

UNIVERSITÉ DE TOURS

ÉCOLE DOCTORALE : SSBCV

INSTITUT de RECHERCHE sur la BIOLOGIE de l'INSECTE

THÈSE présentée par : **Gabrielle ALMECIJA**

soutenue le : **12 octobre 2021**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Tours**

Discipline/ Spécialité : **Biologie des organismes**

Résistances de *Varroa destructor* aux acaricides : conséquences sur l'efficacité des traitements. *Application au tau-fluvalinate et à l'amitraz*

THÈSE dirigée par :

Mme SUPPO Christelle

RAPPORTEURS :

M. LE CONTE Yves

M DECOURTYE Axel

Professeure des universités, Université de Tours

Directeur de Recherche, INRAE

Directeur scientifique, ITSAP-Institut de l'abeille

JURY :

Mme SUPPO Christelle

M. LE CONTE Yves

M DECOURTYE Axel

Mme ROBINET Christelle

M. POIROT Benjamin

M. WATKINS Max

Directrice de thèse

Rapporteur

Rapporteur

Examinatrice

Co-encadrant

Invité

Professeure des universités, Université de Tours

Directeur de Recherche, INRAE

Directeur scientifique, ITSAP-Institut de l'abeille

Directrice de Recherche, INRAE, Présidente du jury

Docteur, APINOV

Docteur, VitaBeeHealth

Cette thèse a été menée dans le cadre d'un financement CIFRE de l'Agence Nationale de la Recherche et de la Technologie (ANRT). Elle s'est déroulée en partenariat entre l'Institut de Recherche sur la Biologie de l'Insecte (IRBI) et les sociétés Apinov et Vita BeeHealth.

« La fleur ne rêve pas de l'abeille. Elle fleurit et l'abeille vient à elle »

Mark Nepo

Remerciements

On dit souvent qu'une thèse doit raconter une histoire. Dans certains cas, un personnage seul peut suffire à mener une quête mais, dans le cas d'une thèse, l'histoire fait intervenir de nombreux acteurs sans lesquels la quête n'aurait pu avoir lieu.

Toute cette merveilleuse aventure n'aurait pas pu démarrer sans ma directrice de thèse, **Christelle Suppo** que la distance n'a pas empêchée d'être présente lorsque j'en avais besoin. Plus encore, elle a su canaliser avec respect toutes mes idées qui ont tendance à m'éloigner de la trame principale. Je vous remercie tout particulièrement pour votre rigueur scientifique et votre aide pour les statistiques et la rédaction.

Une quête est toujours réalisée avec des co-équipiers. Pour moi, cette équipe est la **Team APINOV** : **Benjamin Poirot**, **Myriam Laurie**, **Robin Azemar**, **Elise Poisson**, **Précillia Cochard** et **Loélia Hilaire**. Une équipe qui reste le soir pour vous aider à faire vos derniers comptages, qui vous accompagne aux ruchers faire vos relevés, qui supporte les musiques Disney (enfin pas tout le monde) en fin de saison pour se donner du courage et surtout qui vous accompagne partout pour réaliser des prélèvements. Je tiens à remercier tout particulièrement **Myriam** et **Benjamin** pour m'avoir acceptée en stage puis proposé ce travail de thèse qui m'a permis de tourner une nouvelle page. Merci à **Elise**, **Précillia** et **Robin** pour être les meilleurs coéquipiers des missions antillaises et guyanaises entre varroas, abeilles, randonnées, plages (*et rhum*). Pour finir, je rajouterai un grand merci à mon encadrant de thèse, **Benjamin** pour son esprit critique, son soutien et nos longues discussions concernant les abeilles, l'apiculture et tellement d'autres sujets qui m'ont beaucoup aidée à avancer dans mes réflexions.

Dans toute quête, les personnages reçoivent de l'aide, pour cela, je tiens à remercier toute l'équipe de VitaBeeHealth, et particulièrement **Max Watkins**, **Sebastien Owen** et **Paulo Mielgo**, qui ont accepté de soutenir cette quête en étant présent concernant les questions techniques sur les traitements. Merci de m'avoir incitée à communiquer en anglais et de m'avoir soutenue malgré mon français...

De nombreux rebondissements peuvent modifier l'histoire, il faut sans cesse savoir s'adapter et conserver sa créativité : **Roman Catherin** et **Alexandra Regneault** sont arrivés et leur efficacité m'a permis d'aller plus loin que ce que j'espérais. Nous avons passé de super moments à collecter les varroas dans le couvain en apnée ! Quelle super équipe d'opérateurs, un grand merci pour toutes ces discussions et votre incroyable enthousiasme.

Pour que la quête suive son cours, j'ai dû faire appel à de nombreux collaborateurs sans lesquels rien n'aurait pu être possible : **ADA**, **FNOSAD**, **chercheurs**, **vétérinaires** et **apiculteurs**. En effet, la collecte

des varroas a demandé de nombreux bras. Je remercie donc tous les membres des ADA qui ont participé aux collectes des couvains d'abeilles, à la recherche des colonies infestées : **Marie Ventelon, Jean Marie Cecilio, Alban Maisonnasse, Léa Frontero** et un merci tout particulier à **Théo Pouderoux** sans qui je n'aurais pas lancé toutes ces collaborations. Je remercie tout particulièrement l'accès aux populations de varroas sensibles : **Jean-Daniel Charrière** pour les varroas suisses, à **Olivier Esnault** pour les varroas réunionnais, à **Jakob Wegener** pour les varroas allemands et à **Bruno Gaucher** pour les varroas guyanais. Je remercie également **Jérôme Vandame** et **Florentine Giraud** de la FNOSAD pour m'avoir indiqué le nom d'apiculteurs à contacter. De nombreux vétérinaires ont également participé aux collectes de ces varroas, je vous remercie pour toutes les discussions passées concernant l'interprétation des résultats : **Philippe Noireterre, Caroline Lantejoul, Olivier Hartnagel, Mannaïg de Kersauson, Pascal Gilles, Bénédicte Faure, et Franck Pizette**. Je ne pourrai malheureusement pas citer le nom de tous les apiculteurs qui ont participé à ce projet mais je les remercie tous pour leur implication, leurs questions, et les réflexions échangées avec chacun d'eux, que ce soit lors de rencontres, de conférences, ou d'échanges par mail.

Les varroas utilisés pour écrire notre histoire serviront, je l'espère, à en écrire de nombreuses autres. Je remercie les chercheurs qui ont inclu ces varroas dans leurs projets de recherches comme **Maeva Techer** (Japon) qui a travaillé sur l'origine de ces varroas, **Joel Gonzalez, Sara Hernandez-Rodriguez** (Valence, Espagne) et **Véronique Duquesne** (ANSES France) qui travaillent sur l'origine génétique des résistances à l'amitraz et au tau-fluvalinate.

Pour finir, je souhaite remercier des personnages clés qui sont à l'origine de toute cette aventure : les apiculteurs **Alain Arnéodo et Jean-Philippe Mandard** qui m'ont fait découvrir ce métier passion dans des conditions merveilleuses. La miellerie Mandard restera toujours un petit coin de paradis pour moi.

Enfin, pour qu'une histoire soit complète, le personnage a besoin d'un contexte réconfortant pour se lancer dans l'aventure et la terminer. Ces derniers remerciements, je les offre donc à **mes parents**, qui ont fait un véritable travail d'équipe pour la relecture de cette longue histoire, et à **mon conjoint** pour m'avoir accompagné durant toute cette épopée.

Publications & Communications

Publications

Ce travail de thèse a conduit à la publication de deux articles et d'un article en soumission intégrés dans le manuscrit :

- ✓ “Inventory of *Varroa destructor* susceptibility to amitraz and tau-fluvalinate in France” publié dans le journal *Experimental and Applied Acarology* en 2020
- ✓ “Modelling the impact of Apivar treatment on a *Varroa* mite population and the influence of resistance” publié dans le journal *Pest Management Science* en 2021
- ✓ “Influence of amitraz-based products characteristic to control varroa mite population” soumit dans *Medical and Veterinary Entomology*

La collaboration avec l'équipe BiotechMED de Valence (Espagne) a conduit à la soumission d'un article non présenté dans le manuscrit de thèse :

- “Resistance to amitraz in the parasitic honeybee mite *Varroa destructor* is associated with mutations in the β -adrenergic-like octopamine receptor” soumit dans *Journal Pest Science*

Communications

Année 2019 :

- Conférence aux Journées Vétérinaires Apicoles (JVA)
- Poster présenté au salon Apimondia à Montréal
- Présentation orale du travail de recherche à l'ANSES
- Conférence au bilan annuel de l'ADA AURA (Région Auvergne-Rhône-Alpes)
- Conférence lors de la rencontre annuelle de la Fédération Française des Apiculteurs Professionnels (FFAP)
- Conférence pour le GDSA56
- Conférence lors du Salon International de matériel apicole (SIMAPI)

Année 2020 :

- Conférence au congrès National Honey Show (London)
- Conférence lors du rassemblement de l'Abeille Vendéenne
- Conférence au bilan annuel de l'ADAGE (Région Grand -Est)
- Conférence à la journée de Groupement Technique Vétérinaire (Auvergne)
- Conférence lors de l'Assemblée Générale du Syndicat National d'Apiculture (SNA)
- Conférence en distancielle lors d'un Webinar en partenariat avec Beep2Beep

Année 2021 :

- Conférence en distancielle pour l'ADA Occitanie
- Conférence en distancielle organisée par la FNOSAD

SOMMAIRE

AVANT-PROPOS	1
INTRODUCTION : ABEILLES, VARROA & RESISTANCES	4
1. L'ABEILLE ENTRE CULTURE, ECOLOGIE ET ECONOMIE	5
1.1. UNE ABEILLE POUR L'APICULTURE	5
1.2. ORIGINE DE L'ABEILLE MELLIFERE	6
1.3. IMPORTANCE DES ABEILLES : LIEN ENTRE ECOLOGIE ET ECONOMIE	7
2. ORGANISATION DE LA COLONIE D'ABEILLES MELLIFERES	8
2.1. LES DIFFERENTES CASTES	8
2.2. CYCLE DE DEVELOPPEMENT	10
3. LES ABEILLES MENACEES PAR LES ACTIVITES ANTHROPIQUES	11
3.1. LES DIFFERENTES MENACES ANTHROPIQUES	11
3.2. MENACES SPECIFIQUES A <i>APIS MELLIFERA</i> ET A L'APICULTURE	13
4. VARROA DESTRUCTOR, UN FLEAU POUR L'ABEILLE MELLIFERE	14
4.1. ORIGINE DU VARROA	14
4.2. MORPHOLOGIE ET COMPORTEMENT DE NUTRITION	15
4.3. CYCLE DE DEVELOPPEMENT	16
4.4. DISTRIBUTION DANS LA COLONIE ET DISPERSION	20
4.5. DYNAMIQUE DE POPULATION DE <i>VARROA DESTRUCTOR</i>	22
5. INFLUENCE DE VARROA DESTRUCTOR SUR L'ABEILLE MELLIFERE : VARROOSE	23
5.1. VARROA, VECTEUR ET REPLICATEUR DE VIRUS	23
5.2. CONSEQUENCE A L'ECHELLE INDIVIDUELLE	24
5.3. CONSEQUENCES A L'ECHELLE DE LA COLONIE	24
6. GESTION DU VARROA	25
6.1. EVALUATION DU TAUX D'INFESTATION	25
6.2. LES METHODES DE CONTROLE	27
6.3. MODE D'ACTION DES SUBSTANCES ACARICIDES	32
7. EFFICACITE DES ACARICIDES	34
7.1. EVALUATION DE L'EFFICACITE	34
7.2. VARIABILITE ET LIMITES DE L'EVALUATION DE L'EFFICACITE	36
8. LA RESISTANCE AUX ACARICIDES	37
8.1. GENERALITES SUR LES RESISTANCES	37

8.2. LES RESISTANCES DE <i>VARROA DESTRUCTOR</i> AUX ACARICIDES	43
QUESTIONS ET OBJECTIFS DE LA THESE	49
PARTIE 1 : RESISTANCES DE <i>VARROA DESTRUCTOR</i> AU TAU-FLUVALINATE ET A L'AMITRAZE	52
CHAPITRE 1 : DIAGNOSTIQUER LES RESISTANCES, UN OUTIL DANS LA GESTION DES RESISTANCES DE <i>VARROA DESTRUCTOR</i>	53
1. INTRODUCTION : LA LUTTE CONTRE LES RESISTANCES, UN ENJEU AGRICOLE	53
1.1. LES METHODES POUR DIAGNOSTIQUER UNE RESISTANCE	54
1.2. LE CAS DE LA DETECTION DE LA RESISTANCE CHEZ LE MOUSTIQUE PAR L'ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE (OMS)	57
1.3. DETECTION DES RESISTANCES CHEZ <i>V. DESTRUCTOR</i>	59
2. EVALUATION DE LA SENSIBILITE DES VARROAS AUX ACARICIDES PAR UN TEST PHENOTYPIQUE	60
2.1. CHOIX DE LA METHODE DE COLLECTE	60
2.2. DETERMINER LA CONCENTRATION DISCRIMINANTE	61
2.3. VALIDATION DE LA METHODE	64
2.4. DEFINIR LES CLASSES DE SENSIBILITES ET LES RATIOS DE RESISTANCE	66
2.5. RATIO DE RESISTANCE	67
2.6. TEST A L'AVEUGLE	68
3. RESULTATS	68
3.1. CHOIX DE LA METHODE DE COLLECTE	68
3.2. EVALUATION DE LA CONCENTRATION DISCRIMINANTE	68
3.3. VALIDATION DE LA METHODE : REPETABILITE & REPRODUCTIBILITE	70
3.4. CLASSES DE SENSIBILITE ET RATIO DE RESISTANCE	73
3.5. LES RATIOS DE RESISTANCES	74
4. DISCUSSION	75
4.1. VALIDATION ET LIMITES DE LA METHODE	76
4.2. POPULATIONS SENSIBLES ET RESISTANTES	77
4.3. APPLICATION DE LA METHODE	78
CHAPITRE 2 : INVENTAIRE DES SENSIBILITES DES VARROAS A L'AMITRAZE ET AU TAU-FLUVALINATE EN FRANCE	82

1. INVENTORY OF <i>VARROA DESTRUCTOR</i> SUSCEPTIBILITY TO AMITRAZ AND TAU-FLUVALINATE IN FRANCE	83
2. COMPLEMENTS D'INFORMATIONS SUR LES STRATEGIES DE LUTTE	98
2.1. INFLUENCE DE L'UTILISATION D'AMITRAZE ET DU TAU-FLUVALINATE SUR LA SENSIBILITE DES VARROAS	98
2.2. TRAITEMENTS AVEC AUTORISATION DE MISE SUR LE MARCHE (AMM) ET HORS AMM	100
2.3. AUTRES FACTEURS LIES A LA SENSIBILITE DES VARROAS	100
<u>PARTIE 2 : MODELISATION DE L'EFFICACITE DES TRAITEMENTS ACARICIDES SUR VARROA</u>	<u>108</u>
<u>CHAPITRE 3 : MODELISATION DE L'ACTION DU TRAITEMENT APIVAR® SUR UNE POPULATION DE VARROAS ET INFLUENCE D'UNE RESISTANCE A L'AMITRAZE</u>	<u>109</u>
<u>CHAPITRE 4 : INFLUENCE DES CARACTERISTIQUES DE TRAITEMENTS A BASE D'AMITRAZE SUR L'EFFICACITE</u>	<u>135</u>
<u>DISCUSSION GENERALE</u>	<u>153</u>
1. INSECT RESISTANCE MANAGEMENT (IRM) ET INTEGRATED PEST MANAGEMENT (IPM)	154
2. LA GESTION DES RESISTANCES CHEZ VARROA DESTRUCTOR, VARROA RESISTANCE MANAGEMENT (VRM)	156
2.1. LE TEST DE SENSIBILITE PHENOTYPIQUE : UN OUTIL POUR LA VRM	156
3. LES PERSPECTIVES D'EVOLUTION POUR LA VRM	159
3.1. PERSPECTIVES POUR LES LABORATOIRES PHARMACEUTIQUES	160
3.2. PERSPECTIVES POUR LES APICULTEURS : MISE EN PLACE DE STRATEGIES	162
4. STRATEGIE D'AVENIR DANS LA GESTION DU VARROA	165
4.1. LES NOUVELLES CONTRAINTES IMPLIQUEES DANS LA LUTTE CONTRE LE VARROA	166
4.2. QUELLE STRATEGIE D'AVENIR DANS LA LUTTE CONTRE VARROA ?	167
<u>REFERENCES</u>	<u>171</u>

LISTES DES FIGURES (HORS ARTICLE)

FIGURE 1: DIVERSITE MORPHOLOGIQUE DANS LA SUPERFAMILLE DES APOIDES.	5
FIGURE 2: GRAVURE DE CHASSEURS DE MIEL	6
FIGURE 3: RELATION GENETIQUE ENTRE LES ECOTYPES D' <i>APIS MELLIFERA</i>	7
FIGURE 4 : BENEFICES ECONOMIQUES AGRICOLES GRACE A LA PRESENCE DE POLLINISATEURS	8
FIGURE 5 : CYCLE DE DEVELOPPEMENT	11
FIGURE 6: FACTEURS REPRESENTANTS UNE MENACE POUR LES ABEILLES	12
FIGURE 7: COMPARAISON MORPHOLOGIQUE ENTRE <i>VARROA DESTRUCTOR</i> ET <i>VARROA. JACOBSONI</i>	14
FIGURE 8 : ORIGINE ET DISPERSION DES DIFFERENTS SOUS-TYPES DE <i>V. DESTRUCTOR</i>	15
FIGURE 9: DEVELOPPEMENT DE L'ŒUF A L'IMAGO CHEZ LE VARROA.....	16
FIGURE 10 : PROBABILITE DE PRESENCE DE <i>V. DESTRUCTOR</i> SUR <i>APIS MELLIFERA</i>	16
FIGURE 11 : FEMELLE <i>V. DESTRUCTOR</i> SUR LE THORAX D'UNE JEUNE ABEILLE	17
FIGURE 12: VARROA FEMELLE FONDATRICE AVEC SA DESCENDANCE (PROTONYMPHES) DANS UNE CELLULE	18
FIGURE 13: SCHEMA DES DIFFERENTES ETAPES LORS DE LA PHASE DE REPRODUCTION.	19
FIGURE 14: MULTIINFESTATION DES NYMPHES	20
FIGURE 15: DISTRIBUTION DES VARROAS ENTRE LE COUVAIN ET LES ABEILLES AU COURS DE L'ANNEE.....	21
FIGURE 16: DYNAMIQUE DE POPULATION D'ABEILLES ET DE VARROAS SIMPLIFIEE.....	22
FIGURE 17: ABEILLES NAISSANTES, L'UNE SAINES ET L'AUTRE PORTEUSE DU DWV	23
FIGURE 18: PREPARATION ET GRAISSAGE DU LANGE.....	26
FIGURE 19: VARROAS MORTS SUR LE LANGE.....	26
FIGURE 20: DESOPERCUATION DES CELLULES.	26
FIGURE 21: CADRE A MALES UTILISE POUR LA METHODE DU RETRAIT DE COUVAIN DE MALES.....	30
FIGURE 22: TOLERANCE DES ABEILLES ET DES VARROAS AUX VARIATIONS DE TEMPERATURE UTILISEES DANS LE CONTROLE THERMIQUE	30
FIGURE 23: SCHEMA DES COMPORTEMENTS DE RESISTANCE ET TOLERANCE DES ABEILLES AUX VARROAS	32
FIGURE 24: PROTOCOLE SUIVI SUR LE TERRAIN POUR EVALUER L'EFFICACITE D'UN TRAITEMENT	35
FIGURE 25: REPRESENTATION DU NOMBRE CUMULE D'ESPECES DEVELOPPANT DES RESISTANCES ET LE NOMBRE CUMULE D'INSECTICIDES AUXQUELS DES RESISTANCES ONT ETE ETABLIS.	37
FIGURE 26 : DISTRIBUTION NATURELLE DES INDIVIDUS SENSIBLES ET RESISTANTS DANS UNE POPULATION	38
FIGURE 27 : DESCRIPTION DES DIFFERENTS MECANISMES DE RESISTANCE NON-COMPORTEMENTALE.	41
FIGURE 28 : CARTOGRAPHIE DES POPULATIONS DE <i>VARROA DESTRUCTOR</i> RESISTANTES AU TAU-FLUVALINATE EN 1998.....	44
FIGURE 29: CARTOGRAPHIE DES PHENOTYPES SENSIBLES OU RESISTANTS AU TAU-FLUVALINATE EN 2017 AVEC L'UTILISATION DE TESTS MOLECULAIRES.....	45
FIGURE 30: REPRESENTATION DE LA CINETIQUE DE CHUTE DES VARROAS (EN POURCENTAGE) AU COURS DU TRAITEMENT APITRAZ. EVOLUTION DE 2016 A 2019.....	47
FIGURE 31: RELATION ENTRE LE RATIO DE RESISTANCE A L'AMITRAZE (RR) ET L'EFFICACITE DU TRAITEMENT REALISEE AVEC LE TEST DE PETTIS.....	47
FIGURE 32: COURBE DE RELATION DOSE-REPONSE UTILISEE EN ECOTOXICOLOGIE.....	55

