce processus immunitaire noircit alors l'hémolymphe et affecte l'efficacité du tampon de la bandelette du glucomètre (302). Donc, la mesure de la concentration du glucose est altérée. Ainsi, il aurait été intéressant d'analyser l'effet inhibiteur de l'enzyme phenylthiourée sur l'activité de la mélanisation dans le temps (303).

Un autre défi consiste à former les apiculteurs et les vétérinaires à extraire l'hémolymphe des abeilles tout en élaborant une méthode rapide et efficace pour maintenir la stabilité (mélanisation) de l'échantillon. Le temps approximatif pour réaliser la technique de prélèvement d'hémolymphe varie en fonction du nombre d'abeilles récoltées et de l'expérience du technicien. Le temps requis pour préparer un échantillon d'hémolymphe dilué regroupant 16-30 abeilles est estimé à 30 minutes. L'accès à une méthode d'anesthésie efficace (CO₂) à l'extérieur d'un laboratoire demeure encore une contrainte pratique du projet. Le nombre minimal d'abeilles à récolter doit être également établi afin de s'assurer que les concentrations en sucres mesurées par le glucomètre soit les plus représentatives de la population de la ruche. La technique de prélèvement d'hémolymphe des abeilles pourrait aussi être optimisée afin de réduire les risques de contamination lors des analyses bactériologiques. Plusieurs améliorations pourraient être apportées : stérilisation de l'équipement et utilisation de gants stériles. Étant donné que le microbiote intestinal est déstabilisé lors d'un stress, il serait intéressant d'étudier l'effet de l'altération du microbiote intestinal lors de varroase.

Bien que les concentrations en sucres sériques soient nettement diminuées chez les abeilles fortement parasitées par varroa en automne, ce paramètre pourrait devenir un indicateur potentiel de la mortalité hivernale, mais le tout demeure à être prouvé statistiquement. Pour ce faire, il faudrait continuer de suivre les concentrations en sucres sériques sur la période hivernale. Les données récoltées auraient permis d'évaluer le taux de survie hivernale en fonction de chaque unité (mmol/L) de glucose.

Le suivi des infections virales dans l'étude cohorte mérite d'être amélioré. Il aurait été envisageable d'établir un suivi des trois paramètres étudiés à chaque temps de prélèvement. En fonction des connaissances biologiques connues de l'abeille, il est recommandé d'échantillonner au moins trois fois par saison : début du printemps, milieu de l'été et fin de l'automne (270). Par contre, seulement deux échantillonnages (été et automne) ont été réalisés pour l'analyse virale alors que trois ont été effectués pour les autres paramètres étudiés (bactériologie et concentration en sucres sériques) (270). Il aurait été également intéressant de répertorier les signes cliniques au sein de la ruche afin de les corrélés avec les charges virales analysées. Par ailleurs, l'extraction des virus dans varroa provenant de chaque ruche étudiée serait une composante complémentaire qui aurait démontré directement son rôle vectoriel mécanique et multiplicateur pour chacun des virus étudiés, ce qui aurait permis de bonifier les données de la littérature, comme celles rapportées par Lester *et al.* (240).

La taille d'échantillonnage utilisée dans ce projet de recherche est petite (regroupement de 10 abeilles) pour l'analyse virale (RT-qPCR multiplexe). Cette proportion risque de ne pas représenter l'ensemble de la population au sein de la colonie, qui se compte par milliers. D'un autre côté, l'échantillonnage est demeuré constant en utilisant des abeilles de la hausse à miel, soit plus âgées, ayant été exposées plus longtemps au varroa (270).

5.3 Conclusion et perspectives

5.3.1 Conclusion

En conclusion, cette étude a démontré que les abeilles exposées à une infestation élevée par varroa présentent une plus grande charge de virus, qui augmente dans le temps, sans toutefois accroître le risque d'infection bactérienne. Cette longue exposition combinée du parasitisme et des infections virales diminue la concentration en sucres dans l'hémolymphe. L'ensemble de ces changements provoque une mortalité des colonies. Ces

paramètres sont potentiellement des prédicteurs de mortalité hivernale des colonies d'abeilles au Canada.

5.3.2 Perspectives

Dans l'avenir, différents aspects de l'infestation par varroa méritent d'être étudiés pour optimiser les chances de survies hivernales, comme les changements histologiques du corps gras dont varroa se nourrit, le comptage/différentiel des hémocytes et la résistance génétique au varroa.

Les prochains défis dans le domaine de la médecine apicole consistent au développement de traitements prophylactiques efficaces contre les infections virales, compte tenu de l'absence de médicaments antiviraux et de l'apparition subite de signes cliniques dans une ruche (180). Malgré le fait qu'il existe des données sur l'injection ou l'ingestion d'ARN double brins pour diminuer la réplication de virus (180, 304, 305), il serait pertinent de développer un traitement antiviral plus accessible pour les apiculteurs tout en contrôlant le taux parasitaire. Cette innovation permettrait d'établir un traitement curatif sur les abeilles de ruches présentant des signes d'infection virale. Traiter l'infection virale optimiserait les chances de survie de la colonie cliniquement malade plutôt que de miser seulement sur les traitements préventifs antiparasitaires.

Notre étude a isolé les charges virales chez les abeilles adultes seulement. Étant donné que varroa infeste et se nourrit des larves et des nymphes (6), un échantillonnage des abeilles en développement serait intéressant pour déterminer si les différents paramètres étudiés (bactériologie, virologie, concentrations en sucres) diffèrent des abeilles adultes, comme dans les travaux de Marche *et al.* (175), de Tentcheva *et al.* (206) et de Gauthier *et al.* (214).

Étant donné que varroa se nourrit du corps gras de l'abeille (80), une analyse histologique de cet organe constituerait un aspect intéressant à développer, ce qui n'est pas encore rapporté dans la littérature à ce jour. Après avoir établi un profil anatomique normal du

corps gras de l'abeille en histologie, il serait possible de corréler les changements observés au microscope avec le parasitisme et la charge virale. Les altérations histologiques notées pourraient devenir un indice prédictif de la survie des abeilles. Des études histologiques ont déjà été réalisées sur d'autres organes de l'abeille. Par exemple, l'effet de varroa sur les glandes hypopharyngiennes d'ouvrières a déjà été étudié en utilisant une analyse histomorphométrique et histologique (306). Une autre étude a analysé l'histologie des glandes hypopharyngiennes d'abeilles émergentes infectées par varroa et le DWV (203).

L'élevage d'abeilles résistantes à *Varroa destructor* (plus agressives, avec un toilettage efficace, etc.) et à des charges virales élevées par une sélection génétique est un domaine grandissant, pouvant potentiellement les aider à mieux résister aux maladies (107). Par exemple, les abeilles *Apis mellifera* résistantes à varroa sont développées à travers le monde (Brésil, Afrique du Sud, France, Tunisie, Suède, Russie, Tanzanie et États-Unis) (307). L'effet significatif des traits de résistance au varroa varie selon les localités, avec un grand nombre de traits observés chez les abeilles du Brésil, d'Afrique du Sud et de Russie (307). Les traits les plus souvent rencontrés sont le comportement hygiénique, le toilettage et la réduction de la reproduction/développement de varroa (107, 307-310). La sélection de souches, au moyen d'études de sélection naturelle d'abeilles européennes naturellement résistantes et adaptées aux hivers canadiens, pourrait être également une option intéressante à envisager.

En conclusion, plusieurs défis demeurent à être relevés dans la communauté scientifique. Le principal enjeu sera d'arrimer l'expertise de chaque spécialiste (vétérinaires, entomologistes, etc.) pour faire avancer les connaissances et adapter les outils disponibles dans un but commun de protéger les populations d'abeilles.

Chapitre 6 – Références bibliographiques

1. Statistical overview of the Canadian honey and bee industry and the economic contribution of honey bee pollination. Statistical overview of the Canadian honey and bee industry Agriculture and Agri-Food Canada 2017. p. 19.
2. Ferland J, Kempers M, Kennedy K, Kozak P, Lafrenière R, Maund C, et al. CAPA statement on honey bee wintering losses in Canada (2019). Hivelights. 2019;32(4):13, 5, 7-20.
3. Claing G, Kempers M, Kennedy K, Kozak P, Lafrenière R, Maund C, et al. CAPA statement on honey bee wintering losses in Canada (2020). Hivelights. 2020;34(2):17-29.
4. Ferland J, Kempers M, Kozak P, Lafrenière R, Maund C, Menzies C, et al. CAPA report on honey bee wintering losses in Canada (2022). 2022.
5. Noel A, Le Conte Y, Mondet F. *Varroa destructor*: how does it harm *Apis mellifera* honey bees and what can be done about it? Emerg Top Life Sci. 2020;4(1):45-57.
6. Vidal-Naquet N, Lewbart G, Vallat B. Honeybee veterinary medicine : *Apis mellifera*. 1^e éd. Sheffield, United Kingdom: 5M Publishing; 2015.
7. Aguila JR, Suszko J, Gibbs AG, Hoshizaki DK. The role of larval fat cells in adult *Drosophila melanogaster*. J Exp Biol. 2007;210(Pt 6):956-63.
8. Winston ML. The biology of the honey bee. Cambridge, Massachusetts: Harvard University Press; 1987.
9. Le Conte Y. Les races d'abeilles. Traité Rustica de l'Apiculture. 2^e éd: Rustica Editions ; 2006. p. 40-51.
10. Radcliffe RW. The superorganism and herd health for the honey bee. Dans: Kane T, Faux C, rédacteurs. Honey bee medicine for the veterinary practitioner: John Wiley & Sons Inc.; 2021. p. 21-31.
11. Bayeta A. Molecular analysis during the embryo development of honeybees: LAP Lambert Academic Publishing; 2014.
12. Chan MYM. Development and application of honey bee in vitro systems. Vancouver: University of British Columbia; 2012.