FIGURE 33: COMPARAISON DE LA CL50 D'UNE POPULATION SENSIBLE ET D'UNE POPULATION TESTEE PERMETTANT D'ETABLIR UN RATIO DE RESISTANCE ENTRE LES DEUX POPULATIONS.....	55
FIGURE 34: SYNTHÈSE DU PROTOCOLE SUIVI PAR L'OMS DANS LA LUTTE CONTRE LE MOUSTIQUE.	58
FIGURE 35: REPRÉSENTATION DES VALEURS MESURÉES PAR RAPPORT À LA VALEUR RÉELLE THÉORIQUE	64
FIGURE 36: COURBE DOSE-REPONSE DES VARROAS À L'AMITRAZE. L'AXE DES ABSCISSES CORRESPOND AUX LOG (CONCENTRATIONS)	69
FIGURE 37: COURBE DOSE-REPONSE DES VARROAS EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN TAU-FLUVALINATE.	69
FIGURE 38: CONCENTRATION LÉTALE À 50%, CL50 (µG/ML) DÉFINIE À PARTIE D'UNE COURBE DOSE-REPONSE COMPLÈTE.	75
FIGURE 39: ÉTAPES À SUIVRE LORS DE LA MISE EN PLACE D'UN DIAGNOSTIC DE RÉSISTANCE DE <i>VARROA DESTRUCTOR</i> AUX ACARICIDES	80
FIGURE 40: LOCALISATION DES POPULATIONS DE VARROAS ET DE LEUR MORTALITÉ À LA CL90 À L'AMITRAZE (A) ET AU TAU- FLUVALINATE (B) (MISE À JOUR EN 2020)..	98
FIGURE 41: REPRÉSENTATION DES SENSIBILITÉS AU TAU-FLUVALINATE ET À L'AMITRAZE (CL90) DES POPULATIONS DE VARROAS PRÉLEVÉES CHEZ DES APICULTEURS PRATIQUANT L'APICULTURE BIOLOGIQUE ET CONVENTIONNELLE.....	99
FIGURE 42: MORTALITÉ DES VARROAS À L'AMITRAZE (CL90) ENTRE DES POPULATIONS PROVENANT D'APICULTEUR TRAITANT EN CONVENTIONNELLE AVEC DES TRAITEMENTS AVEC AUTORISATION DE MISE SUR LE MARCHÉ (AMM) ET HORS AMM.....	100
FIGURE 43: MORTALITÉ DE PLUSIEURS POPULATIONS DE VARROAS À LA CL90 (AMITRAZE ET TAU-FLUVALINATE) SUR DES POPULATIONS OU LA LUTTE ALTERNÉE ENTRE APIVAR® ET APISTAN® A ÉTÉ MISE EN PLACE OU NON PAR L'APICULTEUR.....	102
FIGURE 44 : SCHEMATISATION DE LA RELATION ENTRE L'IPM ET L'IRM ET LEURS OBJECTIFS..	156
FIGURE 45: SCHEMA DE L'UTILISATION D'UN TEST DE SENSIBILITÉ PHÉNOTYPIQUE EN POST-TRAITEMENT.....	158
FIGURE 46: SCHEMA D'AIDE À LA DÉCISION DU TRAITEMENT EN FONCTION DU RÉSULTAT DE TEST DE SENSIBILITÉ À L'AMITRAZE..	159
FIGURE 47: FACTEURS INFLUENÇANT LA GESTION DES RÉSISTANCES CHEZ VARROA (VRM) ET PERSPECTIVES DE RECHERCHE POUR LES LABORATOIRES PHARMACEUTIQUES ET LES APICULTEURS..	165
FIGURE 48: FACTEURS INFLUENÇANT L'IMMUNITÉ DES ABEILLES : LA RÉSISTANCE AUX ACARICIDES, LE CLIMAT, LA QUANTITÉ ET LA QUALITÉ DES RESSOURCES ALIMENTAIRES DES ABEILLES ET LA PRÉSENCE DE XÉNOBIOTIQUES DANS L'ENVIRONNEMENT.....	167
FIGURE 49: SCHEMA INTEGRANT L'ENSEMBLE DES PARAMÈTRES IMPLIQUÉS DANS LA GESTION DU VARROA PAR L'APICULTEUR.....	168

Liste des tableaux (Hors article)

TABEAU 1: CHIFFRES CLES DE TAUX D'INFESTATION A NE PAS DEPASSER	27
TABEAU 2 : PRESENTATION DES DIFFERENTS PRODUITS AUTORISES EN FRANCE EN APICULTURE BIOLOGIQUE. LA POSOLOGIE DES DIFFERENTS PRODUITS Y EST EGALEMENT DECRITE.	28
TABEAU 3: PRESENTATION DES PRODUITS AUTORISES EN APICULTURE CONVENTIONNELLE EN FRANCE	29
TABEAU 4: LISTE NON-EXHAUSTIVE DES DIFFERENTS FACTEURS IMPLIQUES DANS LE DEVELOPPEMENT DE RESISTANCES AUX PESTICIDES D'APRES LA FAO ET DU RESEAU DE REFLEXION ET DE RECHERCHES SUR LES RESISTANCES AUX PESTICIDES.....	42
TABEAU 5: DESCRIPTION ET COMPARAISON DES DIFFERENTS TESTS D'EVALUATION DE RESISTANCE, LEURS CONTRAINTES ET LIMITES	56
TABEAU 6: DESCRIPTION DES DIFFERENTES ETAPES DU TEST DE SENSIBILITE PHENOTYPIQUE	63
TABEAU 7: DESCRIPTION DES DIFFERENTS TESTS DE REPETABILITE ET REPRODUCTIBILITE REALISES SUR UN MEME RUCHER..	65
TABEAU 8: CLASSES DE SENSIBILITE DEFINIES EN 1998 POUR LE TAU-FLUVALINATE	67
TABEAU 9 : INFLUENCE DE LA METHODE DE COLLECTE DES VARROAS SUR LA MORTALITE SUR 24H	68
TABEAU 10: PARAMETRES DU MODELE (GLM) POUR LA COURBE DOSE-REPONSE POUR L'AMITRAZE ET LE TAU-FLUVALINATE.....	69
TABEAU 11 : DETERMINATION DES CL90 POUR L'AMITRAZE ET LE TAU-FLUVALINATE	70
TABEAU 12: REPETABILITE DU TEST DE SENSIBILITE PHENOTYPIQUE A LA CL90 (AMITRAZE) SUR UNE MEME RUCHE AVEC 6 ESSAIS ..	70
TABEAU 13: MORTALITE DES VARROAS A LA CL90 EN TEST INTER-OPERATEURS	71
TABEAU 14: REPRODUCTIBILITE INTER-CADRE SUR 3 RUCHES DIFFERENTES DU MEME RUCHER	72
TABEAU 15: REPRODUCTIBILITE INTRA-CADRE. COLLECTE DES VARROAS SUR DEUX FACES D'UN MEME CADRE. L'ESSAI A ETE REPETE SUR DEUX RUCHES.	72
TABEAU 16: REPRODUCTIBILITE INTRA-RUCHERS.....	73
TABEAU 17: CLASSE DE SENSIBILITE DEFINIES POUR L'AMITRAZE ET LE TAU-FLUVALINATE EN 2019 ET CLASSIFICATION DES POPULATIONS ECHANTILLONNEES EN FRANCE.	74
TABEAU 18 : MODELISATION DES COURBES DOSE-REPONSE DE POPULATIONS MODEREMENT RESISTANTES	74
TABEAU 19: DESCRIPTION DES CONCENTRATIONS D'AMITRAZE POUR TUER 50% (CL50) ET 90% DE LA POPULATION (CL90).....	75
TABEAU 20: DESCRIPTION DES DIFFERENTES STRATEGIES DE LUTTE UTILISEES EN AGRICULTURE DANS LA GESTION DES RESISTANCES DES INSECTES/ACARIENS.	155

Avant-propos

L'abeille à miel ou abeille mellifère (*Apis mellifera*) a plus de 7 000 ans de relation avec notre espèce. En plus de produire du miel, elle assure un service de pollinisation indispensable pour notre agriculture. Néanmoins, depuis quelques années, elle subit de nombreuses pressions anthropiques réduisant son immunité et la longévité des colonies. Le travail de l'apiculteur se complexifie et il doit également faire face à un nouveau pathogène tel que *Varroa destructor* (Anderson & Trueman, 2000). Le varroa est un acarien ectoparasite naturel de l'abeille *Apis cerana*, localisée en Asie. Dans les années 70, il a infesté les colonies d'abeilles mellifères. Chez *Apis mellifera*, il est responsable de la varroose qui peut conduire à l'effondrement de la colonie en l'absence de traitement. En moins d'un siècle, il s'est répandu sur la quasi-totalité de la planète. Seules quelques régions sont encore épargnées par sa présence. Pour lutter contre le varroa, plusieurs substances acaricides sont autorisées en apiculture comme le tau-fluvalinate et l'amitraz. Mais après quelques années d'utilisation, Varroa a su développer des résistances au tau-fluvalinate réduisant ainsi l'efficacité des traitements. L'utilisation de l'amitraz est aujourd'hui très courante. Pourtant plusieurs études en laboratoire ont mis en évidence des baisses de sensibilité du varroa à l'amitraz.

Ma thèse débute dans ce contexte où les apiculteurs font face à une observation de la réduction de l'efficacité des traitements sans pour autant en connaître la cause. Nous commencerons par une introduction qui décrit l'état des connaissances actuel concernant la gestion du varroa et le développement de résistances aux acaricides. Le travail réalisé au cours de cette thèse se résume en deux objectifs principaux :

- 1) Evaluer la présence de résistances au tau-fluvalinate et à l'amitraz dans les populations de varroas françaises.
- 2) Etablir la relation entre la sensibilité/résistance des varroas et l'efficacité des traitements.

Chaque objectif sera présenté dans une partie constituée de deux chapitres.

La partie 1, chapitre 1 décrira la méthode choisie pour réaliser les tests de sensibilité ainsi que tous les éléments nécessaires à la bonne interprétation des résultats obtenus en laboratoire. Le chapitre 2, présenté sous forme d'article accepté, met en application la méthode et décrit la sensibilité/résistance des varroas en France issus de plusieurs populations.

Dans la partie 2, le chapitre 3 réutilisera un modèle de dynamique de population de varroas pour comprendre l'action du traitement Apivar® sur une population de varroa (article en révision, *Pest Management Science*). Dans ce chapitre, les différents paramètres impliqués dans l'efficacité du

traitement seront analysés. Enfin, le chapitre 4 réutilisera le modèle décrit dans le chapitre 3 pour déterminer l'action sur la population de varroas que peuvent présenter différents traitements à la même substance active mais aux caractéristiques pharmacologiques différentes. Ce chapitre sera présenté sous forme d'article en attente de soumission.

La dernière partie de la thèse présente une discussion générale des résultats obtenus lors de ce travail de recherche et leurs implications dans la gestion de varroa pour les apiculteurs. Nous discuterons des différentes stratégies disponibles pour les apiculteurs dans la gestion de la varroose ainsi que des perspectives pour la mise en place de nouveaux traitements par les laboratoires pharmaceutiques.

« Abeille : petit insecte capable de fabriquer du ciel »

Pierre Elie Ferrier

Introduction : Abeilles, Varroa & Résistances

1. L'abeille entre culture, écologie et économie

1.1. Une abeille pour l'apiculture

L'abeille est l'un des insectes les plus populaires de notre monde moderne. C'est principalement pour ses services de pollinisation qu'elle est connue du grand public. Par la pollinisation, elle assure la fécondation des plantes à fleurs et permet la formation de fruits. Ce processus présente à la fois un enjeu économique en agriculture mais également un enjeu écologique pour le maintien des écosystèmes (Potts et al., 2016). Le terme « abeille » englobe 20 000 espèces dans le monde (groupe monophylétique de la superfamille des Apoïdés) (Rollin, 2018; Vereecken, 2017). Toutes les espèces d'abeilles ont la caractéristique d'avoir une alimentation exclusivement à base de nectar et de pollen pour tous les stades de développement : de larve à imago (Vereecken, 2017). Elles sont présentes sur tous les continents excepté l'Antarctique. Toutes ces espèces participent au processus de pollinisation que ce soit en milieu naturel ou agricole. En France, environ 900 espèces d'abeilles sont natives. Certaines de ces espèces sont ubiquistes, d'autres au contraire sont inféodées à des milieux ou des espèces florales, elles sont spécialistes. Chaque espèce présente des différences morphologiques, sociales et de comportements de nidification (Vereecken, 2017). La plupart sont des espèces solitaires ou semi-sociales. On les nomme communément les abeilles sauvages solitaires (Figure 1) dont le niveau social est moins élevé que chez les abeilles eusociales : genre *Apis* spp et tribu des Meliponini (abeilles tropicales sans dard) (Woodard et al., 2011). Les abeilles eusociales forment une colonie constituée d'individus fertiles et non fertiles. Les abeilles eusociales ont la particularité de pouvoir hiverner. C'est-à-dire que la colonie constitue des réserves de nourriture pour passer l'hiver. C'est pour cette raison que l'abeille mellifère est l'un des insectes les plus populaires de notre monde moderne, elle produit du **miel**. Notre abeille à miel d'Europe est appelée abeille mellifère (*Apis mellifera*).



Figure 1: Diversité morphologique dans la superfamille des Apoïdés. De gauche à droite : *Eucera* sp, *Bombus* sp, *Andrena* sp, *Stelis* sp et *Apis mellifera*.

Comme pour toutes les espèces d'abeilles, on reconnaît son importance écologique à travers son service rendu par la pollinisation mais les relations entre *Apis mellifera* et *Homo sapiens* sont bien plus anciennes (Crane, 1999). En effet, au cours de son évolution, *Homo sapiens* a développé une relation

étroite avec ces abeilles à miel qui lui prodiguaient à la fois nourriture et médicaments (Ransome, 2004). Les plus anciennes représentations datent de la Préhistoire où les premiers Hommes étaient des chasseurs de miel (Figure 2) (Cardinal and Danforth, 2011; Engel, 1999). La chasse au miel s'est peu à peu transformée en apiculture dont les premières traces remontent à la période égyptienne (7000 ans) (Bloch et al., 2010; Crane, 1992).

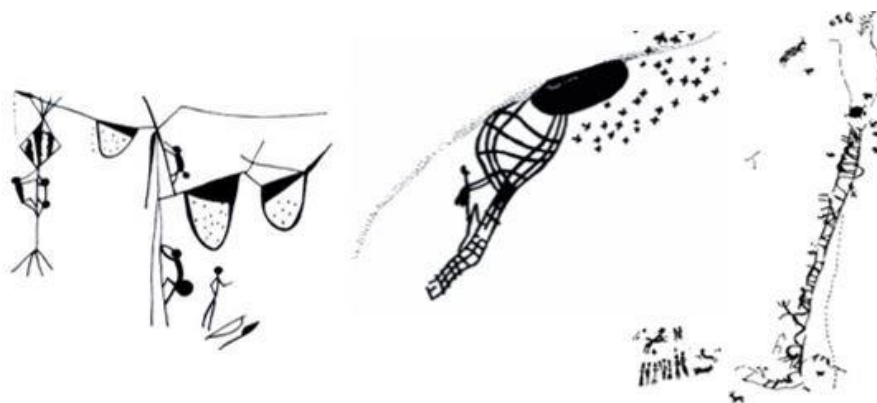


Figure 2: Gravure de chasseurs de miel (Cardinal & Danforth, 2011)

L'abeille apparaît dans de nombreux mythes et notamment dans la mythologie grecque (Tavoillot and Tavoillot, 2015) où elle peut même prendre des formes divines. Bien que quelques espèces d'abeilles du genre *Apis* spp produisent du miel, l'évolution vers l'apiculture moderne s'est développée en majorité avec *Apis mellifera* (Cardinal and Danforth, 2011; Crane, 1992, 2013). Les abeilles ont alors été échangées et sélectionnées pour améliorer la production de miel mais aussi les qualités de travail de l'apiculteur : douceur, limitation des fausses constructions, essaimages... Aujourd'hui l'abeille la plus répandue est l'abeille mellifère (Oldroyd, 2012).

1.2. Origine de l'abeille mellifère

Apis mellifera fait partie de la tribu des Apini qui regroupent l'ensemble des abeilles du genre *Apis* spp., abeilles eusociales, produisant du miel (Nel et al., 1999). L'ancêtre le plus ancien d'*Apis mellifera*, dont l'holotype est *Apis henshawi*, serait apparu à la fin de l'Eocène-début de l'Oligocène (Engel, 1998). *Apis mellifera* se serait répandue en Afrique puis aurait colonisé l'ensemble de l'Europe et une partie de l'Asie. Alors qu'actuellement, la plupart de ses cousines ont disparu, la survie de l'abeille mellifère témoigne de sa grande capacité d'adaptation. D'ailleurs, différents écotypes d'abeilles sont présents dans le monde, chacun caractérisé par une signature génétique à l'adaptation locale (Wallberg et al., 2014). On dénote 29 sous-espèces du genre *Apis mellifera* réparties en Europe, Afrique et Eurasie (Abrol et al., 2016) (Figure 3). Ces différents écotypes d'abeilles ont été hybridés soit involontairement

par des déplacements de colonies soit volontairement pour sélectionner des critères intéressants pour l'apiculture (Adam, 1980).

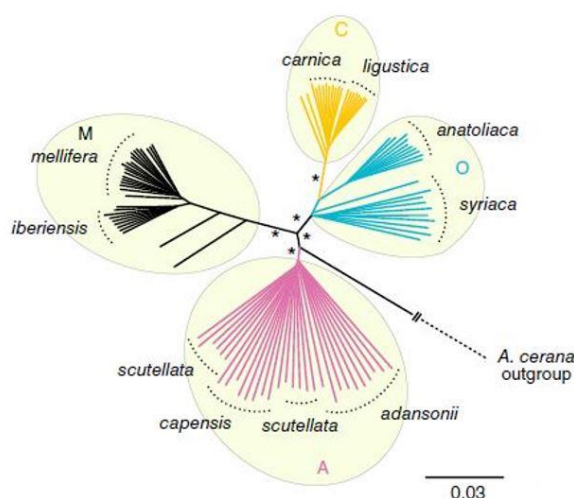


Figure 3: Relation génétique entre les écotypes d'*Apis mellifera* (Wallberg et al, 2014)

1.3. Importance des abeilles : lien entre écologie et économie

L'abeille mellifère est connue pour ses services de pollinisation. Elle présente une valeur économique totale probablement élevée mais délicate à évaluer. Seule la valeur marchande est actuellement quantifiée. En effet, la valeur marchande des abeilles correspond à la production de miel ou la production des cultures (liées à la pollinisation) (Decourtye, 2018). Celle-ci est estimée à plusieurs milliards de dollars en fonction des différents pays (Potts et al., 2016) (Figure 4). Aux USA, la valeur économique de la pollinisation des cultures a été évaluée à 14,6 milliards de dollars en 2000 (Morse and Calderone, 2000) (Figure 4). Actuellement, le service écosystémique rendu par la pollinisation par les abeilles aurait une valeur allant de 153 milliards de dollars (Gallai et al., 2009) à plus de 500 milliards de dollars par an dans le monde (IPBS, 2016). Il a été estimé que 35% de la production agricole globale dépend de la pollinisation par les insectes (Klein et al., 2007). En plus de cet aspect économique direct, l'abeille à miel présente une valeur économique difficilement quantifiable, notamment, une valeur non marchande et de non-usage (Decourtye, 2018). Dans ces valeurs, on retrouve l'aspect socio-culturel et écologique lié à la pollinisation des zones naturelles. On estime que 90% des espèces à fleurs dépendent de la pollinisation par des insectes (Potts et al., 2016). L'abeille mellifère joue donc un rôle écologique, culturel et économique. L'évaluation du déclin des abeilles serait estimé entre 176.2 et 486 milliards de dollars (Gallai et al., 2009).

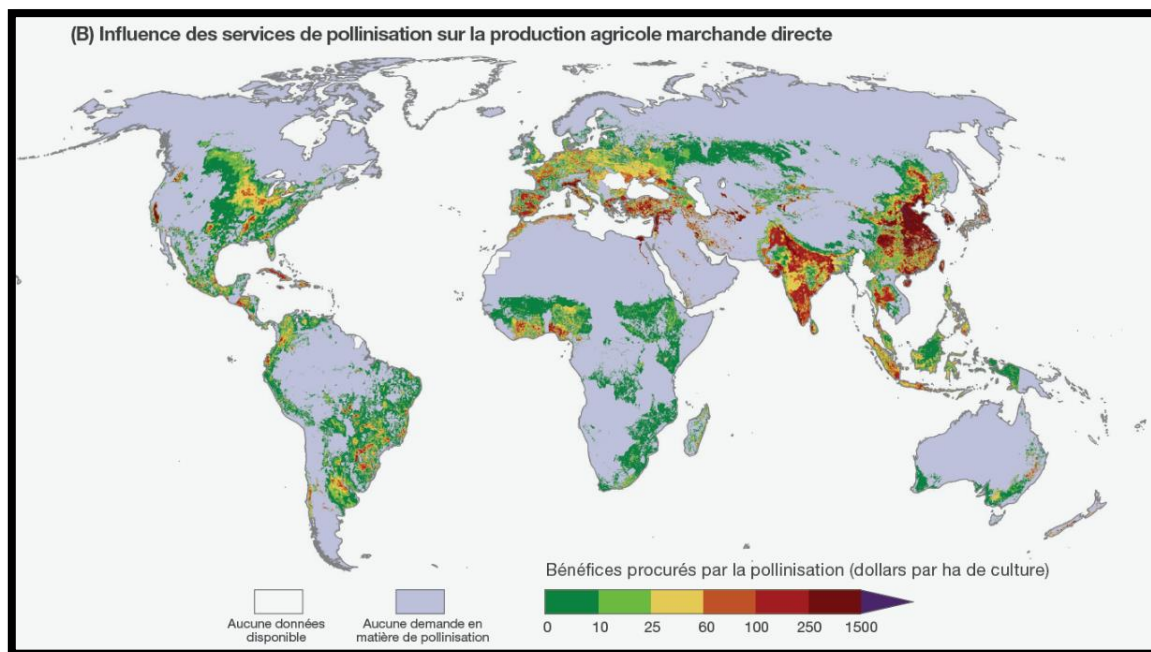


Figure 4 : Bénéfices économiques agricoles grâce à la présence de pollinisateurs

2. Organisation de la colonie d'abeilles mellifères

Chez l'abeille mellifère, les abeilles forment une colonie allant de 20 000 individus en hiver à 60 000 individus en été. On retrouve trois castes chez les abeilles : la **reine** (femelle reproductrice), les **faux-bourçons** (mâles) et les **ouvrières** (femelles non-reproductrices). Le maintien de la colonie est possible grâce aux interactions complexes existants entre les individus dans la colonie, notamment *via* la communication chimique (Maisonnasse, 2010; Trhlin and Rajchard, 2011). L'abeille mellifère est une espèce dite eusociale. Deux castes sont constituées par des individus fertiles : la Reine et les Faux-bourçons et une caste est constituée par des individus non fertiles : les ouvrières. Chaque caste présente des fonctions particulières qui sont indispensables à la survie de la colonie.

2.1. Les différentes castes



La reine est la seule femelle de la colonie à pondre des œufs fécondés. Les œufs diploïdes produiront des ouvrières et les œufs haploïdes produiront

les faux-bourçons (Gempe et al., 2009). A sa mort, les ouvrières choisissent des larves d'ouvrières de moins de 3 jours qu'elles nourrissent exclusivement de gelée royale. La larve nourrie toute sa vie à la gelée royale deviendra une future reine (Kamakura, 2011). Quelques jours après sa naissance, elle effectue son vol nuptial et se fait féconder par plusieurs mâles. En plus de la ponte, la reine joue un rôle primordial pour le maintien de la colonie *via* la communication chimique. En effet, la colonie communique par des composés chimiques appelés phéromones et la reine participe grandement au

bon fonctionnement de la colonie, notamment en inhibant le système reproducteur des ouvrières (Butler Colin Gasking et al., 1962; Maisonnasse, 2010). De plus, la présence de ces phéromones royales implique certains comportements chez les ouvrières comme les soins à la reine (Slessor et al., 2005), la construction de cellules pour du couvain d'ouvrières (Ledoux et al., 2001), le contrôle des faux-bourçons (Villar and Grozinger, 2017) ou encore le contrôle de l'essaimage (Winston et al., 1989). La reine peut vivre jusqu'à 3 à 5 ans en phase d'imago.



Les faux bourçons sont haploïdes et sont issus d'un des ovules de la reine.

Ils sont plus gros que les ouvrières et sont capables de se déplacer sur de

plus longues distances (Witherell, 1971). Une fois nés, ils vont quitter la ruche pour rejoindre d'autres colonies et retrouver des reines à féconder (pouvant être à plusieurs dizaines de kilomètres de la ruche initiale) ou rester dans leur colonie d'origine (Ayup et al., 2021). Les faux-bourçons ne possèdent pas de pièces buccales leur permettant la récolte du nectar ou d'apporter le soin nécessaire au couvain (Snodgrass, 1956). La fonction principale des mâles dans la colonie est la fécondation des reines. Ils sont capables de suivre une reine vierge lors de son vol nuptial grâce à certains composés chimiques émis par la reine (Gary, 1962). Une douzaine de mâles vont féconder la reine pendant le vol nuptial (Woyke, 1955). Les spermatozoïdes seront conservés dans la spermathèque de la reine. La fécondation de la reine par les différents faux-bourçons est fatale pour ces derniers (Winston, 1991). Une colonie forte et saine prendra soin des mâles mais pas une colonie faible. A la fin de l'été quand toutes les colonies se préparent à l'hivernage, les mâles sont expulsés de la colonie et meurent avant l'hiver (Morse et al., 1967). Les faux-bourçons vivent en moyenne 45 jours en phase d'imago.



Les ouvrières sont diploïdes. Dans une colonie, les ouvrières sont issues de la même mère (reine). Le patrimoine génétique du père dépend du spermatozoïde qui fécondera l'ovule de la reine. Certaines ouvrières sont donc des demi-sœurs par leur mère ou des supers-sœurs (même mère et même père) (Mattila and Seeley, 2007). Cette diversité génétique joue un rôle important dans la capacité d'adaptation de la colonie (Tarpy, 2003).

Ce sont les ouvrières qui assurent le bon fonctionnement de la colonie en apportant le soin à la reine, aux jeunes larves et en collectant les ressources nécessaires au nourrissement de la colonie. Leurs fonctions dans la colonie varient en fonction de leur âge appelé « polyéthisme d'âge » (Johnson, 2010; Maisonnasse, 2010). Le temps entre chaque fonction peut fortement varier en

fonction de l'environnement (He et al., 2016; Traynor et al., 2015). Certaines fonctions peuvent également se chevaucher. Les ouvrières sont également capables de retarder ou au contraire d'avancer leur fonction selon les besoins de la colonie (Johnson, 2010). Ainsi, à leur naissance, les ouvrières sont des **nettoyeuses**, puis quelques jours plus tard, deviennent des **nourrices** de la reine et nourrices du couvain (activation des glandes à gelée royale). Les glandes cireuses s'activent une dizaine de jours plus tard, elles commencent leur nouvelle fonction de **bâtisseuses**. Elles vont s'éloigner au fur et à mesure du centre de la colonie et devenir **gardiennes** quelques jours : ces dernières assurent la protection de l'entrée de la colonie. La dernière fonction est la **butineuse**. Les butineuses sont chargées de fournir les ressources alimentaires à l'ensemble de la colonie. Elles peuvent voler jusqu'à plus de 5 km autour de la ruche pour trouver du **nectar**, du **pollen** et de l'**eau**. Les butineuses s'informent entre elles des ressources intéressantes à butiner grâce à une danse codifiée en fonction de la qualité, la quantité et la distance de la ressource (von Frisch, 1967). Malgré leur sens de l'orientation très développé, les butineuses peuvent avoir un comportement de **dérive** (Pfeiffer and Crailsheim, 1998). La dérive est un processus important puisqu'il peut être responsable de la transmission horizontale de pathogènes entre les colonies d'abeilles (Brosi et al., 2017). Les ouvrières prennent soin des larves, de la reine et des faux-bourçons. Dès leur naissance, les larves sont capables de communiquer avec les nourrices (Maisonasse, 2010; Traynor et al., 2014). Les ouvrières allouent tout leur temps à la colonie ce qui permet une meilleure cohésion du nid (Maisonasse, 2010). Elles vivent en moyenne 45 jours en phase d'imago.

2.2. Cycle de développement

Le cycle de développement diffère en fonction de la caste. Ainsi, la reine possède un cycle de développement de 16 jours contre 21 jours pour les ouvrières et 24 jours pour les faux-bourçons. La colonie maintient une température stable de 34°C dans la ruche nécessaire au développement du couvain (jeunes abeilles).

La reine dépose un œuf par cellule. L'œuf éclôt à 3 jours puis la larve est nourrie par les nourrices avec de la gelée royale pendant 3 jours. Pour les futures ouvrières et faux-bourçons, la gelée royale sera remplacée par une bouillie de pollen et de miel. Avant que la larve ne commence sa transformation en nymphe, les abeilles vont operculer la cellule. La date d'operculation dépend de la caste : 7 jours pour la reine, 9 jours pour l'ouvrière, 10 jours pour le faux-bourçon. La larve commence par tisser un cocon puis se transformera en nymphe en quelques jours Figure 5. La jeune abeille arrivée à terme, désoperculera elle-même sa cellule. Le couvain correspond donc à l'ensemble des œufs, des larves, des nymphes et des jeunes abeilles non-émergées. Il peut être ouvert (œufs, larves) ou fermé (nymphe et jeunes abeilles).

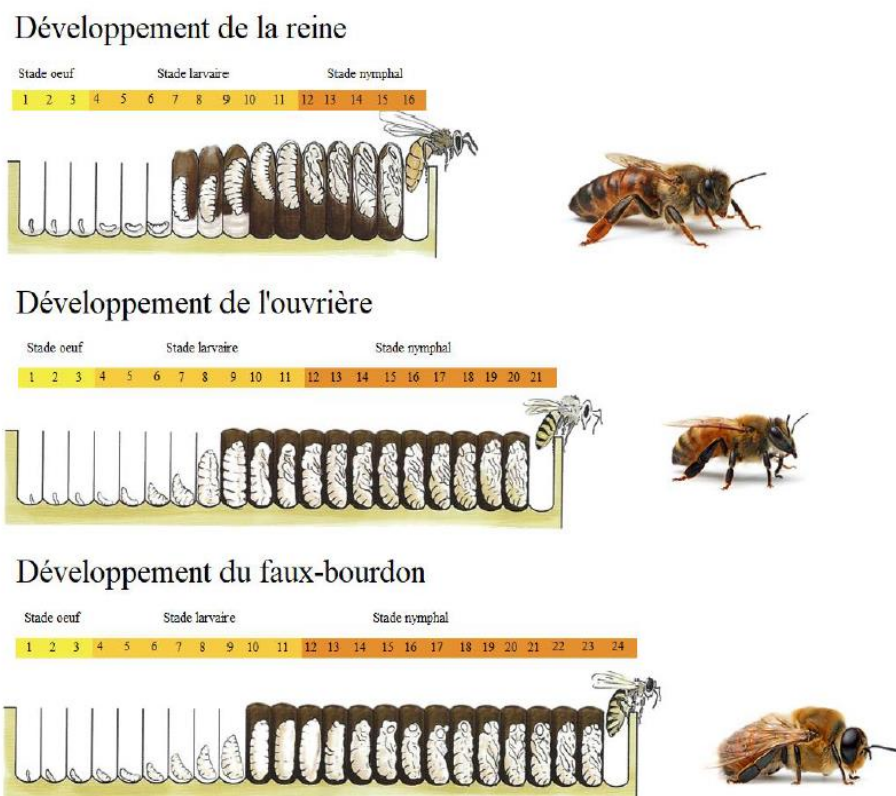


Figure 5 : Cycle de développement (Riva, 2017)

3. Les abeilles menacées par les activités anthropiques

3.1. Les différentes menaces anthropiques

Certains chercheurs nous considèrent actuellement dans la 6^{ième} crise d'extinction (Barnosky et al., 2011; Ceballos and Ehrlich, 2010) avec une perte annuelle de la biodiversité estimée à plus de 10% (IPBES et al., 2018). Les activités anthropiques telles que la pollution, l'agriculture intensive, et l'urbanisation entraînent une fragmentation et une destruction des habitats naturels (Ellis et al., 2010; Veach et al., 2017). Toutes les espèces animales et végétales sont concernées par cette modification de leur environnement. D'ailleurs, une étude récente a estimé une perte de 40% des espèces d'insectes dans les dix prochaines années (Sánchez-Bayo and Wyckhuys, 2019). En Allemagne, une étude sur 27 ans a mis en évidence une perte saisonnière de 76% de la biomasse des insectes volants (Hallmann et al., 2017). L'intensification des pratiques agricoles influencent également le mode de vie de l'ensemble des abeilles (Rollin et al., 2015).

En plus de la destruction directe de leur habitat, les pesticides (insecticides, herbicides et fongicides) sont particulièrement impliqués dans le déclin des abeilles (Magal et al., 2019). Ils atteignent le système nerveux des insectes et notamment le système de reconnaissance et de mémoire spatiale des butineuses (Henry et al., 2012; Rundlöf et al., 2015; Thompson et al., 2005). De plus, les pesticides

diminuent l'immunité des abeilles et les rendent plus vulnérables aux pathogènes (O'Neal et al., 2018). Comme nous l'avons décrit, les abeilles sont d'importantes pollinisatrices mais l'usage de pesticides poussent les apiculteurs à s'éloigner des milieux agricoles (Santos et al., 2018). L'utilisation actuelle des pesticides est remise en question au vu de son impact sur l'environnement. De nouvelles stratégies agricoles sont proposées pour limiter l'usage prophylactique des pesticides (Labrie et al., 2020; Sponsler et al., 2019). En effet, Labrie et son équipe ont mis en évidence que l'usage des néonicotinoïdes était utile dans moins de 5% des situations au Québec car ces derniers sont utilisés majoritairement en traitement préventif.

De plus, la diminution de la diversité des ressources florales (Baude et al., 2016), par l'urbanisation ou l'agriculture intensive, est responsable d'une baisse de la diversité des abeilles et donc du service écosystémique de la pollinisation (Grab et al., 2019; Losey and Vaughan, 2006; Zulian et al., 2013). Les abeilles n'échappent pas aux pressions que subissent les autres insectes (Cloyd, 2019; Goulson et al., 2015; Richards and Kevan, 2002). Le déclin des abeilles est plurifactoriel (Biesmeijer et al., 2006; Williams et al., 2010; Zee et al., 2015). La commission européenne considère qu'environ 9% des espèces d'abeilles en Europe sont menacées (Nieto et al., 2014). Cependant, le manque de données sur les abeilles sauvages ne permet pas, actuellement, de définir avec certitude le nombre d'espèces réellement menacées. Les différents facteurs regroupant la cause du déclin des abeilles sont présentés sur la Figure 6. Les espèces spécialistes sont particulièrement sensibles aux modifications de l'environnement (Johnson et Steiner 2000). Comme l'ensemble des espèces d'abeilles, l'abeille mellifère doit faire face à ces modifications de son environnement.