13. Knoll S, Pinna W, Varcasia A, Scala A, Cappai MG. The honey bee (*Apis mellifera* L., 1758) and the seasonal adaptation of productions. highlights on summer to winter transition and back to summer metabolic activity. A review. *Livest Sci.* 2020;235.
14. Seeley TD. Adaptive significance of the age polyethism schedule in honeybee colonies. *Behav Ecol Sociobiol.* 1982;11(4):287-93.
15. Radcliffe RM. Physiology of the honey bee – principles for the beekeeper and veterinarian. Dans: Kane T, Faux C, rédacteurs. *Honey bee medicine for the veterinary practitioner: John Wiley & Sons Inc.*; 2021. p. 41-53.
16. Huang Z-Y, Robinson GE. Social control of division of labor in honey bee colonies. Dans: Detrain C, Deneubourg JL, Pasteels JM, rédacteurs. *Information processing in social insects.* Basel: Birkhäuser Basel; 1999. p. 165-86.
17. Robinson GE. Regulation of division of labor in insect societies. *Annu Rev Entomol.* 1992;37(1):637-65.
18. Nilsen KA, Ihle KE, Frederick K, Fondrk MK, Smedal B, Hartfelder K, et al. Insulin-like peptide genes in honey bee fat body respond differently to manipulation of social behavioral physiology. *J Exp Biol.* 2011;214(Pt 9):1488-97.
19. Amdam GV, Norberg K, Hagen A, Omholt SW. Social exploitation of vitellogenin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(4):1799-802.
20. Huang ZY, Robinson GE. Honeybee colony integration: worker-worker interactions mediate hormonally regulated plasticity in division of labor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89(24):11726-9.
21. Amdam GV, Fennern E, Havukainen H. Vitellogenin in honey bee behavior and lifespan. Dans: Galizia CG, Eisenhardt D, Giurfa M, rédacteurs. *Honeybee neurobiology and behavior: a tribute to Randolph Menzel.* Dordrecht: Springer Netherlands; 2012. p. 17-29.
22. Seehuus S-C, Norberg K, Gimsa U, Krekling T, Amdam GV. Reproductive protein protects functionally sterile honey bee workers from oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(4):962-7.
23. Amdam GV, Hartfelder K, Norberg K, Hagen A, Omholt SW. Altered physiology in worker honey bees (Hymenoptera: Apidae) infested with the mite *Varroa destructor*

(Acari: Varroidae): a factor in colony loss during overwintering? J Econ Entomol. 2004;97(3):741-7.

24. Keeley L. Physiology and biochemistry of the fat body. Dans: Kerkut G, Gilbert L, rédacteurs. Integument, respiration and circulation: Elsevier Science; 2013. p. 211-49.

25. Kunc M, Dobeš P, Hurychová J, Vojtek L, Poiani SB, Danihlík J, et al. The year of the honey bee (*Apis mellifera* L.) with respect to its physiology and immunity: a search for biochemical markers of longevity. Insects. 2019;10(8):244.

26. Amdam GV, Simões ZLP, Hagen A, Norberg K, Schröder K, Mikkelsen Ø, et al. Hormonal control of the yolk precursor vitellogenin regulates immune function and longevity in honeybees. Exp Gerontol. 2004;39(5):767-73.

27. Fluri P, Lüscher M, Wille H, Gerig L. Changes in weight of the pharyngeal gland and haemolymph titres of juvenile hormone, protein and vitellogenin in worker honey bees. J Insect Physiol. 1982;28(1):61-8.

28. Döke MA, Frazier M, Grozinger CM. Overwintering honey bees: biology and management. Curr Opin Insect Sci. 2015;10:185-93.

29. Amdam GV, Omholt SW. The regulatory anatomy of honeybee lifespan. J Theor Biol. 2002;216(2):209-28.

30. Corona M, Velarde RA, Remolina S, Moran-Lauter A, Wang Y, Hughes KA, et al. Vitellogenin, juvenile hormone, insulin signaling, and queen honey bee longevity. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007;104(17):7128-33.

31. Huang Z-Y, Robinson GE, Tobe SS, Yagi KJ, Strambi C, Strambi A, et al. Hormonal regulation of behavioural development in the honey bee is based on changes in the rate of juvenile hormone biosynthesis. J Insect Physiol. 1991;37(10):733-41.

32. Huang ZY, Robinson GE. Seasonal changes in juvenile hormone titers and rates of biosynthesis in honey bees. J Comp Physiol B. 1995;165(1):18-28.

33. Li S, Yu X, Feng Q. Fat body biology in the last decade. Annu Rev Entomol. 2019;64:315-33.

34. Mattila HR, Harris JL, Otis GW. Timing of production of winter bees in honey bee (*Apis mellifera*) colonies. Insectes Soc. 2001;48(2):88-93.

35. Rodriguez Messan M, Page RE, Kang Y. Effects of vitellogenin in age polyethism and population dynamics of honeybees. Ecol Modell. 2018;388:88-107.

36. Phillips EF, Demuth GS. The temperature of the honeybee cluster in winter: US Department of Agriculture; 1914.
37. Heinrich B, Esch H. Thermoregulation in bees. *American Scientist*. 1994;82(2):164-70.
38. Hrassnigg N, Crailsheim K. Differences in drone and worker physiology in honeybees (*Apis mellifera*). *Apidologie*. 2005;36(2):255-77.
39. Fries I, Camazine S. Implications of horizontal and vertical pathogen transmission for honey bee epidemiology. *Apidologie*. 2001;32(3):199-214.
40. Kang Y, Blanco K, Davis T, Wang Y, DeGrandi-Hoffman G. Disease dynamics of honeybees with *Varroa destructor* as parasite and virus vector. *Math Biosci*. 2016;275:71-92.
41. Fluri P, Bogdanov S. Age dependence of fat body protein in summer and winter bees. *Proc 10th Int Congr IUSSI*. 1986.
42. Davidson G. Honey bee pharmacology. Dans: Kane T, Faux C, rédacteurs. *Honey bee medicine for the veterinary practitioner*: John Wiley & Sons Inc.; 2021. p. 135-48.
43. Mullins D. Chemistry and physiology of the hemolymph. *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology*. 1985;3:355-400.
44. Kanost MR. Chapter 117 - Hemolymph. Dans: Resh VH, Cardé RT, rédacteurs. *Encyclopedia of Insects (Second Edition)*. 2^e éd. San Diego: Academic Press; 2009. p. 446-9.
45. Chan QW, Howes CG, Foster LJ. Quantitative comparison of caste differences in honeybee hemolymph. *Mol Cell Proteomics*. 2006;5(12):2252-62.
46. Gillott C. *Entomology*: Springer Science & Business Media; 2005.
47. Blatt J, Roces F. Haemolymph sugar levels in foraging honeybees (*Apis mellifera carnica*): dependence on metabolic rate and in vivo measurement of maximal rates of trehalose synthesis. *J Exp Biol*. 2001;204(Pt 15):2709-16.
48. Even N, Devaud JM, Barron AB. General stress responses in the honey bee. *Insects*. 2012;3(4):1271-98.
49. Mayack C, Phalen N, Carmichael K, White HK, Hirche F, Wang Y, et al. Appetite is correlated with octopamine and hemolymph sugar levels in forager honeybees. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol*. 2019;205(4):609-17.

50. Woodring J, Boulden M, Das S, Gäde G. Studies on blood sugar homeostasis in the honeybee (*Apis mellifera*, L.). *J Insect Physiol.* 1993;39(1):89-97.
51. Zachariah TT. Terrestrial invertebrates. Dans: Heatley JJ, Russell KE, rédacteurs. *Exotic animal laboratory diagnosis*: John Wiley & Sons, Inc.; 2020. p. 409-28.
52. Arrese EL, Soulagés JL. Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. *Annu Rev Entomol.* 2010;55:207-25.
53. Thompson SN. Trehalose – The insect ‘blood’ sugar. *Adv In Insect Phys*: Academic Press; 2003. p. 205-85.
54. Iturriaga G, Suárez R, Nova-Franco B. Trehalose metabolism: from osmoprotection to signaling. *Int J Mol Sci.* 2009;10(9).
55. Canavoso LE, Jouni ZE, Karnas KJ, Pennington JE, Wells MA. Fat metabolism in insects. *Annu Rev Nutr.* 2001;21:23-46.
56. Božič J, Woodring J. Effect of activity on the haemolymph sugar titres in honey bees. *J Apic Res.* 1997;36(1):33-9.
57. Crailsheim K. Regulation of food passage in the intestine of the honeybee (*Apis mellifera* L.). *J Insect Physiol.* 1988;34(2):85-90.
58. Kunieda T, Fujiyuki T, Kucharski R, Foret S, Ament SA, Toth AL, et al. Carbohydrate metabolism genes and pathways in insects: insights from the honey bee genome. *Insect Mol Biol.* 2006;15(5):563-76.
59. Lopienska-Biernat E, Zoltowska K, Zaobidna EA, Dmitryjuk M, Bak B. Developmental changes in gene expression and enzyme activities of anabolic and catabolic enzymes for storage carbohydrates in the honeybee, *Apis mellifera*. *Insectes Soc.* 2018;65(4):571-80.
60. Lorenz MW, Kellner R, Woodring J, Hoffmann KH, Gäde G. Hypertrehalosaemic peptides in the honeybee (*Apis mellifera*): purification, identification and function. *J Insect Physiol.* 1999;45(7):647-53.
61. Akülkü İ, Ghanem S, Filiztekin E, Suwannapong G, Mayack C. Age-dependent honey bee appetite regulation is mediated by trehalose and octopamine baseline levels. *Insects.* 2021;12(10):863.

62. Blatt J, Roces F. The control of the proventriculus in the honeybee (*Apis mellifera carnica* L.) I. A dynamic process influenced by food quality and quantity? J Insect Physiol. 2002;48(6):643-54.
63. Mayack C, Naug D. Parasitic infection leads to decline in hemolymph sugar levels in honeybee foragers. J Insect Physiol. 2010;56(11):1572-5.
64. Mayack C, Carmichael K, Phalen N, Khan Z, Hirche F, Stangl GI, et al. Gas chromatography – Mass spectrometry as a preferred method for quantification of insect hemolymph sugars. J Insect Physiol. 2020;127:104115.
65. Fell RD. The qualitative and quantitative analysis of insect hemolymph sugars by high performance thin-layer chromatography. Comp Biochem Physiol A Physiol. 1990;95(4):539-44.
66. Abou-Seif MA, Maier V, Fuchs J, Mezger M, Pfeiffer EF, Bounias M. Fluctuations of carbohydrates in haemolymph of honeybee (*Apis mellifica*) after fasting, feeding and stress. Horm Metab Res. 1993;25(1):4-8.
67. Bounias M, Morgan MRJ. Induction of honeybee haemolymph sucrose activity by high levels of dietary sucrose. Comp Biochem Physiol B. 1984;79(1):75-80.
68. Kanamori Y, Saito A, Hagiwara-Komoda Y, Tanaka D, Mitsumasu K, Kikuta S, et al. The trehalose transporter 1 gene sequence is conserved in insects and encodes proteins with different kinetic properties involved in trehalose import into peripheral tissues. Insect Biochem Mol Biol. 2010;40(1):30-7.
69. Lum PY, Chino H. Trehalose, the insect blood sugar, inhibits loading of diacylglycerol by lipophorin from the fat body in locusts. Biochem Biophys Res Commun. 1990;172(2):588-94.
70. Simpson S. Trehalose - The insect 'blood' sugar. Dans: Simpson S, rédacteur. Advances in insect physiology: Elsevier Science; 2003. p. 308.
71. Shukla E, Thorat LJ, Nath BB, Gaikwad SM. Insect trehalase: physiological significance and potential applications. Glycobiology. 2014;25(4):357-67.
72. Nardelli A, Vecchi M, Mandrioli M, Manicardi GC. The evolutionary history and functional divergence of trehalase (treh) genes in insects. Front Physiol. 2019;10:62-.

73. Wegener G, Macho C, Schloder P, Kamp G, Ando O. Long-term effects of the trehalase inhibitor trehazolin on trehalase activity in locust flight muscle. *J Exp Biol.* 2010;213(Pt 22):3852-7.
74. Gussin AES, Wyatt GR. Membrane-bound trehalase from cecropia silkworm muscle. *Arch Biochem Biophys.* 1965;112(3):626-34.
75. Fischl J, Ishay J, Talmor N. Trehalase: extraction from the midgut of larvae of the oriental hornet and its use in microdetermination of trehalose. *Insect Biochemistry.* 1976;6(1):53-8.
76. Mitsumasu K, Azuma M, Niimi T, Yamashita O, Yaginuma T. Membrane-penetrating trehalase from silkworm *Bombyx mori*. Molecular cloning and localization in larval midgut. *Insect Mol Biol.* 2005;14(5):501-8.
77. Roma GC, Bueno OC, Camargo-Mathias MI. Morpho-physiological analysis of the insect fat body: a review. *Micron.* 2010;41(5):395-401.
78. Stell IM. *Understanding bee anatomy: a full colour guide*: The Catford Press; 2012.
79. Hoshizaki DK, Blackburn T, Price C, Ghosh M, Miles K, Ragucci M, et al. Embryonic fat-cell lineage in *Drosophila melanogaster*. *Development.* 1994;120(9):2489-99.
80. Ramsey SD, Ochoa R, Bauchan G, Gulbranson C, Mowery JD, Cohen A, et al. *Varroa destructor* feeds primarily on honey bee fat body tissue and not hemolymph. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019;116(5):1792-801.
81. Toprak U, Hegedus D, Dogan C, Guney G. A journey into the world of insect lipid metabolism. *Arch Insect Biochem Physiol.* 2020;104(2):e21682.
82. Rollo JP, Mathias MIC. Morphohistochemical characterization of the perivisceral fat body in royal and worker female castes in different ages of *Atta sexdens rubropilosa* ants (Hymenoptera, Formicidae). *Sociobiology.* 2006:519-30.
83. Ruvolo MCC, Cruz-Landim Cd. Morphologic and morphometric aspects of oenocytes of *Apis mellifera* queens and workers in different phases of life. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1993;88(3):387-95.
84. Makki R, Cinnamon E, Gould AP. The development and functions of oenocytes. *Annu Rev Entomol.* 2014;59:405-25.

85. Martins G, Ramalho-ortigo JM. Oenocytes in insects. *Invertebrate Survival Journal*. 2012;9:139-52.
86. Sjaastad OV, Sand O, Hove K. *Physiology of domestic animals*. 2^e éd. Oslo: Scandinavian Veterinary Press; 2010.
87. Marringa WJ, Krueger MJ, Burritt NL, Burritt JB. Honey bee hemocyte profiling by flow cytometry. *PLoS One*. 2014;9(10):e108486.
88. Wegener J, Ruhnke H, Scheller K, Mispagel S, Knollmann U, Kamp G, et al. Pathogenesis of varroosis at the level of the honey bee (*Apis mellifera*) colony. *J Insect Physiol*. 2016;91-92:1-9.
89. Amdam GV, Aase ALTO, Seehuus S-C, Kim Fondrk M, Norberg K, Hartfelder K. Social reversal of immunosenescence in honey bee workers. *Exp Gerontol*. 2005;40(12):939-47.
90. Rutz W. A bioassay for juvenile hormone (JH) effects of insect growth regulators (IGR) on adult worker honeybees. *Journal of the Swiss Entomological Society*. 1974:307-13.
91. Lavine MD, Strand MR. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochem Mol Biol*. 2002;32(10):1295-309.
92. Evans JD, Spivak M. Socialized medicine: individual and communal disease barriers in honey bees. *J Invertebr Pathol*. 2010;103 Suppl 1:S62-72.
93. Söderhäll K, Cerenius L. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Curr Opin Immunol*. 1998;10(1):23-8.
94. Yi HY, Chowdhury M, Huang YD, Yu XQ. Insect antimicrobial peptides and their applications. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2014;98(13):5807-22.
95. Casteels P, Ampe C, Jacobs F, Vaeck M, Tempst P. Apidaecins: antibacterial peptides from honeybees. *EMBO J*. 1989;8(8):2387-91.
96. Wilson-Rich N, Dres ST, Starks PT. The ontogeny of immunity: Development of innate immune strength in the honey bee (*Apis mellifera*). *J Insect Physiol*. 2008;54(10):1392-9.
97. Kanost M, Gorman MJ. Phenoloxidases in insect immunity. Dans: Beckage NE, rédacteur. *Insect immunology*. San Diego, USA: Elsevier Science & Technology; 2008. p. 69-96.