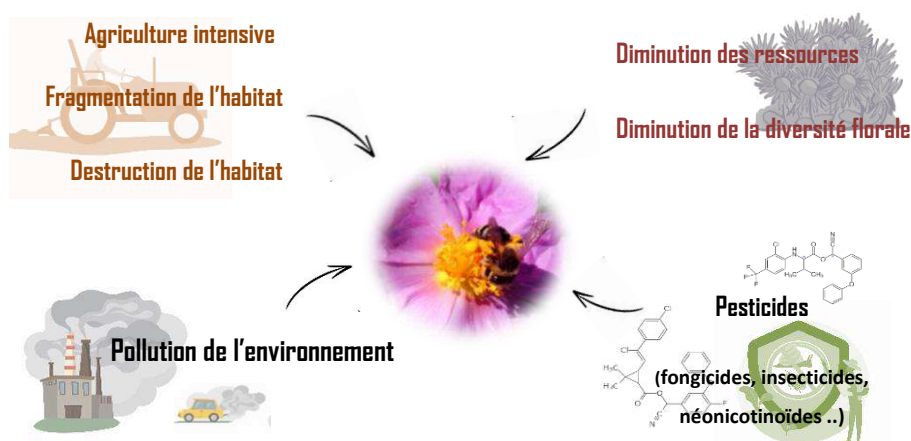


Figure 6: Facteurs représentant une menace pour les abeilles

3.2. Menaces spécifiques à *Apis mellifera* et à l'apiculture

En Europe, une étude montre que depuis 1985, le nombre de colonies ainsi que le nombre d'apiculteurs a significativement diminué (baisse de 16% du nombre de colonies et 31,4% du nombre d'apiculteurs), excepté pour certains pays méditerranéens où le nombre de colonies augmente (Neumann, Carreck, 2010; Potts et al., 2010). En France, une étude réalisée par France Agrimer en 2020 met en évidence une augmentation du nombre d'apiculteurs depuis 2014. Pourtant, alors que le nombre de pollinisateurs sauvages et de ruches déclinent, la demande pour un service de pollinisation augmente en Europe (Breeze et al., 2014) et aux Etats-Unis comme par exemple, pour la pollinisation des amandiers en Californie (Goodrich, 2019; Sáez et al., 2020). Aux États-Unis, ce déclin massif des colonies d'abeilles, intervenu dans les années 2010, porte le nom de « Colony Collapse Disorder » (CCD). Ce terme a été employé pour la première fois en 2008, à la suite de deux hivers à forte mortalité d'abeilles (≈22% de perte en 2008) (vanEngelsdorp et al., 2009). Les signes cliniques du CCD sont : 1) Perte rapide des abeilles adultes et une forte présence de couvain operculé, 2) la présence de stock de nourriture et 3) l'absence de pathogènes dans la colonie (Ellis et al., 2010).

Les causes du CCD sont multifactorielles, incluant la transformation de l'habitat, la diminution des ressources florales, l'utilisation de pesticides, évoquées pour l'ensemble des insectes. D'autres facteurs sont spécifiques à *Apis mellifera* : la présence de certains pathogènes (Ellis et al., 2010; Goulson et al., 2015; Haubruge et al., 2006), et les pratiques apicoles comme la transhumance, une mauvaise efficacité des traitements, et le nourrissage (Haubruge et al., 2006). En effet, dans certains pays, l'accès aux zones naturelles riches en diversité florale est interdit aux apiculteurs, les poussant ainsi à transhumer leurs ruches dans des zones agricoles souvent pauvres d'un point de vue nutritif et avec une forte présence de pesticides (Durant, 2019).

En plus de ces causes anthropiques directes et indirectes, des pathogènes spécifiques d'*Apis mellifera* peuvent être responsables de l'effondrement d'une colonie. En effet, *Apis mellifera*, comme toute espèce possède ses pathogènes spécifiques qui se sont propagés mondialement par les transports d'abeilles mellifères. Parmi ces pathogènes, on retrouve des virus (ABPV, DWV, IAPV...) (Beaurepaire, 2020; Ullah et al., 2021), des bactéries mais aussi des champignons et des protozoaires (Genersch, 2010; Higes et al., 2013). Les transmissions sont verticales mais également horizontales (de la nourrice au couvain ou l'inverse) (Fries and Camazine, 2001). Ces virus sont très souvent retrouvés dans des colonies effondrées (Pohorecka et al., 2011). La fréquence de ces virus a été corrélée avec l'apparition d'un des pathogènes les plus redoutées actuellement par les apiculteurs : un acarien venant d'Asie, *Varroa destructor* (Beaurepaire, 2020; Martin, 2001; Mondet et al., 2014).

Bien que les causes du déclin des abeilles soient multifactorielles, *Varroa destructor* est reconnu comme une des plus grandes menaces pour *Apis mellifera* (Le Conte et al., 2010; Rosenkranz et al., 2010).

4. *Varroa destructor*, un fléau pour l'abeille mellifère

4.1. Origine du Varroa

Varroa destructor est un acarien (Acari) qui fait partie des quatre espèces du genre *Varroa* spp, toutes ectoparasites d'abeilles originaires d'Asie (Rosenkranz et al., 2010).

- *Varroa jacobsoni* dont les hôtes originels sont *Apis cerana* et *Apis nigrocincta*.
- *Varroa underwoodi*, parasite d'*Apis cerana*
- *Varroa rinderero*, parasite d'*Apis koschevnikovi*.
- *Varroa destructor* (Anderson and Trueman, 2000) dont l'hôte naturel est *Apis cerana*

Les varroa spp sont des acariens parasites du couvain présents chez l'abeille (Oldroyd, 1999). La coévolution d'environ 10 000 ans entre *Apis cerana* et ces parasites a permis de développer une tolérance naturelle d'*Apis cerana* à *V. destructor* et *V. jacobsoni* (Boot et al., 1999). *Varroa destructor* a infesté les premières colonies d'*Apis mellifera* dans les années 50 puis s'est propagé mondialement. Avant les années 2000, le varroa est communément nommé *Varroa jacobsoni*. Il faudra attendre les années 2000 pour que deux chercheurs mettent en évidence l'infestation de l'abeille mellifère par *V. destructor* et non pas *V. jacobsoni* (Anderson and Trueman, 2000) (Figure 7). L'infestation d'*Apis mellifera* par *V. jacobsoni* arrive plus tardivement en 2008 (Roberts et al., 2015). *Apis cerana* a coévolué avec ces parasites créant ainsi un équilibre hôte-parasite non observable chez *Apis mellifera* (Rath, 1999). Pour la suite du manuscrit, le terme varroa désignera uniquement *Varroa destructor*.

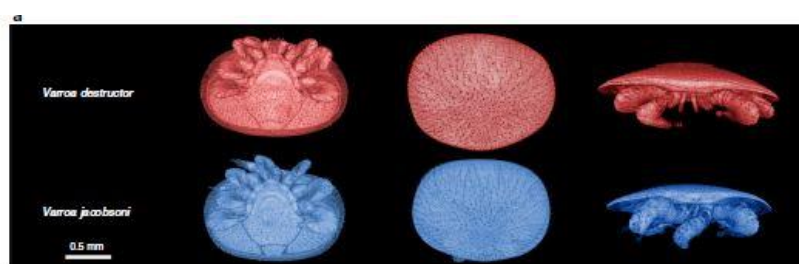


Figure 7: Comparaison morphologique entre *Varroa destructor* et *Varroa jacobsoni* (Techer et al., 2019)

Les études génétiques ont pu mettre en évidence que seulement deux haplotypes de *V. destructor* sont passés d'*Apis cerana* sur *Apis mellifera*. Ils correspondent aux haplotypes de Corée / Japon (Anderson and Trueman, 2000; Techer et al., 2019) (Figure 8). L'haplotype de Corée est plus répandu que l'haplotype de Thaïlande / Japon (Evans and Cook, 2018; K. Traynor et al., 2020) (Figure 8). Les

deux haplotypes sont capables de s'hybrider entre eux. L'ensemble des différents haplotypes de *Varroa destructor* sont présentés sur la Figure 8 (Dietemann et al., 2019; Techer et al., 2019; K. S. Traynor et al., 2020). Actuellement, *Varroa destructor* présente une répartition quasi-mondiale (excepté quelques îles encore épargnées) (Figure 8). La gestion de ce parasite présente donc un enjeu mondial (Rosenkranz et al., 2010).

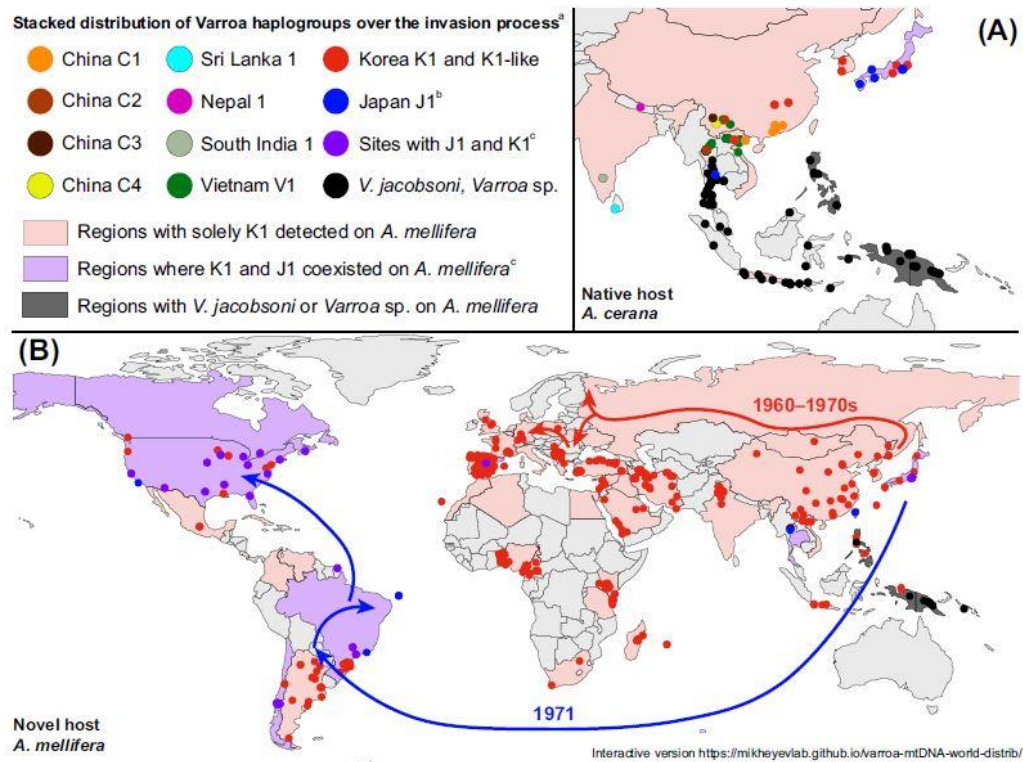


Figure 8 : Origine et dispersion des différents sous-types de *V. destructor* (Traynor, 2020)

4.2. Morphologie et Comportement de nutrition

La relation hôte-parasite témoigne d'une adaptation de *V. destructor* à son hôte. La biologie du Varroa est complètement adaptée à celle de l'abeille que ce soit sa morphologie, son mode de nutrition, son cycle de développement ou encore son moyen de dispersion.

V. destructor présente un fort dimorphisme sexuel. La femelle mature, appelée fondatrice, présente une forme ovale (1.6mm de largeur et 1.1mm de longueur) et une cuticule colorée rouge foncée (Mondet et al., 2016) (Figure 9). Le mâle, de forme ovoïde (0.5mm), est beaucoup plus petit et de couleur crème (Figure 9) (Mondet et al. 2016). La jeune femelle appelée protonymphe est blanche et ronde. Celle-ci se développe en deutonymphe qui est plus ovale. Avec le temps, la cuticule de la deutonymphe se colore jusqu'à sa maturité sexuelle.

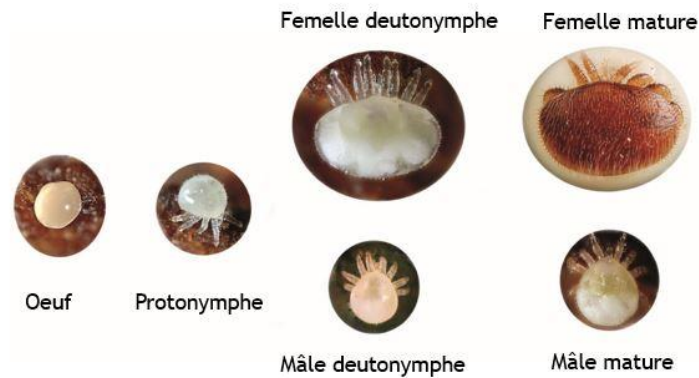


Figure 9: Développement de l'œuf à l'imago chez le Varroa

Jusqu'en 2019, les scientifiques et apiculteurs étaient persuadés que les varroas se nourrissaient exclusivement de l'hémolymph de l'abeille (Rosenkranz et al., 2010). Plusieurs études ont permis de mettre en évidence que les varroas se nourrissent majoritairement des corps gras de l'abeille (Posada-Florez et al., 2019; Ramsey et al., 2018). Sur l'abeille adulte, le varroa se place entre le 3^{ème} et le 4^{ème} sternite préférentiellement du côté gauche, ce qui leur permet un accès plus rapide aux corps gras (Bowen-Walker et al., 1997; Ramsey et al., 2019) (Figure 10).

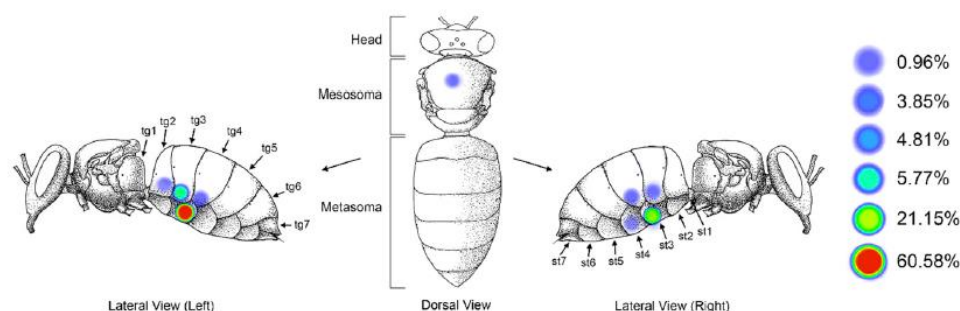


Figure 10 : Probabilité de présence de *V. destructor* sur *Apis mellifera*

4.3. Cycle de développement

Le cycle du varroa a toujours été distingué en deux phases : phase de **dispersion** ou « phorétique » et de **reproduction** (Traynor et al., 2020). La phorésie désigne l'utilisation d'un individu par un autre individu pour se déplacer sans lui porter atteinte. Le varroa phorétique correspond à un varroa (femelle mature) qui utilise une abeille adulte pour se déplacer. Il a longtemps été considéré que les varroas se nourrissaient uniquement pendant la phase de reproduction. L'étude de Ramsey et ses collaborateurs en 2019 a mis en évidence que le varroa en phase de phorésie se nourrissait de corps gras sur l'abeille adulte. Le terme « phorésie » utilisé depuis plusieurs dizaines d'années, n'est donc plus le terme adéquat puisque le varroa n'utilise pas l'abeille uniquement pour se déplacer. Actuellement, le terme

varroa phorétique continue à être majoritairement utilisé pour désigner un varroa sur une abeille, néanmoins, la phase de phorésie peut être appelé phase de dispersion (K. S. Traynor et al., 2020).

Phase de dispersion

Un jeune varroa femelle émergera d'une cellule avec la jeune abeille. Lors de l'émergence, le varroa choisira préférentiellement une nourrice (80%) qu'une butineuse (20%) pour débiter sa phase de phorésie (Kuenen and Calderone, 1997) (Figure 11). Son attirance pour les nourrices pourrait s'expliquer par sa proximité au couvain et également par l'abondance de corps gras chez les nourrices (Ramsey et al., 2019). Le profil cuticulaire des abeilles informe de l'âge des abeilles au varroa (Kuenen and Calderone, 1997; Maisonnasse, 2010). Les varroas sont capables de réceptionner et reproduire ces composés chimiques. Ces composés leur ont permis une parfaite adaptation à leur hôte, notamment savoir quand infester une cellule (Calderone and Lin, 2001; Trouiller et al., 1992) et se camoufler (du point de vue olfactif) (Kather et al., 2015).



Figure 11 : Femelle *V. destructor* sur le thorax d'une jeune abeille

Plusieurs études ont mis en évidence une variation de la durée de la phase de phorésie. Cette durée peut dépendre de l'âge du varroa et de la disponibilité du couvain. La phase de phorésie varie de 4 à 11 jours en présence de couvain (Fries et al., 1994; Martin, 1998).

Avant de débiter sa phase de reproduction, la femelle varroa infeste une cellule. Le couvain de faux-bourdon attire entre 8 et 11,5 fois plus les varroas que le couvain d'ouvrières (Boot et al., 1993; Fuchs, 1990). Certaines phéromones présentes dans le couvain de faux-bourdon auraient des capacités d'attraction plus importantes (Calderone and Lin, 2001; Martin et al., 2001; Trouiller et al., 1992). En plus des odeurs, la taille de la cellule présente un paramètre important pour l'attraction des varroas (Willem J. Boot et al., 1995). Le varroa infestera une larve d'ouvrière 20h avant l'operculation et entre 45h et 50h pour une larve de faux-bourdon (Boot et al., 1992; Fries et al., 1994). La femelle varroa se camoufle jusqu'à l'operculation de la cellule, immobile, cachée dans la bouillie de miel et de pollen (Traynor et al., 2020).

Phase de reproduction

Une fois la cellule operculée, la fondatrice varroa va choisir un site de nourrissage sur la larve qu'elle entretiendra pour sa descendance (Donzé and Guerin, 1994). L'ontogénèse est déclenchée à un stade larvaire bien précis, probablement déclenchée par une émission de composés par la larve tels que l'éthyle d'ester d'acide gras (Frey et al., 2013; Rosenkranz and Garrido, 2004). La fondatrice contrôle le stade de développement de sa descendance en fonction du développement de son hôte. Si elle détecte un décalage, la reproduction est bloquée (Frey et al., 2013).



Figure 12: Varroa femelle fondatrice avec sa descendance (protonymphes) dans une cellule

Sur la paroi de la cellule, la fondatrice va choisir un site de défécation qui servira de lieu de rencontre pour sa descendance, notamment pour l'accouplement (Donzé and Guerin, 1994). Le premier œuf, l'œuf de mâle est pondue 60h après l'operculation puis les œufs de femelles sont pondus toutes les 26h-32h (Ifantidis, 1988). Le mâle s'accouplera avec ses sœurs au fur et à mesure qu'elles atteignent leur maturité sexuelle. Au cours du développement de son hôte, la fondatrice pondra 6 œufs dont le mâle et environ 2 femelles arriveront à maturité et seront fécondées à l'émergence de l'abeille (Fuchs and Langenbach, 1989; Martin, 1994).