98. Mak TW, Saunders ME. 21 - Comparative immunology. Dans: Mak TW, Saunders ME, rédacteurs. The immune response. Burlington: Academic Press; 2006. p. 611-37.
99. Sorescu I. Honey bee (*Apis mellifera* L.) haemocytes: morphological characters, classification, multiplication and distribution in the organism. Studies and Researches in Veterinary Medicine. 2003;9:87-122.
100. Gupta A. 10 - Cellular elements in the hemolymph. Dans: Kerkut G, Gilbert L, rédacteurs. Integument, respiration and circulation: Elsevier Science; 2013. p. 401-44.
101. B. Larouche C, Beeler-Marfisi J, Attard L, Nemeth N, Beaufrère H. Hemolymph cytology, hemocyte count, glucose, and electrolyte reference intervals in 93 Cameroon red tarantulas (*Hysteroocrates gigas*). Vet Clin Pathol. 2019;48(3):461-8.
102. Richardson RT, Ballinger MN, Qian F, Christman JW, Johnson RM. Morphological and functional characterization of honey bee, *Apis mellifera*, hemocyte cell communities. Apidologie. 2018;49(3):397-410.
103. Strand MR. The insect cellular immune response. Insect Science. 2008;15(1):1-14.
104. Guzman-Novoa E, Emsen B, Unger P, Espinosa-Montaña LG, Petukhova T. Genotypic variability and relationships between mite infestation levels, mite damage, grooming intensity, and removal of *Varroa destructor* mites in selected strains of worker honey bees (*Apis mellifera* L.). J Invertebr Pathol. 2012;110(3):314-20.
105. Mondet F, Beaurepaire A, McAfee A, Locke B, Alaux C, Blanchard S, et al. Honey bee survival mechanisms against the parasite *Varroa destructor*: a systematic review of phenotypic and genomic research efforts. Int J Parasitol. 2020;50(6-7):433-47.
106. Peng Y-S, Fang Y, Xu S, Ge L. The resistance mechanism of the Asian honey bee, *Apis cerana* Fabr., to an ectoparasitic mite, *Varroa jacobsoni* Oudemans. J Invertebr Pathol. 1987;49(1):54-60.
107. Peck DT. The parasitic mite *Varroa destructor*. Dans: Kane T, Faux C, rédacteurs. Honey bee medicine for the veterinary practitioner: John Wiley & Sons Inc.; 2021. p. 235-51.
108. Boot WJ, Calis JN, Beetsma J, Hai DM, Lan NK, Toan TV, et al. Natural selection of *Varroa jacobsoni* explains the different reproductive strategies in colonies of *Apis cerana* and *Apis mellifera*. Experimental & applied acarology. 1999;23(2):133-44.

109. Oudemans AC. On a new genus and species of parasitic Acari. Notes from the Leyden Museum. 1904;24:216-22.
110. Anderson DL, Trueman JW. *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) is more than one species. Exp Appl Acarol. 2000;24(3):165-89.
111. Rosenkranz P, Aumeier P, Ziegelmann B. Biology and control of *Varroa destructor*. J Invertebr Pathol. 2010;103:S96-S119.
112. Nazzi F, Le Conte Y. Ecology of *Varroa destructor*, the major ectoparasite of the western honey bee, *Apis mellifera*. Annu Rev Entomol. 2016;61:417-32.
113. Yevstafieva VO, Zaloznaya LM, Nazarenko OS, Melnychuk VV, Sobolta AG. Morphological variation of *Varroa destructor* (Parasitiformes, Varroidae) in different seasons. Biosyst Divers. 2020;28(1):18-23.
114. Oldroyd BP. Coevolution while you wait: *Varroa jacobsoni*, a new parasite of western honeybees. Trends Ecol Evol. 1999;14(8):312-5.
115. Evans JD, Cook SC. Genetics and physiology of *Varroa* mites. Curr Opin Insect Sci. 2018;26:130-5.
116. Solognac M, Cornuet JM, Vautrin D, Le Conte Y, Anderson D, Evans J, et al. 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. 2005;272(1561):411-9.
117. Eliash N, Singh NK, Thangarajan S, Sela N, Leshkowitz D, Kamer Y, et al. Chemosensing of honeybee parasite, *Varroa destructor*: transcriptomic analysis. Sci Rep. 2017;7(1):13091.
118. Liu T, Peng Y-S. Palpal tarsal *sensilla* of the female mite, *Varroa jacobsoni* Oudemans (Acari: Varroidae). Can Entomol. 1990;122(2):295-300.
119. Walter DE, Proctor HC. Mites: ecology, evolution and behaviour. Wallingford, UK: CABI Publishing; 1999.
120. Cohen AC. Extra-oral digestion in predaceous terrestrial Arthropoda. Annu Rev Entomol. 1995;40(1):85-103.
121. Dillier F-X, Fluri P, Imdorf A. Review of the orientation behaviour in the bee parasitic mite *Varroa destructor*: sensory equipment and cell invasion behaviour. Rev Suisse Zool. 2006;113(4):857-78.

122. Tewarson N. Nutrition and reproduction in the ectoparasitic honey bee (*Apis* sp.) Mite, *Varroa jacobsoni*: Tewarson, Naresh Chandra.; 1983.
123. Posada-Florez F, Sonenshine DE, Egekwu NI, Rice C, Lupitsky R, Cook SC. Insights into the metabolism and behaviour of *Varroa destructor* mites from analysis of their waste excretions. *Parasitology*. 2019;146(4):527-32.
124. Erickson E, Cohen A, Cameron B. Mite *excreta*: a new diagnostic for varroasis. *Bee Science*. 1994;3:76-8.
125. Dmitryjuk M, Źołtowska K, Frączek R, Lipiński Z. Esterases of *Varroa destructor* (Acari: Varroidae), parasitic mite of the honeybee. *Exp Appl Acarol*. 2014;62(4):499-510.
126. McAfee A, Chan QWT, Evans J, Foster LJ. A *Varroa destructor* protein atlas reveals molecular underpinnings of developmental transitions and sexual differentiation. *Mol Cell Proteomics*. 2017;16(12):2125-37.
127. Boot WJ, Beetsma J, Calis JNM. Behaviour of *Varroa* mites invading honey bee brood cells. *Exp Appl Acarol*. 1994;18(6):371-9.
128. Boot WJ, Driessen RG, Calis JNM, Beetsma J. Further observations on the correlation between attractiveness of honey bee brood cells to *Varroa jacobsoni* and the distance from larva to cell rim. *Entomol Exp Appl*. 1995;76(3):223-32.
129. Nazzi F, Milani N, Della Vedova G. A semiochemical from larval food influences the entrance of *Varroa destructor* into brood cells. *Apidologie*. 2004;35(4):403-10.
130. De Ruijter A. Reproduction of *Varroa jacobsoni* during successive brood cycles of the honeybee. *Apidologie*. 1987;18(4):321-6.
131. Martin SJ. Ontogenesis of the mite *Varroa jacobsoni* Oud. in worker brood of the honeybee *Apis mellifera* L. under natural conditions. *Exp Appl Acarol*. 1994;18(2):87-100.
132. Martin S, Cook C. Effect of host brood type on the number of offspring laid by the honeybee parasite *Varroa jacobsoni*. *Exp Appl Acarol*. 1996;20(7):387-90.
133. Calderone NW, Kuenen LPS. Effects of western honey bee (Hymenoptera: Apidae) colony, cell type, and larval sex on host acquisition by female *Varroa destructor* (Acari: Varroidae). *J Econ Entomol*. 2001;94(5):1022-30.
134. Calderone NW, Lin S, Kuenen LP. Differential infestation of honey bee, *Apis mellifera*, worker and queen brood by the parasitic mite *Varroa destructor*. *Apidologie*. 2002;33(4):389-98.

135. Fernández N, Eguaras M, Hernández D. Distribution patterns of *Varroa jacobsoni* Oud on *Apis mellifera* L during winter in Argentina. *Apidologie*. 1993;24(4):397-401.
136. Kraus B. Preferences of *Varroa jacobsoni* for honey bees (*Apis mellifera* L.) of different ages. *J Apic Res*. 1993;32(2):57-64.
137. Cervo R, Bruschini C, Cappa F, Meconcelli S, Pieraccini G, Pradella D, et al. High *Varroa* mite abundance influences chemical profiles of worker bees and mite-host preferences. *J Exp Biol*. 2014;217(Pt 17):2998-3001.
138. Sammataro D, Gerson U, Needham G. Parasitic mites of honey bees: life history, implications, and impact. *Annu Rev Entomol*. 2000;45:519-48.
139. Peck DT, Smith ML, Seeley TD. *Varroa destructor* mites can nimbly climb from flowers onto foraging honey bees. *PLoS One*. 2016;11(12):e0167798.
140. Peck DT, Seeley TD. Mite bombs or robber lures? The roles of drifting and robbing in *Varroa destructor* transmission from collapsing honey bee colonies to their neighbors. *PLoS One*. 2019;14(6):e0218392.
141. Pettis JS, Ochoa R, Orr J. Interception of a live *Varroa* mite on imported cut flowers in the United States. *Int J Acarol*. 2003;29(3):291-2.
142. Hartwig A, Jedruszuk V, rédacteurs. Survival of *Varroa jacobsoni* mites on flowers. *Proceedings of the XXXI International Congress on Apiculture*; 1987.
143. Le Conte Y, Arnold G, Trouiller J, Masson C, Chappe B, Ourisson G. Attraction of the parasitic mite *Varroa* to the drone larvae of honey bees by simple aliphatic esters. *Science*. 1989;245(4918):638-9.
144. Piccolo FD, Nazzi F, Vedova GD, Milani N. Selection of *Apis mellifera* workers by the parasitic mite *Varroa destructor* using host cuticular hydrocarbons. *Parasitology*. 2010;137(6):967-73.
145. Martin C, Salvy M, Provost E, Bagnères A, Roux M, Crauser D, et al. Variations in chemical mimicry by the ectoparasitic mite *Varroa jacobsoni* according to the developmental stage of the host honey-bee *Apis mellifera*. *Insect Biochem Mol Biol*. 2001;31(4-5):365-79.
146. Hoppe H, Ritter W. The influence of the Nasonov pheromone on the recognition of house bees and foragers by *Varroa jacobsoni*. *Apidologie*. 1988;19(2):165-72.

147. Kraus B, Koeniger N, Fuchs S. Unterscheidung zwischen Bienen verschiedenen Alters durch *Varroa jacobsoni* OUD. und Bevorzugung von Ammenbienen im Sommerbienenvolk. *Apidologie*. 1986;17(3):257-66.
148. Xie X, Huang ZY, Zeng Z. Why do *Varroa* mites prefer nurse bees? *Sci Rep*. 2016;6(1):1-6.
149. Kuenen L, Calderone N. Transfers of *Varroa* mites from newly emerged bees: Preferences for age-and function-specific adult bees (Hymenoptera: Apidae). *J Insect Behav*. 1997;10(2):213-28.
150. Le Conte Y, Arnold G. Influence de l'âge des abeilles (*Apis Mellifica* L.) et de la chaleur sur le comportement de *Varroa jacobsoni* oud. *Apidologie*. 1987;18(4):305-20.
151. Kather R, Drijfhout FP, Shemilt S, Martin SJ. Evidence for passive chemical camouflage in the parasitic mite *Varroa destructor*. *J Chem Ecol*. 2015;41(2):178-86.
152. Le Conte Y, Huang ZY, Roux M, Zeng ZJ, Christidès JP, Bagnères AG. *Varroa destructor* changes its cuticular hydrocarbons to mimic new hosts. *Biol Lett*. 2015;11(6):20150233.
153. Bowen-Walker PL, Martin SJ, Gunn A. Preferential distribution of the parasitic mite, *Varroa jacobsoni* Oud. on overwintering honeybee (*Apis mellifera* L.) workers and changes in the level of parasitism. *Parasitology*. 1997;114(2):151-7.
154. Koetz AH. Ecology, behaviour and control of *Apis cerana* with a focus on relevance to the Australian incursion. *Insects*. 2013;4(4):558-92.
155. Eliash N, Mikheyev A. *Varroa* mite evolution: a neglected aspect of worldwide bee collapses? *Curr Opin Insect Sci*. 2020;39:21-6.
156. Fries I, Huazhen W, Wei S, Jin C, Shu. Grooming behavior and damaged mites (*Varroa jacobsoni*) in *Apis cerana cerana* and *Apis mellifera ligustica*. *Apidologie*. 1996;27(1):3-11.
157. Maggi MD, Sardella NH, Ruffinengo SR, Eguaras MJ. Morphotypes of *Varroa destructor* collected in *Apis mellifera* colonies from different geographic locations of Argentina. *Parasitol Res*. 2009;105(6):1629-36.
158. Giménez Martínez P, Mendoza Y, Invenizzi C, Fuselli S, Alonso Salces R, Fernández Iriarte P, et al. Morphometric correlation between *Apis mellifera* morphotypes

(Hymenoptera) and *Varroa destructor* (Acari) from Uruguay. J Apic Res. 2017;56(2):122-9.

159. Akimov I, Zaloznaya L, Efimov V, Galaktionov YK. Seasonal and geographical variation on morphological characters of *Varroa jacobsoni* (Parasitiformes, Varroidea): variation of mean values, standard deviations, and coefficients of fluctuating asymmetry. Entomol Rev. 1991;70(1):106-17.

160. Akimov I, Benedyk S, Zaloznaya L. Complex analysis of morphological characters of Gamasid mite *Varroa destructor* (Parasitiformes, Varroidea). Vestnik zoologi. 2004;38:57-66.

161. Kralj J, Brockmann A, Fuchs S, Tautz J. 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. 2007;193(3):363-70.

162. Kralj J, Fuchs S. Parasitic *Varroa destructor* mites influence flight duration and homing ability of infested *Apis mellifera* foragers. Apidologie. 2006;37(5):577-87.

163. Dmitryjuk M, Zalewski K, Raczkowski M, Żółtowska K. Composition of fatty acids in the *Varroa destructor* mites and their hosts, *Apis mellifera* drone-prepupae. Ann Parasitol. 2015;61(1):21-6.

164. Schneider P, Drescher W. The influence of *Varroa jacobsoni* Oud. on weight at emergence, development of weight and hypopharyngeal glands, and longevity of *Apis mellifera* L. Apidologie 1987;18(1):101-10.

165. Drescher W, Schneider P. Effect of the *Varroa* mite upon the fat body of worker bees and their tolerance of pesticides. Africanized honey bees and bee mites. 1988:452-6.

166. Yang X, Cox-Foster D. Effects of parasitization by *Varroa destructor* on survivorship and physiological traits of *Apis mellifera* in correlation with viral incidence and microbial challenge. Parasitology. 2007;134(Pt 3):405-12.

167. Bowen-Walker PL, Gunn A. The effect of the ectoparasitic mite, *Varroa destructor* on adult worker honeybee (*Apis mellifera*) emergence weights, water, protein, carbohydrate, and lipid levels. Entomol Exp Appl. 2001;101(3):207-17.

168. van Dooremalen C, Stam E, Gerritsen L, Cornelissen B, van der Steen J, van Langevelde F, et al. Interactive effect of reduced pollen availability and *Varroa destructor*

infestation limits growth and protein content of young honey bees. *J Insect Physiol.* 2013;59(4):487-93.

169. Janmaat AF, Winston ML, Ydenberg RC. Condition-dependent response to changes in pollen stores by honey bee (*Apis mellifera*) colonies with different parasitic loads. *Behav Ecol Sociobiol.* 2000;47(3):171-9.

170. De Jong D, De Jong P, Goncalves L. Weight loss and other damage to developing worker honeybees from infestation with *Varroa jacobsoni*. *J Apic Res.* 1982;21(3):165-7.

171. Duay P, De Jong D, Engels W. Weight loss in drone pupae (*Apis mellifera*) multiply infested by *Varroa destructor* mites. *Apidologie.* 2003;34(1):61-5.

172. Annoscia D, Del Piccolo F, Nazzi F. How does the mite *Varroa destructor* kill the honeybee *Apis mellifera*? Alteration of cuticular hydrocarbons and water loss in infested honeybees. *J Insect Physiol.* 2012;58(12):1548-55.

173. Duay P, De Jong D, Engels W. Decreased flight performance and sperm production in drones of the honey bee (*Apis mellifera*) slightly infested by *Varroa destructor* mites during pupal development. *Genet Mol Res.* 2002;1(3):227-32.

174. Salvy M, Martin C, BagnÈRes AG, Provost É, Roux M, Le Conte Y, et al. Modifications of the cuticular hydrocarbon profile of *Apis mellifera* worker bees in the presence of the ectoparasitic mite *Varroa jacobsoni* in brood cells. *Parasitology.* 2001;122(2):145-59.

175. Marche MG, Satta A, Floris I, Pusceddu M, Buffa F, Ruiu L. Quantitative variation in the core bacterial community associated with honey bees from *Varroa*-infested colonies. *J Apic Res.* 2019;58(3):444-54.

176. Zaobidna EA, Żółtowska K, Łopieńska-Biernat E. *Varroa destructor* induces changes in the expression of immunity-related genes during the development of *Apis mellifera* worker and drone broods. *Acta Parasitol.* 2017;62(4):779-89.

177. Koleoglu G, Goodwin PH, Reyes-Quintana M, Hamiduzzaman MM, Guzman-Novoa E. *Varroa destructor* parasitism reduces hemocyte concentrations and prophenol oxidase gene expression in bees from two populations. *Parasitol Res.* 2018;117(4):1175-83.

178. Wienands A, Madel G. Hämocyten der Honigbiene, *Apis mellifera*, und ihre Veränderungen durch Varroatose (Hymenoptera: Apidae). *Entomol Gen.* 1988:81-92.

179. Ullah A, Tlak Gajger I, Majoros A, Dar SA, Khan S, Kalimullah, et al. Viral impacts on honey bee populations: A review. *Saudi J Biol Sci.* 2021;28(1):523-30.
180. Amiri E, Rueppell O, Tarpy DR. Honey bee viral diseases. Dans: Kane T, Faux C, rédacteurs. *Honey bee medicine for the veterinary practitioner: John Wiley & Sons Inc.*; 2021. p. 253-75.
181. Di Prisco G, Pennacchio F, Caprio E, Boncristiani HF, Evans JD, Chen Y. *Varroa destructor* is an effective vector of Israeli acute paralysis virus in the honeybee, *Apis mellifera*. *J Gen Virol.* 2011;92(1):151-5.
182. Ribière M, Ball B, Aubert M. Natural history and geographical distribution of honey bee viruses. *Virology and the honey bee.* 2008:15-84.
183. Shen M, Cui L, Ostiguy N, Cox-Foster D. Intricate transmission routes and interactions between picorna-like viruses (Kashmir bee virus and sacbrood virus) with the honeybee host and the parasitic varroa mite. *J Gen Virol.* 2005;86(8):2281-9.
184. Shen M, Yang X, Cox-Foster D, Cui L. The role of varroa mites in infections of Kashmir bee virus (KBV) and deformed wing virus (DWV) in honey bees. *Virology.* 2005;342(1):141-9.
185. de Miranda JR, Cordoni G, Budge G. The acute bee paralysis virus-Kashmir bee virus-Israeli acute paralysis virus complex. *J Invertebr Pathol.* 2010;103 Suppl 1:S30-47.
186. Wieggers F. Transmission of honeybee viruses by *Varroa jacobsoni* Oud. *European research on varroa control: CRC Press;* 1988. p. 99-104.
187. Chen YP, Pettis JS, Collins A, Feldlaufer MF. Prevalence and transmission of honeybee viruses. *Appl Environ Microbiol.* 2006;72(1):606-11.
188. Santillán-Galicia MT, Carzaniga R, Ball BV, Alderson PG. Immunolocalization of deformed wing virus particles within the mite *Varroa destructor*. *J Gen Virol.* 2008;89(7):1685-9.
189. Tehel A, Vu Q, Bigot D, Gogol-Döring A, Koch P, Jenkins C, et al. The two prevalent genotypes of an emerging infectious disease, deformed wing virus, cause equally low pupal mortality and equally high wing deformities in host honey bees. *Viruses.* 2019;11(2):114.