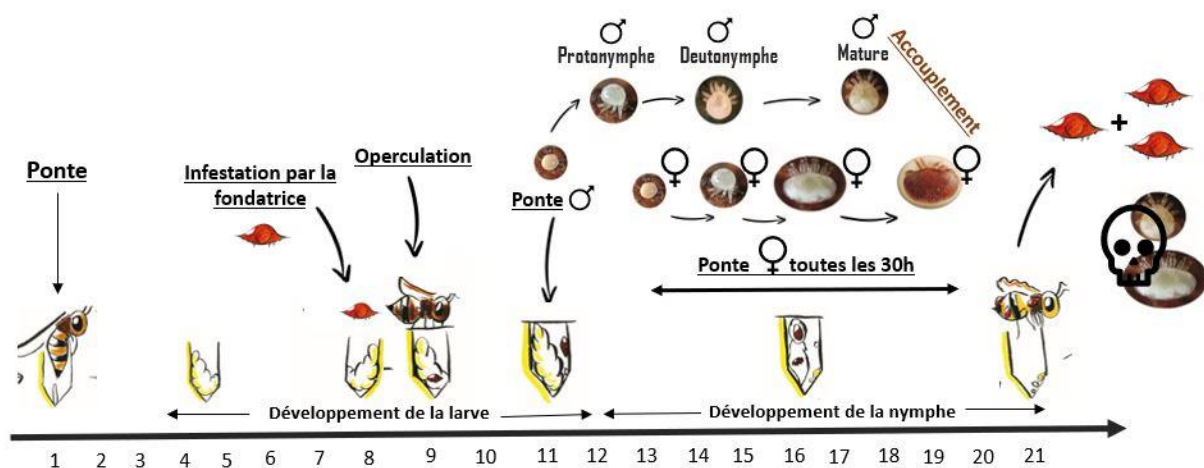


Figure 13: Schéma des différentes étapes lors de la phase de reproduction modifié d'après Rosenkranz et al. 2010.

Le succès reproducteur est plus important dans le couvain de mâles (Fuchs, 1992). On peut considérer en moyenne un succès reproducteur de 1.45 pour une cellule d'ouvrière et de 2.7 pour une cellule de faux-bourdon (W. J. Boot et al., 1995; Calis et al., 1999). Le varroa a donc un intérêt à se reproduire préférentiellement dans du couvain de faux-bourdon. Il est d'ailleurs capable d'adopter plusieurs stratégies en fonction de la proportion de couvain de mâles et d'ouvrières (Willem J. Boot et al., 1995; Fuchs, 1992).

Peu d'information sur la longévité du varroa sont connues bien qu'on estime qu'une femelle varroa serait capable de réaliser 2 à 3 cycles de reproduction durant sa vie. (Fries and Rosenkranz, 1996; Martin, 1998).

Les multi-infestations

Son mode de reproduction est très consanguin : reproduction entre le frère et ses sœurs. Contrairement à ce qu'on aurait pu imaginer, il existe une variation génétique par ruche (Beaurepaire et al., 2017; Dynes et al., 2017). Il semblerait que la multi-infestation soit responsable en partie du maintien d'une diversité génétique chez le varroa (Beaurepaire et al., 2017; Traynor et al., 2020). La multi-infestation correspond à l'infestation d'une même cellule par plusieurs femelles varroas (Figure 14). Le comportement de multi-infestation, bien qu'il soit vital au maintien des populations de varroas, semble aléatoire (Beaurepaire et al., 2017). Pourtant 83% des fondatrices présentent des différences génotypiques ce qui permettra d'augmenter l'hétérozygotie des descendants (Beaurepaire et al., 2017) et donc une meilleure adaptation à leur environnement. Par ailleurs, si l'infestation d'une cellule dépasse 4 fondatrices, le succès reproducteur est plus faible mais la probabilité d'hétérozygotie est

plus élevée (Fuchs and Langenbach, 1989). Dans cette situation, les fondatrices vont créer un site d'accumulation fécale commun pour la reproduction (Donzé and Guerin, 1994).



Figure 14: Multiinfestation des nymphes

4.4. Distribution dans la colonie et dispersion

Distribution dans la colonie

La population de varroas dans la colonie ne se répartit pas de manière homogène entre le couvain et les abeilles adultes (K. S. Traynor et al., 2020). En saison estivale, une grande majorité de varroas sont en phase de reproduction dans le couvain. Cela implique qu'ils ne sont pas visibles par l'apiculteur qui visite ses colonies. En présence de couvain de mâles (du début du printemps au début de l'été), il existe une plus forte disparité de proportion entre le nombre de varroas sur abeilles adultes, dans le couvain d'ouvrières et dans le couvain de faux-bourdons (Figure 15). En hiver, la quasi-totalité des varroas sera en phase phorétique (en fonction de la quantité de couvain). Cette répartition hétérogène entre le couvain et les abeilles rend difficile l'estimation du taux d'infestation de la colonie avec les outils utilisés classiquement pour déterminer les taux d'infestation (voir§, Estimation du taux d'infestation).

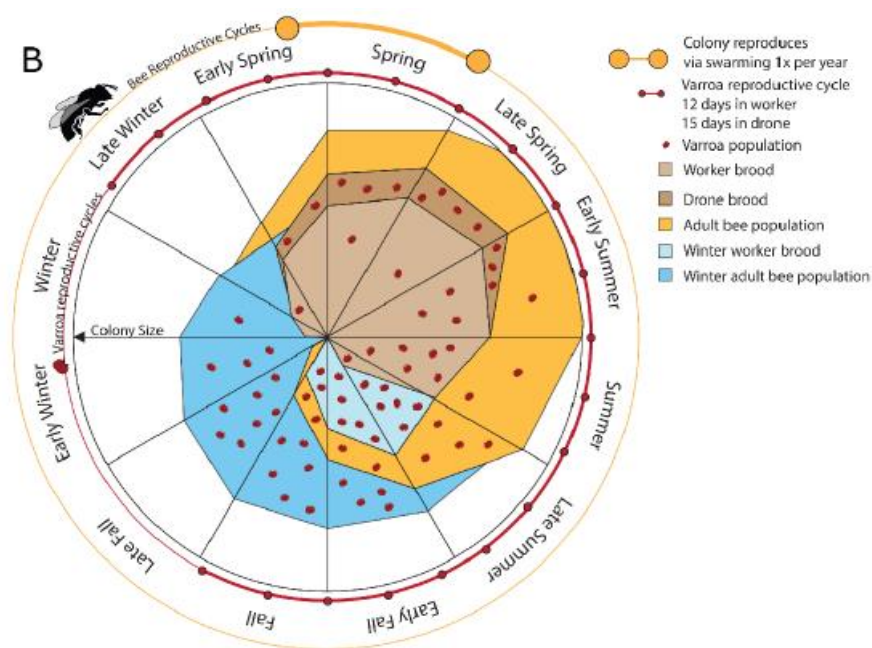


Figure 15: Distribution des varroas entre le couvain et les abeilles au cours de l'année (Traynor et al, 2020)

Dispersion entre les colonies

Comme la plupart des pathogènes, *Varroa destructor* s'est répandu rapidement dans le monde entier, notamment parce que les échanges d'abeilles par les apiculteurs entre les pays ont accéléré sa propagation (Owen, 2017). On a longtemps pensé que les varroas se déplaçaient naturellement *via* les faux-bourdon qui passent de ruche en ruche. Mais depuis quelques années, des études ont mis en évidence l'influence de la dérive des butineuses (changement de colonies) en période de miellée (Forfert et al., 2015; Greatti et al., 1992; Peck et al., 2016). La dérive pourrait expliquer un échange de 75 varroas / jour / colonie en période de miellée (Greatti et al., 1992). Plus récemment, le comportement de pillage (Peck and Seeley, 2019) et les échanges lors du butinage (Peck et al., 2016) ont montré de nouvelles opportunités pour le varroa de se disséminer. Alors que dans une colonie faiblement infestée, le varroa préférera infester une nourrice, dans une colonie présentant une infestation élevée, le profil cuticulaire des nourrices et des butineuses se chevauchent, trompant le varroa. Par ce phénomène, le varroa infeste des butineuses et sera ainsi transporté à l'extérieur de la colonie (Cervo et al., 2014; Del Piccolo et al., 2010; K. S. Traynor et al., 2020)

La distance est une variable explicative à 79% (Forfert et al., 2015) de la quantité de varroas entrant dans une ruche par la dérive (Nolan, 2016). D'autres études mettent en évidence des échanges variables entre les colonies d'un même rucher ou inter-rucher. Par exemple, une colonie fortement infestée par varroa présenterait une acceptation de butineuses pilleuses plus importante qu'une colonie à infestation normale (Forfert et al., 2015). D'ailleurs, une zone plus dense en ruches, en fin de

saison, présente une infestation significativement plus importante qu'une zone à faible densité de ruches (Williams, 2007).

L'étude génétique établie à différentes échelles, entre deux ruchers, entre des ruches et intra-ruche a permis de mettre en évidence que la variabilité génétique était bien plus importante entre les individus d'une même colonie (44.93%) et intra-individus (51.2%) plutôt qu'entre des ruches d'un même rucher (2.55%) au printemps et en été (Dynes et al., 2017). Les auteurs concluent que les multi-infestations induisent une diversité génétique importante et que les flux de gènes entre les ruches entraînent une certaine homogénéité à l'intérieur du rucher.

4.5. Dynamique de population de *Varroa destructor*

La dynamique de population de *Varroa* dépend de la dynamique de population du couvain et des abeilles adultes (Calis et al., 1999). En effet, la reproduction du varroa dépend de la quantité de couvain d'ouvrières ou de faux-bourçons disponible pour sa reproduction (Calis et al., 1999; Martin, 1998). Pour une saison en climat tempéré, la reprise de ponte de la reine démarre généralement en mars (Figure 16). Le varroa débutera sa reproduction dès l'apparition des premiers couvains. Au mois de juin, la reine ralentit sa ponte réduisant ainsi la quantité de couvain. Le nombre de varroas dans la colonie continue à augmenter. Seule une rupture de ponte (arrêt de ponte de la reine), à la suite d'une miellée bloquante ou d'un remérage (changement de reine), peut fortement réduire la croissance de la population de varroas. Le point critique à ne pas franchir est un nombre de varroas égal au couvain dans la colonie. Un traitement doit toujours avoir lieu avant cet état. A l'approche de l'hiver, la reine ralentit voire stoppe la ponte et la population de varroas se stabilise. La croissance du varroa dans la colonie continuera d'année en année jusqu'à l'effondrement de la colonie due à une charge de varroas trop importante.

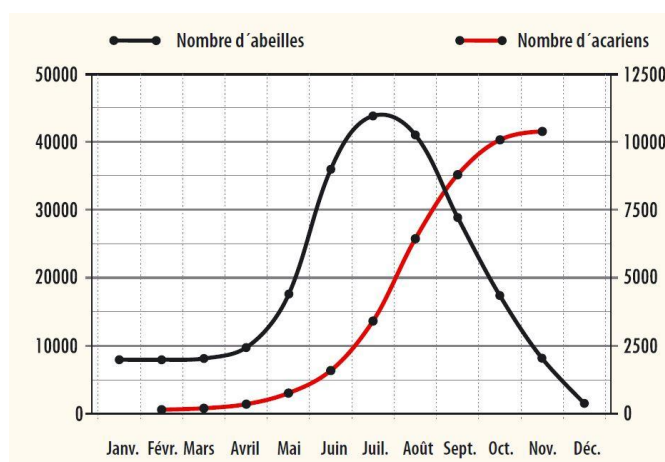


Figure 16: Dynamique de population de l'abeille mellifère et du varroa modélisée (Wolfgang, 2018).

5. Influence de *Varroa destructor* sur l'abeille mellifère : Varroose

En plus de se nourrir d'hémolymphes et de corps gras de l'abeille, le varroa est un vecteur de maladies notamment en transmettant des virus. Il engendre des dégâts visibles à l'échelle de l'abeille pouvant à terme avoir un impact sur l'ensemble de la colonie. La varroose est le terme appliqué pour décrire l'ensemble des conséquences liées au parasitisme du varroa sur l'abeille.

5.1. Varroa, vecteur et réplicateur de virus

Depuis l'apparition du varroa, le nombre d'études sur les virus en apiculture a fortement augmenté (Beaurepaire, 2020). En effet, les virus de l'abeille mellifère ont toujours été présents en quantité variable. Néanmoins, la présence de varroa augmente la fréquence de certains d'entre eux (Mondet et al., 2014). Le virus des ailes déformées (DWV) est un des meilleurs exemples pouvant illustrer l'impact du varroa sur le développement du virus dans la colonie (Locke et al., 2012). Ce dernier est responsable d'une malformation des ailes chez les abeilles les empêchant de voler (Bowen-Walker et al., 1999) (Figure 17). Une étude a mis en évidence la corrélation entre l'arrivée du varroa et la présence du virus (pour le DWV et le virus de la paralysie aiguë (KBV)) (Mondet et al., 2014). Néanmoins, le varroa n'a pas la même influence sur tous les virus (Martin et al., 2012; Shen et al., 2005; Tentcheva et al., 2004). De plus, certains virus se répliquent lorsqu'ils contaminent le varroa (Gisder et al., 2009; Yang and Cox-Foster, 2005; Yue and Genersch, 2005). Selon la virulence des virus, la relation avec la présence de varroa peut être délicate. En effet, les virus BQCV et SBV, en injection, entraînent la mort de la nymphe et sont donc peu présents chez les abeilles adultes (Remnant et al., 2019). L'équilibre qu'il existait autrefois entre abeilles et virus a été modifié depuis l'arrivée du varroa (Di Prisco et al., 2016; Sumpter and Martin, 2004).



Figure 17: Abeilles naissantes, l'une saine (à gauche) et l'autre porteuse du DWV (à droite)

5.2. Conséquence à l'échelle individuelle

Le varroa se nourrit des corps gras de l'abeille (Ramsey et al., 2019). Or les corps gras constituent un stock de graisse pour les abeilles. De plus, ils participent au bon fonctionnement des fonctions immunitaires et hormonales des abeilles (Ramsey et al., 2019). On observe aussi chez les abeilles infestées une réduction des protéines et de la vitellogénine (Amdam et al., 2004; Faucon and Chauzat, 2008; Ramsey et al., 2019; Yang and Cox-Foster, 2005) ainsi qu'une modification des régulations hydriques (Annoscia et al., 2012). Cela aura pour conséquence une diminution de l'immunité de l'abeille infestée. La diminution des corps gras et des protéines chez les abeilles est corrélée à une réduction de la durée de vie (Crailsheim, 1992). De plus, lors de cette phase de nutrition, le varroa perce la cuticule ce qui facilite la contamination par les virus (Kanbar and Engels, 2003). Les larves infestées par le varroa arriveront à émergence mais sont souvent malades et de plus petite taille (Genersch, 2010; Nazzi and Le Conte, 2016). L'impact physiologique additionné de la présence de virus aura un impact direct sur la longévité des abeilles (environ 30% de moins) (Annoscia et al., 2012, 2015; Dainat et al., 2012; Greatti et al., 1992; Nazzi and Le Conte, 2016) et notamment des abeilles d'hiver (Amdam et al., 2004). En effet, 70% des nymphes infestées par 3 varroas meurent dans les 2 premières semaines, contre 6 semaines habituellement (Annoscia et al., 2012). En plus de l'impact physiologique direct du varroa sur son hôte, le parasitisme va entraîner une modification du comportement de l'abeille et notamment une réduction de son activité moyenne dans la colonie : absence de collecte de la nourriture, forte diminution du soin au couvain (Annoscia et al., 2015; Zanni et al., 2018).

5.3. Conséquences à l'échelle de la colonie

Les premières conséquences observables pour l'apiculteur sont une diminution de la production de miel et une dégradation de la santé du couvain. En effet, le soin apporté au couvain diminue ainsi que la collecte de nourriture (diminution du nombre de butineuses). Une étude a mis en corrélation la production de miel en fonction de l'infestation de la colonie. Celle-ci peut atteindre une baisse de plus de 50% pour une infestation élevée (>10 varroas phorétiques pour 100 abeilles) (Kretzschmar et al., 2016).

A l'échelle de la colonie, les symptômes d'effondrement sont visibles par une diminution significative du nombre d'abeilles (Ritter et al., 1984). L'association d'une forte infestation de varroas et l'augmentation de virus entraîne l'effondrement de la colonie mais le seuil critique de varroas à ne pas dépasser varie en fonction des virus transmis (Martin, 2001). Par exemple, en fonction de la force de la colonie, la corrélation entre le taux d'infestation de varroas et la quantité de DWV varie fortement (Prisco et al., 2011).

L'effondrement d'une colonie intervient bien souvent lors de l'hivernage. En effet, si la colonie était fortement infestée lors du développement des abeilles d'hiver, le risque d'effondrement pendant l'hiver augmente. C'est notamment, la réduction de la durée de vie des abeilles d'hiver qui sera en cause (Amdam et al., 2004; Dooremalen et al., 2012; Wegener et al., 2016) .

6. Gestion du varroa

La gestion du varroa par les apiculteurs implique l'utilisation de moyens de lutte pour maintenir une infestation de la colonie sous un seuil d'infestation critique. Ce seuil d'infestation varie en fonction des environnements. Plusieurs méthodes sont disponibles pour évaluer le taux d'infestation de la colonie.

6.1. Evaluation du taux d'infestation

Les méthodes actuelles sont l'évaluation du **pourcentage de varroas « phorétiques » (%VP)**, la **chute naturelle quotidienne** de varroas et la mesure d'un **pourcentage de cellules du couvain infestées**. Ces méthodes permettent aux apiculteurs de connaître le seuil au-delà duquel il faut traiter la colonie mais elles n'ont pas comme objectif principal d'estimer la population de varroas totale de la colonie. En effet, comme montré précédemment, la population totale de varroas dépend de nombreux paramètres qui sont difficilement mesurables (Dietemann et al., 2012; Mondet et al., 2016).

- Le **pourcentage de varroas « phorétiques » (%VP)**: celui-ci se mesure avec différents outils, le sucre glace, le CO₂ ou un détergent. Cette méthode peut être utilisée à l'aide de l'EasyCheck®, du testeur Swienty A/S® ou tout autre outil fabriqué de manière artisanale. Environ 300 abeilles (nourrices de préférence) sont prélevées dans la ruche et mises en contact avec soit du sucre glace, soit du CO₂ soit du détergent. Dans les trois cas, les varroas sont décollés de leur hôte. Le nombre de varroas décollés est ramené au nombre d'abeilles pour obtenir un nombre de varroas pour 100 abeilles (Equation 1). L'efficacité de détachement varie en fonction de la méthode utilisée, il faut donc utiliser un coefficient de correction (Cc) pour obtenir une meilleure estimation du pourcentage de varroas phorétiques (Mondet et al., 2016). En période de miellée, la méthode au sucre glace perd en efficacité, l'indice de correction à appliquer est de 1.6. La plupart des suivis d'infestations sont évalués à partir du pourcentage de varroas phorétiques.

(Equation 1)

$$\%Varroas \text{ phorétiques } (\%VP) = \frac{\text{Nombre de varroas tombés}}{3} \times Cc$$

Avec Cc=1 (détergent), Cc (sucre glace) = 1,1 et Cc (CO₂) =1,4

- La **chute naturelle** de varroas : cette méthode présente l'avantage de ne pas avoir à ouvrir la ruche. Un lange (plaque) graissé est placé sous la colonie pendant 3 jours. Les varroas morts naturellement pendant cette période vont tomber sur le lange graissé. Il sera alors facile d'obtenir un nombre de varroas morts par jour pour une colonie. Peu de données sont disponibles avec cette méthode car elle nécessite de venir plusieurs jours avant le comptage.