190. McMahon DP, Natsopoulou ME, Doublet V, Fürst M, Weging S, Brown MJ, et al. Elevated virulence of an emerging viral genotype as a driver of honeybee loss. *Proc Biol Sci.* 2016;283(1833):20160811.
191. Bailey L, Ball BV, Perry JN. Association of viruses with two protozoal pathogens of the honey bee. *Ann Appl Biol.* 1983;103(1):13-20.
192. Bailey L, Gibbs AJ, Woods RD. Two viruses from adult honey bees (*Apis mellifera* Linnaeus). *Virology.* 1963;21(3):390-5.
193. Maori E, Lavi S, Mozes-Koch R, Gantman Y, Peretz Y, Edelbaum O, et al. 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.* 2007;88(Pt 12):3428-38.
194. Todd JH, De Miranda JR, Ball BV. Incidence and molecular characterization of viruses found in dying New Zealand honey bee (*Apis mellifera*) colonies infested with *Varroa destructor*. *Apidologie.* 2007;38(4):354-67.
195. Grozinger CM, Flenniken ML. Bee viruses: ecology, pathogenicity, and impacts. *Annu Rev Entomol.* 2019;64:205-26.
196. Lauring AS, Andino R. Quasispecies theory and the behavior of RNA viruses. *PLoS Pathog.* 2010;6(7):e1001005.
197. Obbink KK, Roth JA. Epidemiology and biosecurity. Dans: Kane T, Faux C, rédacteurs. *Honey bee medicine for the veterinary practitioner: John Wiley & Sons Inc.*; 2021. p. 209-18.
198. Martin SJ, Highfield AC, Brettell L, Villalobos EM, Budge GE, Powell M, et al. Global honey bee viral landscape altered by a parasitic mite. *Science.* 2012;336(6086):1304-6.
199. Paxton RJ, Schäfer MO, Nazzi F, Zanni V, Annoscia D, Marroni F, et al. Epidemiology of a major honey bee pathogen, deformed wing virus: potential worldwide replacement of genotype A by genotype B. *Int J Parasitol Parasites Wildl.* 2022;18:157-71.
200. de Miranda JR, Genersch E. Deformed wing virus. *J Invertebr Pathol.* 2010;103 Suppl 1:S48-61.

201. Gisder S, Mockel N, Eisenhardt D, Genersch E. In vivo evolution of viral virulence: switching of deformed wing virus between hosts results in virulence changes and sequence shifts. *Environ Microbiol.* 2018;20(12):4612-28.
202. Iqbal J, Mueller U. Virus infection causes specific learning deficits in honeybee foragers. *Proc Biol Sci.* 2007;274(1617):1517-21.
203. Koziy RV, Wood SC, Kozii IV, van Rensburg CJ, Moshynskyy I, Dvylyuk I, et al. Deformed wing virus infection in honey bees (*Apis mellifera* L.). *Vet Pathol.* 2019;56(4):636-41.
204. Gisder S, Genersch E. Direct evidence for infection of *Varroa destructor* mites with the bee-pathogenic deformed wing virus variant B - but not variant A - via fluorescence-in situ-hybridization analysis. *J Virol.* 2020.
205. Bowen-Walker PL, Martin SJ, Gunn A. The transmission of deformed wing virus between honeybees (*Apis mellifera* L.) by the ectoparasitic mite *Varroa jacobsoni* Oud. *J Invertebr Pathol.* 1999;73(1):101-6.
206. Tentcheva D, Gauthier L, Zappulla N, Dainat B, Cousserans F, Colin ME, et al. Prevalence and seasonal variations of six bee viruses in *Apis mellifera* L. and *Varroa destructor* mite populations in France. *Appl Environ Microbiol.* 2004;70(12):7185-91.
207. Nordström S. Distribution of deformed wing virus within honey bee (*Apis mellifera*) brood cells infested with the ectoparasitic mite *Varroa destructor*. *Experimental & Applied Acarology.* 2003;29(3):293-302.
208. López-Urbe MM. Wild bees: diversity, ecology, and stressors of non-apis bees. Dans: Kane T, Faux C, rédacteurs. Honey bee veterinary medicine for the veterinary practitioner: John Wiley & Sons Inc.; 2021. p. 81-91.
209. Ryabov EV, Wood GR, Fannon JM, Moore JD, Bull JC, Chandler D, et al. A virulent strain of deformed wing virus (DWV) of honeybees (*Apis mellifera*) prevails after *Varroa destructor*-mediated, or in vitro, transmission. *PLoS Pathog.* 2014;10(6):e1004230.
210. Tentcheva D, Gauthier L, Bagny L, Fievet J, Dainat B, Cousserans F, et al. Comparative analysis of deformed wing virus (DWV) RNA in *Apis mellifera* and *Varroa destructor*. *Apidologie.* 2006;37(1):41-50.

211. Di Prisco G, Annoscia D, Margiotta M, Ferrara R, Varricchio P, Zanni V, et al. A mutualistic symbiosis between a parasitic mite and a pathogenic virus undermines honey bee immunity and health. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(12):3203-8.
212. Shutler D, Head K, Burgher-MacLellan KL, Colwell MJ, Levitt AL, Ostiguy N, et al. Honey bee *Apis mellifera* parasites in the absence of *Nosema ceranae* fungi and *Varroa destructor* mites. *PLoS One*. 2014;9(6):e98599.
213. Yue C, Genersch E. RT-PCR analysis of deformed wing virus in honeybees (*Apis mellifera*) and mites (*Varroa destructor*). *J Gen Virol*. 2005;86(12):3419-24.
214. Gauthier L, Tentcheva D, Tournaire M, Dainat B, Cousserans F, Colin ME, et al. Viral load estimation in asymptomatic honey bee colonies using the quantitative RT-PCR technique. *Apidologie*. 2007;38(5):426-35.
215. Koch W, Ritter W. Experimental examinations concerning the problem of deformed emergin bees after infestation with *Varroa jacobsoni*. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*. 1991;38(1-10):337-44.
216. Allen M, Ball B. The incidence and world distribution of honey bee viruses. *Bee World*. 1996;77(3):141-62.
217. Vezeteu T, Aurori A, Dezmirean D, Criste A. Recent discoveries in *Varroa destructor* treatment, prevention and parasite-host interaction. *Scientific Papers, Series D Animal Science*. 2019;62(1):42-7.
218. Fievet J, Tentcheva D, Gauthier L, Miranda Jd, Cousserans F, Colin ME, et al. Localization of deformed wing virus infection in queen and drone *Apis mellifera* L. *Virology*. 2006;3(16):(28 March 2006).
219. Yue C, Schröder M, Gisder S, Genersch E. Vertical-transmission routes for deformed wing virus of honeybees (*Apis mellifera*). *J Gen Virol*. 2007;88(8):2329-36.
220. Yue C, Schröder M, Bienefeld K, Genersch E. Detection of viral sequences in semen of honeybees (*Apis mellifera*): Evidence for vertical transmission of viruses through drones. *J Invertebr Pathol*. 2006;92(2):105-8.
221. Norton AM, Remnant EJ, Buchmann G, Beekman M. Accumulation and competition amongst deformed wing virus genotypes in naive Australian honeybees provides insight into the increasing global prevalence of genotype B. *Front Microbiol*. 2020;11:620.

222. Mordecai GJ, Brettell LE, Martin SJ, Dixon D, Jones IM, Schroeder DC. Superinfection exclusion and the long-term survival of honey bees in *Varroa*-infested colonies. *ISME J.* 2016;10(5):1182-91.
223. Wilfert L, Long G, Leggett HC, Schmid-Hempel P, Butlin R, Martin SJ, et al. Deformed wing virus is a recent global epidemic in honeybees driven by *Varroa* mites. *Science.* 2016;351(6273):594-7.
224. Yañez O, Chávez-Galarza J, Tellgren-Roth C, Pinto MA, Neumann P, de Miranda JR. The honeybee (*Apis mellifera*) developmental state shapes the genetic composition of the deformed wing virus-A quasispecies during serial transmission. *Sci Rep.* 2020;10(1):5956.
225. Annoscia D, Brown SP, Di Prisco G, De Paoli E, Del Fabbro S, Frizzera D, et al. Haemolymph removal by *Varroa* mite destabilizes the dynamical interaction between immune effectors and virus in bees, as predicted by Volterra's model. *Proceedings of the Royal Society B : Biological Sciences.* 2019;286(1901):20190331.
226. Ongus JR, Peters D, Bonmatin J-M, Bengsch E, Vlak JM, van Oers MM. Complete sequence of a picorna-like virus of the genus *Iflavirus* replicating in the mite *Varroa destructor*. *J Gen Virol.* 2004;85(12):3747-55.
227. Gauthier L, Ravallec M, Tournaire M, Cousserans F, Bergoin M, Dainat B, et al. Viruses associated with ovarian degeneration in *Apis mellifera* L. queens. *PLoS One.* 2011;6(1):e16217.
228. Grindrod I, Kevill JL, Villalobos EM, Schroeder DC, Martin SJ. Ten years of deformed wing virus (DWV) in Hawaiian honey bees (*Apis mellifera*), the dominant DWV-A variant is potentially being replaced by variants with a DWV-B coding sequence. *Viruses.* 2021;13(6):969.
229. Kevill JL, Stainton KC, Schroeder DC, Martin SJ. Deformed wing virus variant shift from 2010 to 2016 in managed and feral UK honey bee colonies. *Arch Virol.* 2021;166(10):2693-702.
230. Gisder S, Aumeier P, Genersch E. Deformed wing virus: replication and viral load in mites (*Varroa destructor*). *J Gen Virol.* 2009;90(Pt 2):463-7.