Figure 18: Préparation et graissage du lange



Figure 19: Varroas morts sur le lange

- L'**infestation du couvain** : une centaine de cellules peuvent être désoperculées et une estimation de l'infestation du couvain peut être réalisée. Il est important de désoperculer de manière aléatoire car les varroas sont répartis de manière hétérogène en inter et intra-cadres. Cette méthode est très peu utilisée par les apiculteurs car elle est chronophage. C'est un suivi complémentaire souvent réalisé en laboratoire.



Figure 20: Désoperculation des cellules.

Après de nombreuses années d'études, des seuils d'infestation à ne pas dépasser ont été fixés en fonction de la saison (Tableau 1). Ce seuil peut varier en fonction de l'environnement dans lequel se trouvent les abeilles car elles ne subissent pas les mêmes contraintes : par exemple en Guyane française, les abeilles semblent tolérantes à un seuil d'infestation bien plus élevé (pers.comm). Si le seuil d'infestation dépasse les recommandations, il est conseillé à l'apiculteur d'effectuer un

traitement ou toute autre méthode diminuant l'infestation de la colonie. Il est important de noter que ces seuils sont approximatifs et sont des outils pour aider l'apiculteur à la gestion de l'infestation avant que la colonie ne s'effondre.

Tableau 1: Chiffres clés de taux d'infestation à ne pas dépasser

Seuil à ne pas dépasser	Varroa « phorétiques »	Chute naturelle	Références
Avant traitement	>3%	>10 varroas /jour	(Dechatre et al., 2021; Kulhanek et al., 2021)
Après traitement ou au printemps	>1%	>3 varroas / jour	(Cahier technique, 2019; Dainat et al., 2012)

6.2. Les méthodes de contrôle

Plusieurs méthodes de contrôle permettent de réduire l'infestation du varroa dans les colonies. Il est possible de regrouper ces méthodes en 3 catégories :

- Les acaricides autorisés en apiculture biologique
- Les acaricides autorisés en apiculture conventionnelle
- Les méthodes complémentaires

Pour la plupart des colonies, les apiculteurs sont obligés d'utiliser des acaricides pour maintenir une faible infestation du varroa. L'utilisation de ces acaricides nécessite, au préalable, une Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) validée par l'Agence Nationale des Médicaments Vétérinaires (ANMV).

6.2.a. Les acaricides autorisés en apiculture biologique en France

En France, 7 médicaments homologués, avec une AMM, peuvent être utilisés par les apiculteurs en apiculture biologique (Tableau 2). Le détail de posologie de ces différents produits est développé dans Tableau 2. Les trois substances acaricides autorisées dans les traitements biologiques sont : le thymol, l'acide formique et l'acide oxalique. Le thymol est retrouvé dans 3 produits aux galéniques différentes: Apiguard®, ApilifeVar® et Thymovar®. L'acide formique est présent dans différents produits : MAQS® et Varromed® (mélange d'acide formique et d'acide oxalique). Enfin, l'acide oxalique, plus utilisé que l'acide formique est également présent dans différents produits : Oxybee®, Apibioxal®, Varromed®.

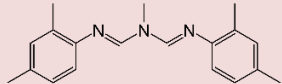
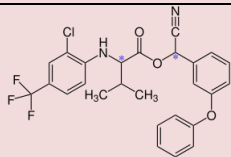
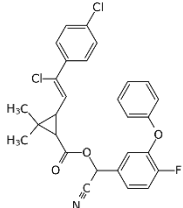
Tableau 2 : Présentation des différents produits autorisés en France en apiculture biologique. La posologie des différents produits y est également décrite.

Substances actives	Produits	AMM	Posologie et renouvellement
Thymol	Thymovar®	2007	Déposer des plaquettes au thymol sur les têtes de cadre. A renouveler 3 semaines plus tard
	Apiguard®	2001	Déposer la barquette ouverte sur les cadres au centre. A renouveler 2 semaines plus tard
	Apilife Var®	2009	Diviser la plaquette en 4 morceaux et les disposer sur les cadres en coin de ruche. A renouveler chaque semaine pendant un mois.
Acide oxalique et huiles essentielles	Oxybee®	2018	Préparer la solution d'acide oxalique et d'huile essentielle puis à l'aide d'une seringue, déposer 5-6mL par intercadre, sur les abeilles. Ne pas répéter sur une même génération d'abeilles.
Acide oxalique	Apibioxal®	2015	2 méthodes : par dégouttement de sirop préparé avec de l'acide oxalique à l'aide d'une seringue OU par sublimation à l'aide d'un appareil à résistance électrique
Acide formique & oxalique	Varromed®	2017	Liquide à appliquer entre les cadres directement sur les abeilles. Répéter tous les 6 jours si nécessaire maximum 1 à 5 fois en fonction de la saison
Acide formique	MAQS®	2014	Déposer deux bandelettes sur le dessus des cadres pendant 7 jours. A renouveler une seconde fois si l'infestation est trop importante

6.2.b. Les acaricides autorisés en apiculture conventionnelle en France

En France, 5 médicaments disposant d'une AMM sont homologués pour le traitement de la varroose en apiculture conventionnelle (Tableau 3). Il n'existe que 3 substances actives utilisables en apiculture conventionnelle : l'amitraz, le tau-fluvalinate et la fluméthrine. Ces produits sont insérés dans la colonie sous forme de lanières. Les acaricides conventionnels présentés sous forme de lanières fonctionnent tous par contact. Leur utilisation est plus facile d'accès que les traitements utilisés en apiculture biologique (moins de manipulation et de renouvellement). Les traitements à base d'amitraz, tau-fluvalinate et fluméthrine vont laisser des traces de résidus dans les cires (Rosenkranz et al., 2010). Ces traitements sont des traitements de longue durée (supérieur à 6 semaines et pouvant aller jusqu'à 10 semaines) contrairement aux traitements en apiculture biologique qui sont plus court (maximum 4 semaines). On retrouve deux produits acaricides à base d'amitraz : Apivar® et Apitraz®. Un seul produit à base de tau-fluvalinate est autorisé en France, l'Apistan®. Concernant la fluméthrine, il existe deux produits autorisés : Polyvar Yellow® et Bayvarol®.

Tableau 3: Présentation des produits autorisés en apiculture conventionnelle en France

Substances actives	Produits	AMM	Application et durée de traitement	Composé chimique
Amitraze	Apivar®	1995	Insérer 2 lanières entre les cadres de couvain (10 semaines)	
	Apitraz®	2015	Insérer deux lanières entre les cadres de couvain (6 semaines)	
Tau-fluvalinate	Apistan®	1989	Insérer deux lanières entre les cadres de couvain (6 à 8 semaines)	
Fluméthrine	Bayvarol®	2017	4 lanières insérées proches du couvain (24h)	
	Polyvar Yellow®	2017	Plaquette à placer devant l'entrée de la ruche (9 semaines)	

6.2.c. Les traitements non-autorisés en France

Les acaricides utilisés sans Autorisation de Mise sur le Marché

Le nombre d'apiculteurs utilisant des acaricides sans AMM en France est difficilement quantifiable. Souvent, le prix des traitements avec AMM est le facteur principal conduisant les apiculteurs à se fournir en substances actives acaricides initialement prévues pour d'autres usages, comme par exemple, l'acide oxalique. Outre le prix, la praticité de certains traitements avec AMM est remise en question par les apiculteurs.

Bien souvent, les apiculteurs fabriquent eux-mêmes leurs lanières imprégnées de substance acaricide. L'usage de ces traitements hors AMM soulève de nombreuses questions comme le dosage de substance acaricide, la durée de traitement, les résidus dans la colonie et la toxicité pour les abeilles.

Les autres substances actives et traitements utilisés dans le monde

Il existe un grand nombre de produits acaricides autorisés en apiculture. Ces produits diffèrent en fonction des autorisations dans les pays. Nous ne chercherons pas à les décrire de manière exhaustive. Cependant, le nombre de substances actives est relativement faible. En apiculture conventionnelle, il existe d'autres substances actives autorisées dans d'autres pays comme le **coumaphos** (Checkmite®, Asuntol®, Perizon®) (famille des organophosphorés), le **cymiazole** (Apitol®), le **brompropylat** (Folbex-Va Neu®). En fonction des pays, différents produits peuvent être autorisés avec la même substance active.

Des traitements à base d'extrait naturel sont également utilisés à l'étranger comme le **houblon** (Hopguard®) ou encore le tabac (DeGrandi-Hoffman et al., 2014, 2012). Les acides organiques sont également très utilisés particulièrement pour les apiculteurs en apiculture biologique. Les **acides formique** et **oxalique** sont les plus répandus mais l'**acide lactique** est également utilisé. Concernant les huiles essentielles, le **thymol** est la molécule de synthèse la plus utilisée (Rosenkranz et al., 2010). Malgré la faible quantité de substances actives existantes, un grand nombre de médicaments utilisant la même substance active se font concurrence.

6.2.d. Les méthodes complémentaires

Les méthodes complémentaires sont utilisées pour réduire l'infestation de la colonie. Elles sont employées en complément d'un traitement chimique ou en saison pour réduire l'infestation d'une colonie. Elles présentent l'avantage de ne pas utiliser d'intrants dans la colonie. On distingue plusieurs méthodes complémentaires : 1) Les méthodes biotechniques (Figure 21), 2) La méthode thermique (Figure 22) et 3) la sélection d'abeilles tolérantes/résistantes au varroa.



Figure 21: Cadre à mâles utilisé pour la méthode du retrait de couvain de mâles

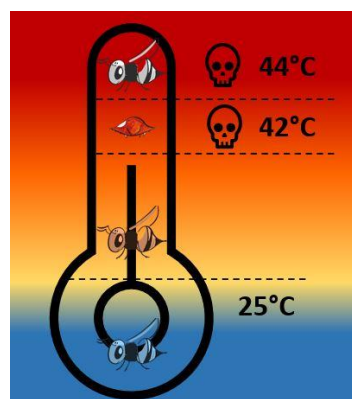


Figure 22: Tolérance des abeilles et des varroas aux variations de température utilisées dans le contrôle thermique

Les méthodes biotechniques

L'une d'entre elles, est le piégeage du varroa par le couvain de mâles, appelée « retrait de couvain de mâles ». En effet, ce dernier attire les varroas environ 11 fois plus que le couvain d'ouvrières (W. J. Boot et al., 1995). L'apiculteur intègre volontairement des cadres à mâles au printemps pour piéger les varroas de début de saison dans le couvain de mâles. Puis, avant émergence des mâles (et des varroas), l'apiculteur enlève le couvain de mâles des colonies. Cette méthode est répétée 3 fois d'avril à juin pour une meilleure efficacité. Elle permet de réduire l'infestation à court terme (Cahier technique, 2019; Charrière et al., 2003). En effet, les colonies devront être traitées en fin de saison. Néanmoins, plusieurs études ont mis en évidence que le retrait de couvain de mâles permettait une augmentation significative de la production de miel (Calderone, 2005; Delamarche, 2018). Un article de la Santé de l'Abeille a également été consacré à l'étude de la rentabilité de cette méthode. Elle conclut qu'avec l'augmentation de la production de miel et la cire récupérée, la méthode est rentable, compte tenu du temps passé par l'apiculteur (Delamarche, 2018).

La méthode de contrôle thermique

Cette méthode est assez récente. Elle consiste à tuer les varroas en utilisant la chaleur (Wolfgang, 2018). En effet, plusieurs études ont mis en évidence l'influence de la température sur le comportement du varroa (Le Conte et al., 1990; Le Conte and Arnold, 1987). Les cadres de couvain sans les abeilles sont placés dans une cuve et chauffés à 42°C pendant quelques minutes. Cette température tue les varroas mais épargne le couvain. Les cadres sont ensuite replacés dans la ruche. Un traitement à base d'acide oxalique devra être appliqué pour tuer les varroas qui étaient en phase « phorétique ». Cette méthode est une méthode complémentaire à l'usage d'acide oxalique qui évite un engorgement de reine ou la destruction du couvain (Conférence FNOSAD 2020).

Les abeilles tolérantes/résistantes au varroa

Certaines colonies d'abeilles survivent à Varroa sans traitement (Le Conte et al., 2020; Seeley, 2007). De nombreuses recherches sont réalisées sur ces abeilles depuis plusieurs années. Parmi elles, on dénombre plusieurs comportements qui expliqueraient cette tolérance/résistance aux varroas (Mondet et al., 2020). Le comportement d'épouillage, d'essaimage, d'hygiénisme, et de désoperculation font partie des comportements qui affectent le développement du varroa (Figure 23) (Büchler et al., 2010). Notamment, plusieurs études ont observé une réduction du succès reproducteur des varroas dans ces colonies (Mondet et al., 2020; Traynor et al., 2020). Néanmoins, certains de ces comportements ne sont pas adaptés à l'apiculture comme le comportement d'essaimage (Villa et al., 2008). Cependant d'autres comportements pourraient être sélectionnés pour que les abeilles limitent

par elles-mêmes l'infestation. Par ailleurs, le comportement de type VSH (Varroa Sensitive Hygienism) ne semble pas suffisamment héritable pour être sélectionné et est dépendant de l'environnement (Guichard et al., 2020). La sélection de comportements de tolérance et de résistance reste une piste de recherche intéressante qui limiterait l'usage de produit chimique dans les ruches (Blacqui re et al., 2019). La figure 23 présente l'ensemble des comportements de tolérance et de résistance des abeilles face au varroa.

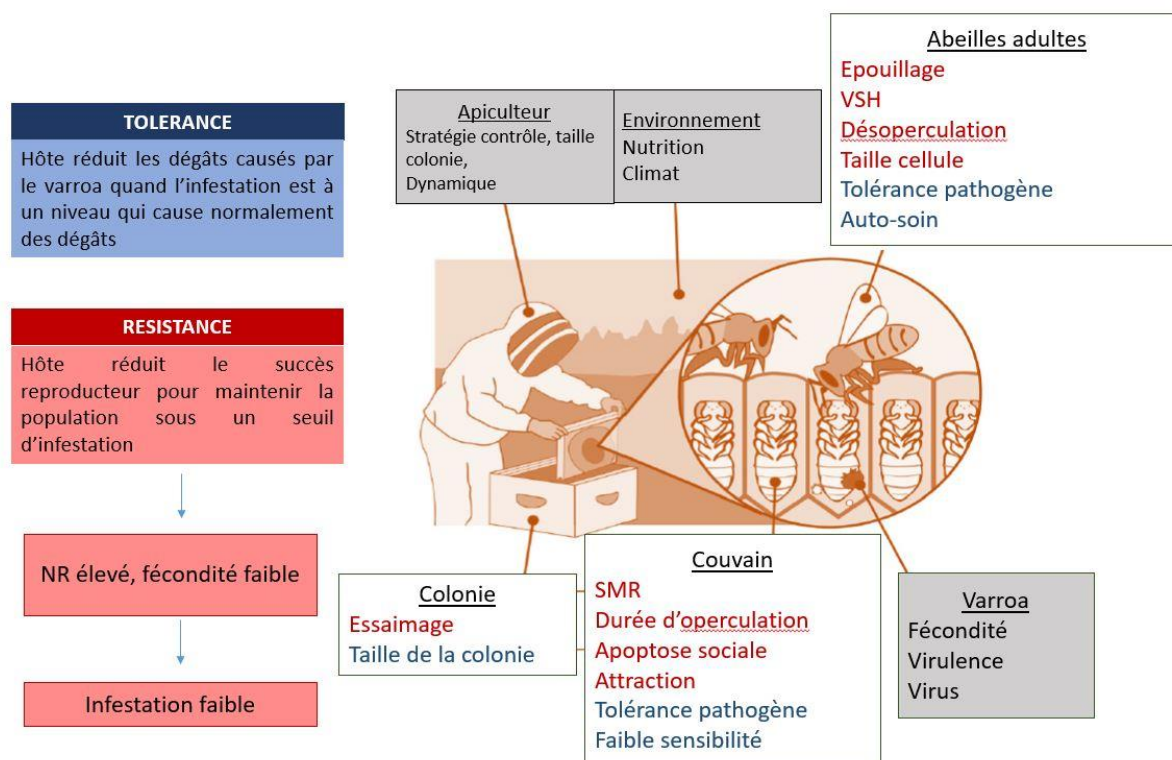


Figure 23: Schéma des comportements de résistance et tolérance des abeilles aux varroas (d'après Mondet et al. 2020)

6.3. Mode d'action des substances acaricides

La difficulté de traitement du varroa vient du fait qu'il passe un certain temps caché dans le couvain hors d'atteinte des acaricides (excepté l'acide formique). L'influence de la substance acaricide sur le varroa varie en fonction de son mode d'action. Certains modes d'action sont plutôt connus (acaricides conventionnels) alors que le mode d'action de l'acide oxalique n'a pas encore été élucidé. Certains acaricides sont dits monocibles (une seule action sur l'organisme) alors que d'autres sont pluri-cibles (plusieurs actions sur l'organisme).

6.3.a. Les substances acaricides biologiques

Les substances acaricides utilisées en apiculture biologique fonctionnent grâce à l'environnement confiné qu'offre la ruche, notamment pour l'évaporation et la sublimation/fumigation. **L'acide oxalique** est retrouvé à l'état naturel dans les feuilles et racines de certaines plantes (ÇALIŞKAN, 2000; Prasad and Shivay, 2017) ainsi que dans le miel (3.3-761.5mg/kg) (Nanetti et al., 2003). Substance active la plus utilisée en apiculture biologique en France, son mode d'action est aujourd'hui inconnu. De nombreuses pistes sont évoquées mais aucune n'est officiellement reconnue par les scientifiques. Chez les mammifères, l'acide oxalique entraîne un dysfonctionnement rénal et peut conduire dans certains cas à la mort de l'individu intoxiqué. Chez les insectes, quelques études ont montré l'impact d'acide oxalique dans l'environnement sur les fonctions de reproduction des insectes avec une baisse du succès reproducteur (Alverson, 2003). A forte dose, l'acide oxalique peut avoir un effet létal sur l'insecte ou l'acarien (Kirkland et al., 2005). L'application d'acide oxalique peut avoir des effets sublétaux sur les abeilles. En effet, bien que les abeilles métabolisent l'acide oxalique, une hyperacidité entraînerait des dommages des tissus épithéliaux et des organes (Rademacher et al., 2017). Pour l'efficacité contre le varroa, l'hyperacidité reste l'hypothèse principale (Nanetti, 1999; Rademacher and Harz, 2006).

Le mode d'action de **l'acide formique** semble mieux compris que celui de l'acide oxalique. Il agirait sur la chaîne respiratoire mitochondriale au niveau du complexe IV conduisant à une inhibition de la respiration (Nicholls, 1975; Peterson et al., 2017). Il aurait également un effet neurotoxiques (Song and Scharf, 2008). Il est le seul acaricide pouvant tuer les varroas présents dans le couvain.

Le **thymol** aurait plusieurs actions chez les insectes (Riva, 2017). 1) Il se fixe sur le récepteur de l'Acide γ -AminoButyrique (GABA) (Priestley et al., 2003; Tong and Coats, 2010), sur le récepteur de la tyramine (Enan, 2005) et sur les canaux cationiques Transient Receptor Potential (TRP) (Parnas et al., 2009). Néanmoins, le mode d'action spécifique sur Varroa n'a pas été démontré. Une fois dans la ruche et pour une température comprise entre 20 et 30°C, le thymol s'évapore et se propage dans l'ensemble de la colonie.

6.3.b. Les substances acaricides conventionnelles

Les acaricides conventionnels présentés dans le point précédent ne sont pas utilisés seulement en apiculture. Leur utilisation est souvent plus ancienne et destinée à d'autres acariens pathogènes de végétaux ou de bovins. Les substances acaricides utilisées en apiculture conventionnelle sont toutes des neurotoxiques (tau-fluvalinate, fluméthrine et amitraze). Les abeilles, en passant sur les lanières, transportent l'acaricide dans l'ensemble de la colonie.

Les pyréthrinoïdes sont très connus comme insecticides et acaricides depuis le début du XX^{ième} siècle. En effet, ils ont été synthétisés à partir de certains extraits de fleurs, les « pyrethrum flower » qui sont utilisés depuis 3 siècles pour leurs propriétés insecticides (Soderlund and Bloomquist, 1989). Le tau-fluvalinate et la fluméthrine (famille des pyréthrynoïdes de type II) agissent majoritairement sur les chaînes de canaux sodiques provoquant une paralysie puis la mort de l'acarien (Sparks and Nauen, 2015). A dose égale, le tau-fluvalinate est moins toxique que l'amitraze pour les abeilles mais il est capable d'interagir avec plus de biocides (comme les antibiotiques, herbicides et fongicides) (Johnson et al., 2013). Ce sont principalement les cytochromes P450 qui sont responsables de la forte tolérance des abeilles au tau-fluvalinate (Johnson et al., 2012, 2006).

L'amitraze est utilisé comme insecticide et acaricide depuis le milieu des années 70 dans les cultures mais aussi dans les élevages pour contrôler les tiques, les acariens et les poux (Gholamzadeh et al., 2012). L'amitraze se dégrade rapidement et forme plusieurs métabolites dont certains conservent les propriétés acaricides de l'amitraze. Les principaux métabolites sont : 2,4-dimethylpne nylformamide (DMPF) et le N-(2,4-dimethylphenyl)-N'-methylformamidine (DPMF). Ce sont également ces métabolites que l'on retrouve dans les cires (Korta et al., 2003). Son efficacité à large spectre est due à ses modes d'actions : 1) inhibition de l'oxydase monoamine et 2) une activation des récepteurs d'octopamine (Monteiro et al., 2019). Ce dernier mode d'action est celui responsable de la mort de *Varroa destructor*. De plus, les pesticides de la famille des formamidines engendrent une modification du comportement chez les insectes ou l'acarien, comme une altération du nourrissage ou de la reproduction pouvant conduire à des effets sublétaux (Monteiro et al., 2019).

7. Efficacité des acaricides

7.1. Evaluation de l'efficacité

Lors de l'autorisation de mise sur le marché, les traitements acaricides doivent obtenir un certain résultat d'efficacité sur le terrain et ne pas présenter de risque d'intoxication pour les abeilles, l'apiculteur et le consommateur. Pour les acaricides synthétiques conventionnels, l'efficacité doit être supérieure à 95%. Pour les acaricides utilisés en apiculture biologique, l'efficacité doit être supérieure à 90% (Wendling, 2014). Ces résultats ne sont malheureusement pas toujours obtenus (Gregorc et al., 2018; Loucif-ayad et al., 2010; Norain Sajid et al., 2019). L'efficacité du traitement est pourtant primordiale pour maintenir un taux d'infestation inférieur au seuil recommandé (voir § Evaluation du taux d'infestation) (Dooremalen et al., 2012). C'est pourquoi en France, la Fédération Nationale des Organismes Sanitaires Apicoles Départementales (FNOSAD) organise des suivis d'efficacité tous les ans sur plusieurs produits. Les résultats sont présentés annuellement dans la revue La Santé de l'Abeille.

Ces résultats ne sont pas représentatifs de l'efficacité du traitement moyen en France mais ils permettent de présenter une tendance de l'évolution de l'efficacité sur plusieurs années.

Le protocole officiel pour déterminer l'efficacité des traitements consiste à faire un comptage de chute des varroas morts sur langes graissés (voir § Evaluation de l'infestation), tous les 3 jours pendant le traitement (Figure 24). A la fin du traitement initial, un traitement dit de contrôle est appliqué avec une autre substance active pour faire tomber les derniers varroas ayant survécu au traitement d'origine. Ces derniers sont communément appelés varroas résiduels. Ils sont également comptés tous les 3 jours à l'aide de langes graissés. Le suivi d'efficacité peut être réalisé pour tout type de traitement par cette méthode. Le pourcentage d'efficacité du traitement est évalué par l'équation 2 (Figure 24). Cette méthode d'évaluation de l'efficacité du traitement permet d'obtenir plusieurs informations sur l'action du traitement sur la population. Elle évalue un **pourcentage d'efficacité** du traitement et le **nombre de varroas résiduels**. Le seuil de varroas résiduels à ne pas dépasser est de **50 varroas résiduels** en post-traitement. Ce seuil est utilisé par la FNOSAD, l'ITSAP (Institut Technique et Scientifique de l'Apiculture et la filière apicole) et les ADA (Association pour le Développement de l'Apiculture).

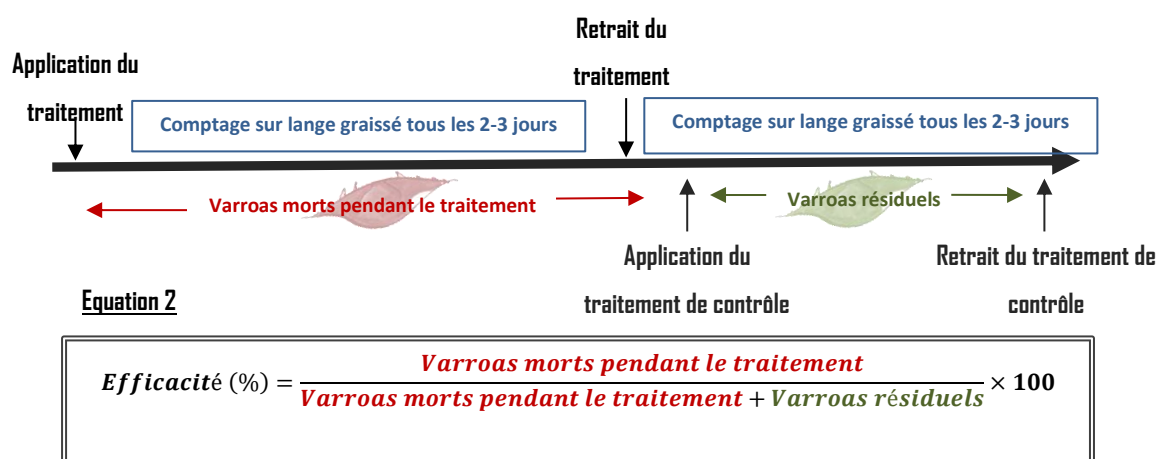


Figure 24: Protocole suivi sur le terrain pour évaluer l'efficacité d'un traitement

Ce protocole d'évaluation de l'efficacité est le plus fiable mais il est très chronophage, c'est pourquoi peu d'apiculteurs contrôlent l'efficacité de leur traitement par cette méthode. Généralement, les apiculteurs réalisent un contrôle en post-traitement (pourcentage de varroas phorétiques ou comptage sur lange). Cette méthode ne permet pas de conclure sur un pourcentage d'efficacité du traitement mais informe l'apiculteur de son taux d'infestation en post-traitement.

7.2. Variabilité et limites de l'évaluation de l'efficacité

Dans un environnement différent, les mêmes produits présentent des efficacités différentes. Par exemple, en Algérie, les traitements à base de thymol (Apiguard®) présentent une meilleure efficacité que les traitements à base d'amtiraze (Apivar®) (Loucif-ayad et al., 2010). En France, les tests réalisés sur des ruchers montrent une meilleure efficacité avec l'amtiraze qu'avec le thymol (Apiguard®) (Vallon et al., 2007). Plusieurs études ont mis en évidence ces variations d'efficacité et notamment, « l'effet rucher » sur l'efficacité des traitements (Gracia et al., 2017; Rademacher and Harz, 2006). De même, sur un même rucher, un produit présente des efficacités différentes entre les ruches (Vandame, 2018).

En plus d'une variation géographique, une variation temporelle peut être observée. D'une année sur l'autre et d'un rucher à l'autre un même traitement peut donc avoir une efficacité différente (Gracia et al. 2015, Hernandez-Rodriguez et al. 2020). L'évaluation de l'efficacité présente donc une **efficacité observée** dans un environnement donné qui n'est pas généralisable à toutes les ruches. En effet, la variabilité de l'efficacité des traitements peut provenir de nombreux paramètres :

- **L'application du traitement** (respect de la posologie) : une mauvaise application du traitement peut entraîner une mauvaise libération de l'acaricide ou une absence de contact avec les abeilles et les varroas (Wendling, 2014).
- **L'infestation initiale** : on estime que le nombre de varroas résiduels ne doit pas être supérieur à 50 après le traitement. Or ce nombre dépend de l'infestation initiale dans la colonie.
- **Quantité de couvain** disponible durant le traitement : le varroa dépend de la quantité de couvain pour se reproduire et échapper à l'acaricide. Les traitements hors couvain sont plus efficaces qu'en présence de couvain.
- **Réinfestation** (dérive, pillage...) : les échanges de varroas se font principalement lors de l'effondrement d'une colonie voisine. En période de traitement (fin de saison, août), la probabilité qu'une ruche s'effondre à cause de varroa est plus grande. Si une colonie en cours de traitement pille la colonie infestée en effondrement, la pilleuse va réinfester sa colonie (Peck and Seeley, 2019).
- **Conditions climatiques** : certains traitements ont besoin d'une certaine température et humidité pour fonctionner (thymol, acide oxalique, acide formique).
- **Résistance des acariens à la substance acaricide** : *Varroa destructor* comme de nombreux acariens est parfaitement adapté pour développer des résistances aux acaricides (Sparks and Nauen, 2015). Un développement de résistance entraînerait une baisse d'efficacité du traitement. Ce résultat peut remettre en question l'usage de la substance acaricide.

8. La résistance aux acaricides

8.1. Généralités sur les résistances

8.1.a. Les enjeux de la gestion des résistances en agriculture

Avec l'agriculture intensive, les dégâts liés aux ravageurs ont augmenté. Cela a poussé à l'augmentation de l'usage des pesticides. Dans les années qui ont suivi, les premières résistances ont été détectées et ne cessent d'augmenter (Sparks and Nauen, 2015) (Figure 25). En 2010, le coût de la résistance aux pesticides a été évalué à 1,5 milliard de dollars / an aux Etats-Unis. L'organisme, Insecticide Resistance Action Committee (IRAC) tente d'actualiser toutes les données concernant les modes d'actions et le type de résistance développés par les insectes et acariens contre les insecticides (Sparks and Nauen, 2015). L'ensemble des connaissances actuelles sur les résistances toutes espèces confondues est disponible sur le site : <https://www.pesticideresistance.org>.

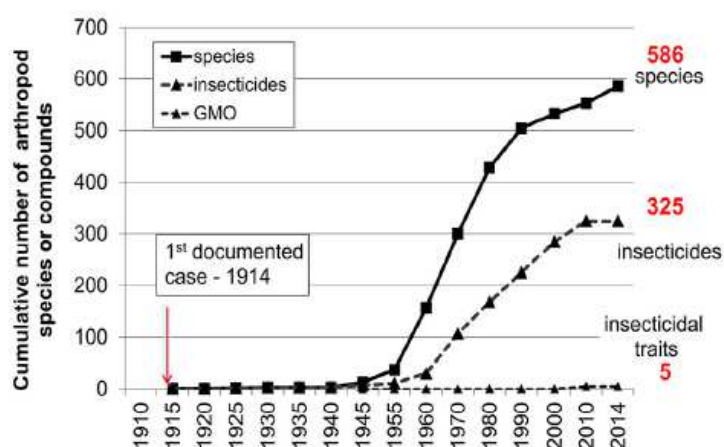


Figure 25: Représentation du nombre cumulé d'espèces développant des résistances et le nombre cumulé d'insecticides auxquels des résistances ont été établies (Sparks & Nauen, 2015).

Les acariens phytophages font partis des ravageurs qui sont de véritables fléaux pour les agriculteurs. En effet, des acaricides sont utilisés pour 74% des arbres fruitiers et représentent 7% du marché des insecticides soit 900 millions d'euros en 2013 (Van Leeuwen et al., 2015). Parmi ces acariens, on retrouve *Tetranychus urticae*, *Rhipicephalus (Boophilus) sp.* Ces acariens sont phylogénétiquement proches de *V. destructor* (Dam et al., 2019). Le développement de résistances chez ces acariens a conduit à une baisse d'efficacité de l'acaricide. En premier lieu, cela a conduit à une **augmentation de la quantité d'acaricide pour une efficacité plus faible** (Roush and McKenzie, 1987; Van Leeuwen et al., 2015, 2010).

8.1.b. Les différents types de résistances

La résistance peut être définie comme « une variabilité de la réponse à plusieurs agents agresseurs constituant une population résistante vraie, consécutive à la pression de sélection faisant suite à l'utilisation répétée d'une substance chimique » (Milaire, 1982). En effet, une population naturelle est constituée d'individus présentant naturellement une sensibilité plus ou moins élevée à un acaricide (selon une courbe de Gauss) (Figure 26). Les individus sensibles présentent une sensibilité à la substance acaricide concernée et seront tués en présence de ce dernier. Au contraire les individus résistants présentent des caractéristiques les rendant moins sensibles à la substance acaricide (jusqu'à une certaine dose). La pression de sélection exercée sur la population après usage d'acaricide décale la courbe de Gauss vers les individus les moins sensibles.

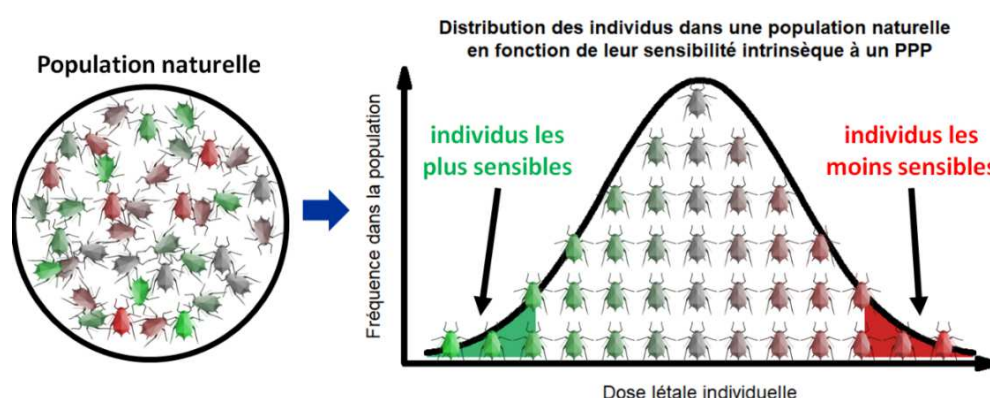


Figure 26 : Distribution naturelle des individus sensibles et résistants dans une population

Toute substance étrangère à l'organisme est nommée xénobiotique. Tous les xénobiotiques, qu'ils soient un polluant, un herbicide ou un acaricide présentent les mêmes étapes d'intoxication de l'organisme. Sur des individus sensibles, le xénobiotique 1) est absorbé par l'organisme, puis 2) peut être métabolisé (transformation en métabolites primaires voire secondaires souvent plus toxiques que le xénobiotique) et enfin 3) le xénobiotique ou ses métabolites vont agir sur la cible, impactant le fonctionnement de l'organisme de l'individu (Figure 27). Les organismes vivants développent des moyens de résistances pour limiter les intoxications. La résistance peut intervenir à différentes étapes de l'intoxication (Vanoosthuyse et al., 2018).

On note 4 types de résistances chez les insectes et acariens susceptibles de diminuer voire d'annuler l'efficacité d'un traitement (Liu et al., 2006; Onstad, 2013; Roush and McKenzie, 1987; Sparks and Nauen, 2015) (Figure 27). Le type de résistance dépend de l'espèce cible et de l'acaricide utilisé. En fonction des zones géographiques, le type de résistances développées par des individus d'une même espèce varient (González-Cabrera et al., 2016).

- **Résistance comportementale** : elle est associée à un comportement d'évitement de la part de l'insecte/acarien. Cependant, elle est principalement observée chez les insectes, et notamment les insectes volants pouvant se déplacer plus rapidement (Lockwood et al., 1984; Onstad et al., 2001). Aucune étude n'a montré à ce jour une résistance de type comportementale chez les acariens (Kolmes et al., 1990; Penman et al., 1988).
- **Résistance physiologique** : elle correspond à une modification de la physiologie de l'acarien, notamment les capacités d'absorption et d'excrétion sont différentes de celles des individus sensibles. Par exemple, cela peut être une mauvaise absorption de la substance active (Ruaux, 2013).
- **Résistance métabolique** : cette résistance implique une augmentation de la production d'enzymes détoxifiantes. Elles seront responsables d'exporter la substance xénobiotique ou ses métabolites à l'extérieur de l'organisme avant qu'elle n'atteigne sa cible. L'une des plus connues est la Cytochrome P450. La résistance métabolique est bien souvent polygénique (Onstad, 2013).
- **Résistance liée à une mutation de la cible** : elle peut être liée à un seul gène (monogénique) ou plusieurs gènes (polygénique) (Milaire, 1982; Roush and McKenzie, 1987). La mutation de la cible peut engendrer 1) une augmentation de la cible nécessitant une forte augmentation des xénobiotiques/métabolites pour entraîner un état léthal ou 2) une modification structurelle de la cible : le xénobiotique ou ses métabolites ne reconnaissent pas la cible. Les mutations de la cible peuvent se localiser sur des gènes différents en fonction des espèces ou d'individus différents appartenant à la même espèce (Van Leeuwen et al., 2010).

Il est possible que des individus présentent des résistances dites **multiples** ou encore **croisées**. C'est-à-dire que les individus peuvent résister à plusieurs substances actives acaricides différentes. Dans le cas de la résistance multiple, l'acarien a développé deux ou plusieurs résistances différentes (cela implique un coût de résistance faible). Dans le cas de la résistance croisée, l'acarien n'a développé qu'une résistance, cependant cette dernière lui permet de faire face à plusieurs substances actives. Une résistance de type métabolique avec augmentation des enzymes détoxifiantes peut conduire à des résistances croisées (Vanoosthuyse et al., 2018).

8.1.c. Facteurs de risques

Certains facteurs peuvent accentuer le risque de développer une résistance ou au contraire le limiter. Les traits d'histoire de vie des acariens les ont conduits à développer des résistances rapidement. Notamment, les acariens phytophages ont dû s'adapter aux métabolites secondaires (de défense) des plantes (Van Leeuwen et al., 2015). De nombreuses adaptations des acariens peuvent expliquer le

développement de résistances à une ou plusieurs substances acaricides. La gestion des risques de développement de résistances présente un enjeu agricole important (Sparks and Nauen, 2015). L'Organisation des Nations unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (FAO) les regroupe en trois facteurs (FAO, 2013) (Tableau 4) :

- **Facteurs biologiques** : ils correspondent à la biologie et l'écologie de l'organisme cible
- **Facteurs génétiques** : ils correspondent à la capacité de transmission à la génération suivante
- **Facteurs opérationnels** : ils correspondent aux conditions d'utilisation du traitement et à ses propres caractéristiques.