231. Erban T, Harant K, Hubalek M, Vitamvas P, Kamler M, Poltronieri P, et al. In-depth proteomic analysis of *Varroa destructor*: Detection of DWV-complex, ABPV, VdMLV and honeybee proteins in the mite. *Sci Rep*. 2015;5:13907.
232. Martin SJ, Brettell LE. Deformed wing virus in honeybees and other insects. *Annu Rev Virol*. 2019;6(1):49-69.
233. Mordecai GJ, Wilfert L, Martin SJ, Jones IM, Schroeder DC. Diversity in a honey bee pathogen: first report of a third master variant of the deformed wing virus quasispecies. *ISME J*. 2016;10(5):1264-73.
234. Dall DJ. Multiplication of Kashmir bee virus in pupae of the honeybee, *Apis mellifera*. *J Invertebr Pathol*. 1987;49(3):279-90.
235. Bailey L, Milne RG. The multiplication regions and interaction of acute and chronic bee-paralysis viruses in adult honey bees. *J Gen Virol*. 1969;4(1):9-14.
236. Ball B. Association of *Varroa jacobsoni* with virus diseases of honey bees. *Exp Appl Acarol*. 1983;19:607-13.
237. Cox-Foster DL, Conlan S, Holmes EC, Palacios G, Evans JD, Moran NA, et al. A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science*. 2007;318(5848):283-7.
238. Bailey L, Carpenter JM, Woods RD. Egypt bee virus and Australian isolates of Kashmir bee virus. *J Gen Virol*. 1979;43(3):641-7.
239. Hung ACF. PCR detection of Kashmir bee virus in honey bee *excreta*. *J Apic Res*. 2000;39(3-4):103-6.
240. Lester PJ, Felden A, Baty JW, Bulgarella M, Haywood J, Mortensen AN, et al. Viral communities in the parasite *Varroa destructor* and in colonies of their honey bee host (*Apis mellifera*) in New Zealand. *Sci Rep*. 2022;12(1):8809.
241. Li Z, Chen Y, Zhang S, Chen S, Li W, Yan L, et al. Viral infection affects sucrose responsiveness and homing ability of forager honey bees, *Apis mellifera* L. *PLoS One*. 2013;8(10):e77354.
242. Scheiner R, Page RE, Erber J. Sucrose responsiveness and behavioral plasticity in honey bees (*Apis mellifera*). *Apidologie*. 2004;35(2):133-42.

243. Menzel R, Greggers U, Smith A, Berger S, Brandt R, Brunke S, et al. Honey bees navigate according to a map-like spatial memory. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(8):3040-5.
244. McMenamin AJ, Genersch E. Honey bee colony losses and associated viruses. *Curr Opin Insect Sci*. 2015;8:121-9.
245. vanEngelsdorp D, Evans JD, Saegerman C, Mullin C, Haubruge E, Nguyen BK, et al. Colony collapse disorder: a descriptive study. *PLoS One*. 2009;4(8):e6481.
246. Genersch E, Ohe Wvd, Kaatz H, Schroeder A, Otten C, Büchler R, et al. The German bee monitoring project: a long term study to understand periodically high winter losses of honey bee colonies. *Apidologie*. 2010;41(3):332-52.
247. Mookhploy W, Kimura K, Disayathanoowat T, Yoshiyama M, Hondo K, Chantawannakul P. Capsid gene divergence of black queen cell virus isolates in Thailand and Japan honey bee species. *J Econ Entomol*. 2015;108(3):1460-4.
248. Bailey L, Woods RD. Two more small RNA viruses from honey bees and further observations on sacbrood and acute bee-paralysis viruses. *J Gen Virol*. 1977;37(1):175-82.
249. Desai SD, Kumar S, Currie RW. Occurrence, detection, and quantification of economically important viruses in healthy and unhealthy honey bee (Hymenoptera: Apidae) colonies in Canada. *Can Entomol*. 2016;148(1):22-35.
250. Chen Y, Evans J, Feldlaufer M. Horizontal and vertical transmission of viruses in the honey bee, *Apis mellifera*. *J Invertebr Pathol*. 2006;92(3):152-9.
251. Retschnig G, Kellermann LA, Mehmman MM, Yañez O, Winiger P, Williams GR, et al. Black queen cell virus and drifting of honey bee workers (*Apis mellifera*). *J Apic Res*. 2019;58(5):754-5.
252. Cornman RS, Tarpy DR, Chen Y, Jeffreys L, Lopez D, Pettis JS, et al. Pathogen webs in collapsing honey bee colonies. *PLoS One*. 2012;7(8):e43562-e.
253. Retschnig G, Williams GR, Mehmman MM, Yañez O, de Miranda JR, Neumann P. Sex-specific differences in pathogen susceptibility in honey bees (*Apis mellifera*). *PLoS One*. 2014;9(1):e85261-e.
254. Raymann K, Coon KL, Shaffer Z, Salisbury S, Moran NA. Pathogenicity of *Serratia marcescens* strains in honey bees. *mBio*. 2018;9(5):e01649-18.

255. Milbrath M. Honey bee bacterial diseases. Dans: Kane T, Faux C, rédacteurs. Honey bee medicine for the veterinary practitioner: John Wiley & Sons Inc.; 2021. p. 277-93.
256. Raymann K, Moran NA. The role of the gut microbiome in health and disease of adult honey bee workers. *Curr Opin Insect Sci.* 2018;26:97-104.
257. Raymann K. Honey bee microbiota and the physiology of antimicrobial resistance. Dans: Kane T, Faux C, rédacteurs. Honey bee medicine for the veterinary practitioner: John Wiley & Sons Inc.; 2021. p. 125-34.
258. Kwong WK, Mancenido AL, Moran NA. Immune system stimulation by the native gut microbiota of honey bees. *R Soc Open Sci.* 2017;4(2):170003.
259. Emery O, Schmidt K, Engel P. Immune system stimulation by the gut symbiont *Frischella perrara* in the honey bee (*Apis mellifera*). *Mol Ecol.* 2017;26(9):2576-90.
260. Zheng H, Powell JE, Steele MI, Dietrich C, Moran NA. Honeybee gut microbiota promotes host weight gain via bacterial metabolism and hormonal signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017;114(18):4775-80.
261. Powell JE, Martinson VG, Urban-Mead K, Moran NA. Routes of acquisition of the gut microbiota of the honey bee *Apis mellifera*. *Appl Environ Microbiol.* 2014;80(23):7378-87.
262. Maes PW, Rodrigues PAP, Oliver R, Mott BM, Anderson KE. Diet-related gut bacterial dysbiosis correlates with impaired development, increased mortality and Nosema disease in the honeybee (*Apis mellifera*). *Mol Ecol.* 2016;25(21):5439-50.
263. Kešnerová L, Emery O, Troilo M, Liberti J, Erkosar B, Engel P. Gut microbiota structure differs between honeybees in winter and summer. *ISME J.* 2020;14(3):801-14.
264. Jones JC, Fruciano C, Hildebrand F, Al Toufalilia H, Balfour NJ, Bork P, et al. Gut microbiota composition is associated with environmental landscape in honey bees. *Ecol Evol.* 2018;8(1):441-51.
265. Ellegaard KM, Engel P. Genomic diversity landscape of the honey bee gut microbiota. *Nat Commun.* 2019;10(1):446.
266. Lee FJ, Rusch DB, Stewart FJ, Mattila HR, Newton IL. Saccharide breakdown and fermentation by the honey bee gut microbiome. *Environ Microbiol.* 2015;17(3):796-815.

267. Ellegaard KM, Tamarit D, Javelind E, Olofsson TC, Andersson SGE, Vásquez A. Extensive intra-phylotype diversity in lactobacilli and bifidobacteria from the honeybee gut. *BMC Genomics*. 2015;16(1):284.
268. Raymann K, Shaffer Z, Moran NA. Antibiotic exposure perturbs the gut microbiota and elevates mortality in honeybees. *PLoS Biol*. 2017;15(3):e2001861.
269. Burritt NL, Foss NJ, Neeno-Eckwall EC, Church JO, Hilger AM, Hildebrand JA, et al. Sepsis and hemocyte loss in honey bees (*Apis mellifera*) Infected with *Serratia marcescens* strain sicaria. *PLoS One*. 2016;11(12):e0167752.
270. de Miranda JR, Bailey L, Ball BV, Blanchard P, Budge GE, Chejanovsky N, et al. Standard methods for virus research in *Apis mellifera*. *J Apic Res*. 2013;52(4):1-56.
271. Cripps CJ. Veterinary regulations. Dans: Kane T, Faux C, rédacteurs. Honey bee medicine for the veterinary practitioner: John Wiley & Sons Inc.; 2021. p. 191-200.
272. Francis RM, Nielsen SL, Kryger P. *Varroa*-virus interaction in collapsing honey bee colonies. *PLoS One*. 2013;8(3):e57540.
273. Dainat B, Evans JD, Chen YP, Gauthier L, Neumann P. Dead or alive: deformed wing virus and *Varroa destructor* reduce the life span of winter honeybees. *Appl Environ Microbiol*. 2012;78(4):981-7.
274. Hartfelder K, Bitondi MMG, Brent CS, Guidugli-Lazzarini KR, Simões ZLP, Stabentheiner A, et al. Standard methods for physiology and biochemistry research in *Apis mellifera*. *J Apic Res*. 2013;52(1):1-48.
275. Buckemuller C, Siehler O, Gobel J, Zeumer R, Olschlager A, Eisenhardt D. Octopamine underlies the counter-regulatory response to a glucose deficit in honeybees (*Apis mellifera*). *Front Syst Neurosci*. 2017;11:63.
276. Tonyushkina K, Nichols JH. Glucose meters: a review of technical challenges to obtaining accurate results. *J Diabetes Sci Technol*. 2009;3(4):971-80.
277. Mondet F, de Miranda JR, Kretzschmar A, Le Conte Y, Mercer AR. 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*. 2014;10(8):e1004323.
278. Nazi F, Brown SP, Annoscia D, Del Piccolo F, Di Prisco G, Varricchio P, et al. Synergistic parasite-pathogen interactions mediated by host immunity can drive the collapse of honeybee colonies. *PLoS Pathog*. 2012;8(6):e1002735.

279. Barroso-Arévalo S, Vicente-Rubiano M, Ruiz JA, Bentabol A, Sánchez-Vizcaíno JM. Does pollen diversity influence honey bee colony health? *Span J Agric Res*. 2019;17(3).
280. Barroso-Arévalo S, Fernández-Carrión E, Goyache J, Molero F, Puerta F, Sánchez-Vizcaíno JM. High load of deformed wing virus and *Varroa destructor* infestation are related to weakness of honey bee colonies in southern Spain. *Front Microbiol*. 2019;10.
281. Brasesco C, Quintana S, Di Geronimo V, Genchi Garcia ML, Sguazza G, Bravi ME, et al. Deformed wing virus type A and B in managed honeybee colonies of Argentina. *Bull Entomol Res*. 2021;111(1):100-10.
282. Arnold JE, Camus MS, Freeman KP, Giori L, Hooijberg EH, Jeffery U, et al. ASVCP guidelines: principles of quality assurance and standards for veterinary clinical pathology (version 3.0): developed by the American Society for Veterinary Clinical Pathology's (ASVCP) Quality Assurance and Laboratory Standards (QALS) Committee. *Vet Clin Pathol*. 2019;48(4):542-618.
283. Flatland B. Quantitative diagnostic test validation. Dans: Schalm OW, Weiss DJ, Wardrop KJ, rédacteurs. *Schalm's veterinary hematology*. 6^e éd. Ames, IA: John Wiley & Sons Inc.; 2010. p. 1263-72.
284. Martin SJ. The role of *Varroa* and viral pathogens in the collapse of honeybee colonies: a modelling approach. *J Appl Ecol*. 2001;38(5):1082-93.
285. Paoli PP, Donley D, Stabler D, Saseendranath A, Nicolson SW, Simpson SJ, et al. Nutritional balance of essential amino acids and carbohydrates of the adult worker honeybee depends on age. *Amino Acids*. 2014;46(6):1449-58.
286. Pirk CWW, de Miranda JR, Kramer M, Murray TE, Nazzi F, Shutler D, et al. Statistical guidelines for *Apis mellifera* research. *J Apic Res*. 2013;52(4).
287. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72(1):248-54.
288. Harwood GP, Dolezal AG. Pesticide-virus interactions in honey bees: challenges and opportunities for understanding drivers of bee declines. *Viruses*. 2020;12(5).

289. Chauzat MP, Faucon JP, Martel AC, Lachaize J, Cougoule N, Aubert M. A survey of pesticide residues in pollen loads collected by honey bees in France. *J Econ Entomol.* 2006;99(2):253-62.
290. Di Prisco G, Cavaliere V, Annoscia D, Varricchio P, Caprio E, Nazzi F, et al. Neonicotinoid clothianidin adversely affects insect immunity and promotes replication of a viral pathogen in honey bees. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(46):18466-71.
291. Vázquez DE, Iliina N, Pagano EA, Zavala JA, Farina WM. Glyphosate affects the larval development of honey bees depending on the susceptibility of colonies. *PLoS One.* 2018;13(10):e0205074.
292. Aliouane Y, El Hassani AK, Gary V, Armengaud C, Lambin M, Gauthier M. Subchronic exposure of honeybees to sublethal doses of pesticides: effects on behavior. *Environ Toxicol Chem.* 2009;28(1):113-22.
293. Tsvetkov N, Samson-Robert O, Sood K, Patel HS, Malena DA, Gajiwala PH, et al. Chronic exposure to neonicotinoids reduces honey bee health near corn crops. *Science.* 2017;356(6345):1395-7.
294. Zhu YC, Yao J, Adamczyk J, Luttrell R. Synergistic toxicity and physiological impact of imidacloprid alone and binary mixtures with seven representative pesticides on honey bee (*Apis mellifera*). *PLoS One.* 2017;12(5):e0176837.
295. Siviter H, Koricheva J, Brown MJF, Leadbeater E. Quantifying the impact of pesticides on learning and memory in bees. *J Appl Ecol.* 2018;55(6):2812-21.
296. Wu JY, Anelli CM, Sheppard WS. Sub-lethal effects of pesticide residues in brood comb on worker honey bee (*Apis mellifera*) development and longevity. *PLoS One.* 2011;6(2):e14720.
297. Motta EVS, Raymann K, Moran NA. Glyphosate perturbs the gut microbiota of honey bees. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018;115(41):10305-10.
298. Tosi S, Nieh JC, Sgolastra F, Cabbri R, Medrzycki P. Neonicotinoid pesticides and nutritional stress synergistically reduce survival in honey bees. *Proc Biol Sci.* 2017;284(1869):20171711.
299. Bendahou N, Bounias M, Fleche C. Toxicity of cypermethrin and fenitrothion on the hemolymph carbohydrates, head acetylcholinesterase, and thoracic muscle Na⁺, K⁺-

- ATPase of emerging honeybees (*Apis mellifera mellifera*. L). *Ecotoxicol Environ Saf.* 1999;44(2):139-46.
300. Cascino P, Nectoux M, Guiraud G, Bounias M. The formamidine amitraz as a hyperglycemic alpha-agonist in worker honeybees (*Apis mellifera mellifera* L.) in vivo. *Biomed Environ Sci.* 1989;2(2):106-14.
301. Friedrichs KR, Harr KE, Freeman KP, Szladovits B, Walton RM, Barnhart KF, et al. ASVCP reference interval guidelines: determination of de novo reference intervals in veterinary species and other related topics. *Vet Clin Pathol.* 2012;41(4):441-53.
302. Harrison JF, Woods HA, Roberts SP. Techniques and applications. Dans: Harrison JF, Woods HA, Roberts SP, rédacteurs. *Ecological and environmental physiology of insects.* Oxford, UK: Oxford Academic; 2012. p. 263-82.
303. Ryazanova AD, Alekseev AA, Slepneva IA. The phenylthiourea is a competitive inhibitor of the enzymatic oxidation of DOPA by phenoloxidase. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2012;27(1):78-83.
304. Leonard SP, Powell JE, Perutka J, Geng P, Heckmann LC, Horak RD, et al. Engineered symbionts activate honey bee immunity and limit pathogens. *Science.* 2020;367(6477):573-6.
305. Desai SD, Eu YJ, Whyard S, Currie RW. Reduction in deformed wing virus infection in larval and adult honey bees (*Apis mellifera* L.) by double-stranded RNA ingestion. *Insect Mol Biol.* 2012;21(4):446-55.
306. Li AY, Cook SC, Sonenshine DE, Posada-Florez F, Noble NII, Mowery J, et al. Insights into the feeding behaviors and biomechanics of *Varroa destructor* mites on honey bee pupae using electropenetrography and histology. *J Insect Physiol.* 2019;119:103950.
307. Locke B. Natural *Varroa* mite-surviving *Apis mellifera* honeybee populations. *Apidologie.* 2016;47(3):467-82.
308. Rinderer TE, de Guzman LI, Delatte G, Stelzer J, Lancaster V, Kuznetsov V, et al. Resistance to the parasitic mite *Varroa destructor* in honey bees from far-eastern Russia. *Apidologie.* 2001;32(4):381-94.
309. Corrêa-Marques M-H, De Jong D. Uncapping of worker bee brood, a component of the hygienic behavior of Africanized honey bees against the mite *Varroa jacobsoni* Oudemans. *Apidologie.* 1998;29(3):283-9.

310. Allsopp MH. Analysis of *Varroa destructor* infestation of southern African honeybee populations. Pretoria: University of Pretoria; 2007.