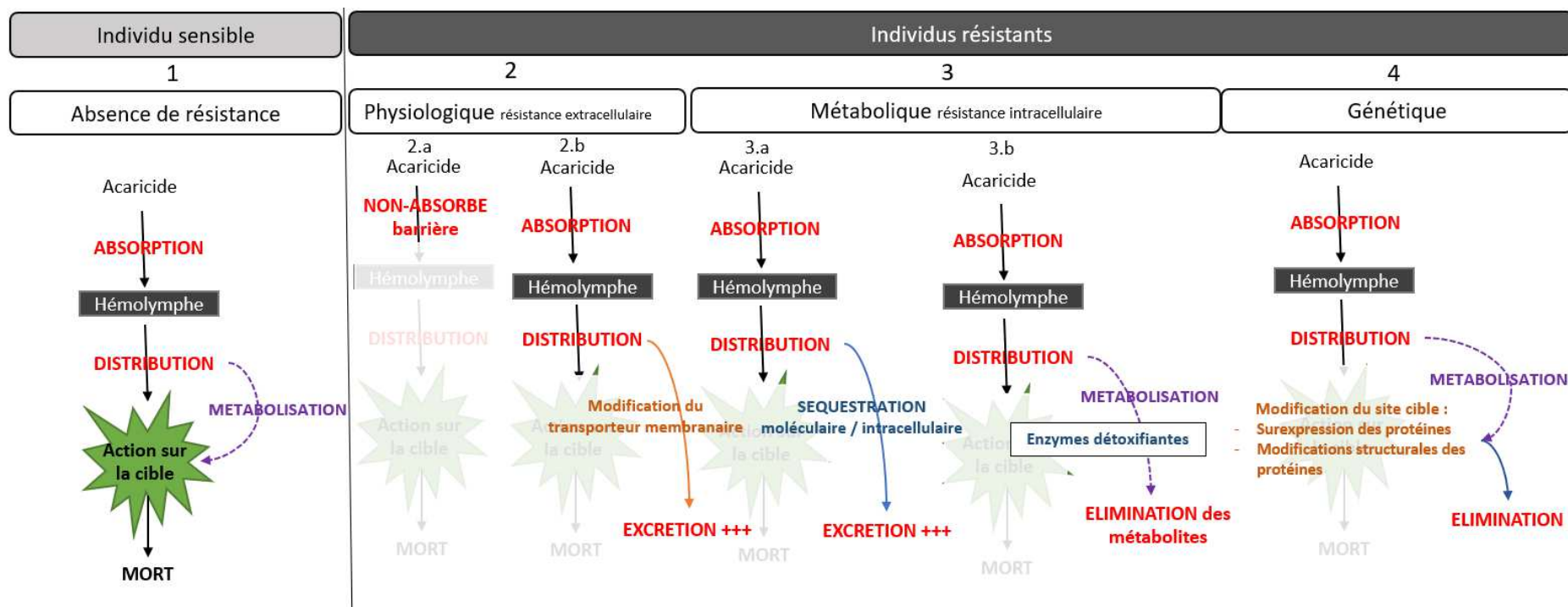


Figure 27 : Description des différents mécanismes de résistance non-comportementale (modifié d'après Vannosthuyse et al. 2018). Les individus sensibles ne présentent pas de mécanismes de résistance (1). Le xénobiotique pénètre dans l'organisme puis se métabolise (métabolites). Les métabolites seront distribués dans l'ensemble de l'organisme jusqu'à sa cible. Pour les individus présentant des résistances de type physiologique, le xénobiotique peut ne pas être absorbé par l'organisme grâce à un effet « barrière » (2.1). Le xénobiotique peut pénétrer dans l'organisme mais être excrété avant d'être distribué, notamment via la modification de transporteur membranaire (2.2). Dans le cas de la résistance métabolique (3), le xénobiotique pénètre dans l'organisme mais va être expulsé par des processus de séquestration (3.1) ou par des enzymes détoxifiantes (3.2). La dernière résistance de type génétique (4) s'exprime par une modification du site cible ou une surexpression de ce dernier. Les métabolites du xénobiotique se distribueront dans l'organisme mais ne parviendront pas à agir sur la cible. Un individu peut présenter plusieurs types de résistance et dans des proportions différentes. IL est assez commun qu'un individu résistant présente une résistance métabolique accompagnée d'une résistance de type mutation de la cible.

Tableau 4: Liste non-exhaustive des différents facteurs impliqués dans le développement de résistances aux pesticides d'après la FAO (FAO, 2013) et du Réseau de Réflexion et de Recherches sur les Résistances aux Pesticides (R4P) (<https://www.r4p-inra.fr/fr/mecani>)

Facteurs	Description	Impact sur la résistance
Facteurs biologiques		
Renouvellement générationnel entre chaque traitement	Elevé	↑
Nombre d'individus	Elevé	↑
Type de reproduction	Reproduction sexuée	↑ ↓
	Reproduction asexuée	↑
Dispersion	Elevée	↑
Mode d'action	Nombre de sites cibles du pesticide élevé	↓
Facteurs génétiques		
Apparition de gènes de résistance	Présente	↑
Nombre de mécanismes de résistance	Plusieurs	↑
Résistance croisée	Absente	↓
Fréquence/ Dominance des gènes de résistance	Elevée/Dominante	↑
	Basse/Récessif	↓
Facteurs opérationnels		
Fréquence d'utilisation	Elevée	↑
Spectre d'activité	Spectre Large (plusieurs ravageurs)	↑
Taux d'application (respect des doses)	Trop élevé ou Trop faible	↑
Stades de vie traités par le pesticide	Unique	↓
Persistance	De longue durée	↑
Nombre de cultures traitées	Plusieurs	↑
Stratégies de lutte ¹	Un seul composé utilisé	↑

¹ Certaines stratégies de lutte pour la gestion des résistances sont déjà mises en place en agriculture

8.2. Les résistances de *Varroa destructor* aux acaricides

Tout comme la majorité des acariens, *Varroa destructor* présente de nombreuses caractéristiques, telles que le nombre de génération par an et la consanguinité, qui en font une espèce apte à développer rapidement des résistances aux acaricides (Van Leeuwen et al., 2010). En effet, environ 5 années après une utilisation massive du traitement Apistan® (tau-fluvalinate), *Varroa destructor* a su s'adapter et développer des résistances diminuant l'efficacité des traitements (Faucon et al., 1995). Actuellement, des résistances ont été diagnostiquées pour la plupart des substances acaricides de type conventionnel : tau-fluvalinate, fluméthrine, coumaphos et amitraze (Kamler et al., 2016; Maggi et al., 2008; Milani, 1995). Aucune résistance n'a été trouvée à ce jour pour les substances acaricides utilisées en apiculture biologique. Une seule étude non-publiée en France a mis en évidence une résistance des varroas au thymol (Conférence donnée en 2008). Les résistances ont été diagnostiquées par des tests phénotypiques développés par Milani en 1995 (Dietemann et al., 2013; Milani, 1995). Puis, pour certaines d'entre elles, les origines des résistances ont été décrites, notamment pour le tau-fluvalinate (González-Cabrera et al., 2013; Millán-Leiva et al., 2021). La résistance à l'amitraze est beaucoup plus récente et bien moins documentée.

8.2.a. Résistances de *Varroa destructor* au coumaphos

Le coumaphos a eu une autorisation provisoire en France en 1987 avec le Perizin®. Pourtant dans d'autres pays voisins, le coumaphos est toujours autorisé sous le nom de traitement Checkmite®. La première résistance au coumaphos a été identifiée en 2000 en Italie (Spreafico et al., 2001). Puis d'autres études ont mis en évidence des résistances au coumaphos en Argentine (Maggi et al., 2009), en Uruguay (Maggi et al., 2011) ou encore aux Etats-Unis (Elzen and Westervelt, 2002; Pettis, 2004). Le développement de résistance au coumaphos semble entraîner des niveaux de résistance très élevée. En Uruguay, la concentration en coumaphos doit être multipliée plus de 800 fois pour tuer le même pourcentage d'une population résistante que d'une population sensible (Maggi et al., 2011). Concernant l'origine de la résistance au coumaphos, des études décrivent des résistances de type métabolique avec une augmentation du nombre d'enzymes détoxifiantes comme des estérases (Sammataro et al., 2005). D'autres études ont décrit des résistances métaboliques d'acariens au coumaphos (Li et al., 2003). En Espagne, l'annonce de résistances chez varroa au coumaphos par le laboratoire pharmaceutique a entraîné une baisse significative de l'utilisation de Checkmite® (Hernández-Rodríguez et al., 2021). La perte de la résistance par *Varroa destructor* n'a pas été encore établie (Mitton et al., 2018).

8.2.b. Résistance de *Varroa destructor* aux pyréthriinoïdes (tau-fluvalinate)

Cette grande famille d'insecticides est utilisée dans la lutte de nombreux ravageurs en agriculture et notamment dans la lutte contre les moustiques (Nkya et al., 2013; Ranson et al., 2011). La résistance aux pyréthriinoïdes est fréquente dans le monde animal (Dong et al., 2014). En France, le tau-fluvalinate a été utilisé *via* le Klartan® puis avec le traitement avec AMM, Apistan® (Fig.a1). La première résistance a été détectée en laboratoire en Italie en 1995 (Milani, 1995). L'utilisation massive de tau-fluvalinate a conduit en quelques années à l'apparition de foyers de résistances de *Varroa* au tau-fluvalinate (Trouiller, 1998). En parallèle, une diminution importante de l'efficacité des traitements est observée sur le terrain (Faucon et al., 1995; Floris et al., 2001). En quelques années, les foyers de résistances sont observés de manière hétérogène en Europe (Floris et al., 2001; Gracia-Salinas et al., 2006; Lipinski et al., 2007; Thompson et al., 2002), aux Etats-Unis (Patti J. Elzen et al., 1999b), en Amérique du Sud (Maggi et al., 2008) et au Moyen Orient (Mozes-Koch et al., 2000). En France, une étude a mis en évidence plusieurs populations de varroas résistantes au tau-fluvalinate (Trouiller, 1998) (Figure 28).

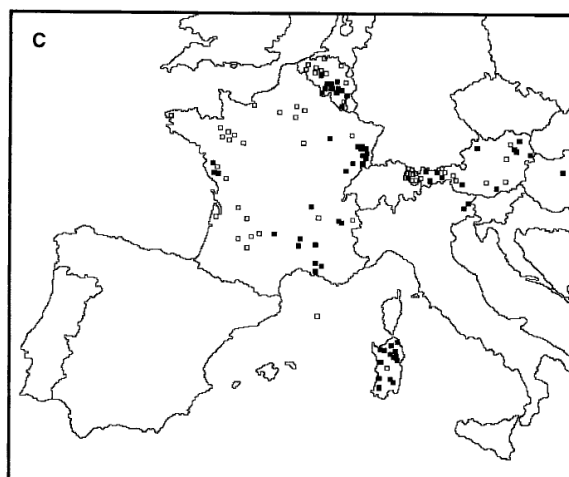


Figure 28 : Cartographie des populations de *Varroa destructor* résistantes au tau-fluvalinate en 1998 (Trouiller, 1998). Les carrés noirs représentent des populations de varroas résistantes. Les carrés blancs représentent des varroas sensibles.

L'origine de la résistance des varroas au tau-fluvalinate a été étudiée dans les années qui ont suivi la découverte des résistances. Les premières études sur la résistance au tau-fluvalinate ont mis en évidence une résistance de type métabolique impliquant notamment des estérases, monooxygénases et les cytochrome P450 (Hillesheim et al., 1996; Martin, 2004; Sammataro et al., 2005). Dans un second temps, une équipe de chercheurs a travaillé sur des résistances de type mutation de la cible. Ils ont découvert plusieurs mutations responsables d'une modification des canaux sodiques de type II (cible du tau-fluvalinate) (González-Cabrera et al., 2013; Wang et al., 2002). Plus précisément, il s'agit de mutations concernant le lieu de fixation du fluvalinate sur l'hélice transmembranaire S5 du domaine

Il de sous unité α . Ces mutations diffèrent en fonction de la zone géographique des varroas (González-Cabrera et al., 2016). Cela implique que plusieurs mutations se sont développées en parallèle. En Europe, la mutation la plus commune est la L925V (González-Cabrera et al., 2018). L'utilisation de cette mutation par d'autres laboratoires d'analyses a permis de décrire plusieurs populations de varroas résistantes au tau-fluvalinate (Mitton et al., 2021; Stara et al., 2019). Une étude récente aux Etats-Unis a testé la présence de mutations L925I et L925M sur un grand nombre de populations de varroas (Millán-Leiva et al., 2021) (Figure 29). Dans certains endroits du monde, les populations de varroas ne présentent pas la résistance L925V comme c'est le cas en Israël (Farjamfar et al., 2018). Les recherches sur l'implication d'enzymes détoxifiantes dans la résistance aux pyréthriinoïdes continuent (Dmitryjuk et al., 2014; Johnson et al., 2010). Aucune résistance croisée n'a encore été mise en évidence avec le tau-fluvalinate et d'autres substances acaricides chez *Varroa destructor*.

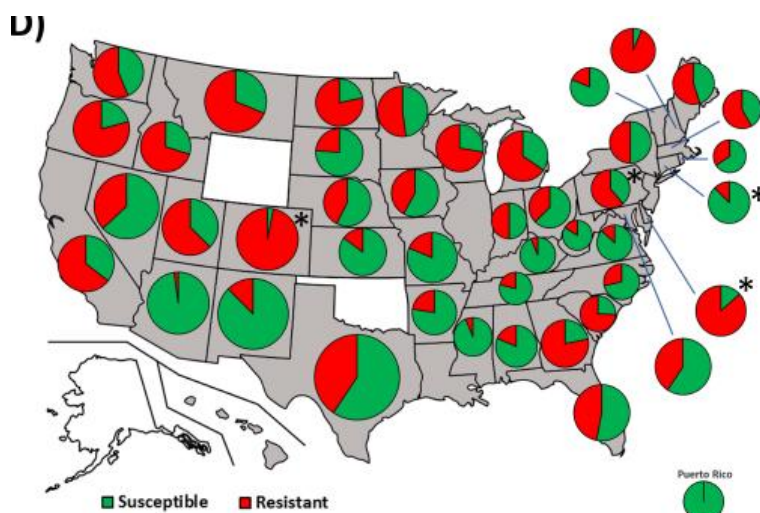


Figure 29: Cartographie des phénotypes sensibles ou résistants au tau-fluvalinate en 2017 avec l'utilisation de tests moléculaires (Milan-Leideva et al, 2020)

Dans la lutte contre les résistances, certaines études évoquent un coût physiologique pour l'individu résistant pouvant réduire son succès reproducteur (Higginson et al., 2005). Néanmoins, le coût physiologique lié à une résistance n'est pas généralisable à tous les cas : il dépend de l'espèce cible et du pesticide (French-Constant and Bass, 2017). Certaines espèces ont montré des pertes de résistances après plusieurs années sans contact avec une substance insecticide ((Melo-Santos et al., 2010; Sial and Brunner, 2012)). Cette période nécessaire pour passer d'une population résistante à une population sensible est appelée **période de réversion**. Concernant *Varroa destructor*, en Italie, une équipe a mis en évidence que la période de réversion du varroa était de cinq ans pour le tau-fluvalinate (Milani and Vedova, 2002). En Espagne, certaines populations perdent la mutation lorsque le traitement à l'Apistan® est discontinu d'année en année (González-Cabrera et al., 2018). Une étude plus récente a mis en évidence qu'après plusieurs années sans utilisation de tau-fluvalinate, la

fréquence de varroas résistants homozygotes (RR) avait fortement diminué (Panini et al., 2019). La résistance au tau-fluvalinate se développe assez rapidement mais la perte de la résistance a été également observée plusieurs fois (Elzen and Westervelt, 2004; Milani and Vedova, 2002; Panini et al., 2019). Cette information laisse la possibilité de mettre en place des stratégies de lutte pour la gestion des résistances dans le monde agricole (Sudo et al., 2018; Tang and Chen, 2004).

8.2.c. Résistance de *Varroa destructor* à l' amitraze

A la suite de la découverte de la résistance au tau-fluvalinate, l' amitraze est devenue l'une des substances actives les plus utilisées dans le monde. En France, les traitements autorisés sont l' Apivar® et l' Apitraz®. Pourtant, la première résistance à l' amitraze a été découverte en 1999 aux Etats-Unis (Elzen et al., 1999a). En France, une première étude a montré une diminution de l' efficacité d' Apivar® en laboratoire par l' évaluation de temps d' exposition nécessaire pour tuer les varroas (Mathieu and Faucon, 2000). Depuis, plusieurs études ont mis en évidence la résistance du varroa à l' amitraze (Kamler et al., 2016; Maggi et al., 2011, 2008; Rodríguez-Dehaibes et al., 2005). Malgré ces observations en laboratoire, aucune baisse d' efficacité des traitements à base d' amitraze n' a été mise en évidence sur le terrain pendant des années. Il a fallu attendre une vingtaine d' années avant qu' une première étude montre des pertes d' efficacité des traitements à base d' amitraze sur le terrain en Algérie (Adjlane, 2017). En 2018 et 2019, en France, les suivis d' efficacité réalisés par la FNOSAD ont mis en évidence les premiers échecs de traitement avec les traitements Apivar® et Apitraz® (efficacité moyenne de 90% sur les ruchers) (Figure 30). La même observation a été faite pour l' efficacité d' Apivar® en 2018 (Vandame, 2018). Cependant aucune relation entre ces baisses d' efficacité et la présence de résistance n' a été mise en évidence. Très récemment, un chercheur a publié la relation entre le ratio de résistance des varroas à l' amitraze observé en laboratoire et les pourcentages d' efficacité (obtenu par la méthode Pettis) (Rinkevich, 2020) (Figure 31). Cependant, contrairement au tau-fluvalinate, les processus impliqués dans la résistance à l' amitraze sont inconnus chez *Varroa destructor*. Chez les autres acariens, bien que les résistances à l' amitraze aient également été détectées, très peu d' informations sont publiées concernant l' origine de cette résistance. Plusieurs mutations du récepteur de l' octopamine ont été découvertes chez *Rhiphicephalus* sp et pourraient expliquer la baisse d' efficacité des traitements (Baron et al., 2018; Chen et al., 2007; Corley et al., 2013). Des phénomènes de détoxification sont également soupçonnés par certaines équipes de recherche comme les monoamines oxydases (Jonsson and Hope, 2007; Sammataro et al., 2005).

Alors que l' amitraze est la substance active la plus utilisée en France, le développement de résistances risque de diminuer l' efficacité des traitements et d' impliquer la mise en place de stratégies de lutte pour gérer les résistances développées par le varroa.

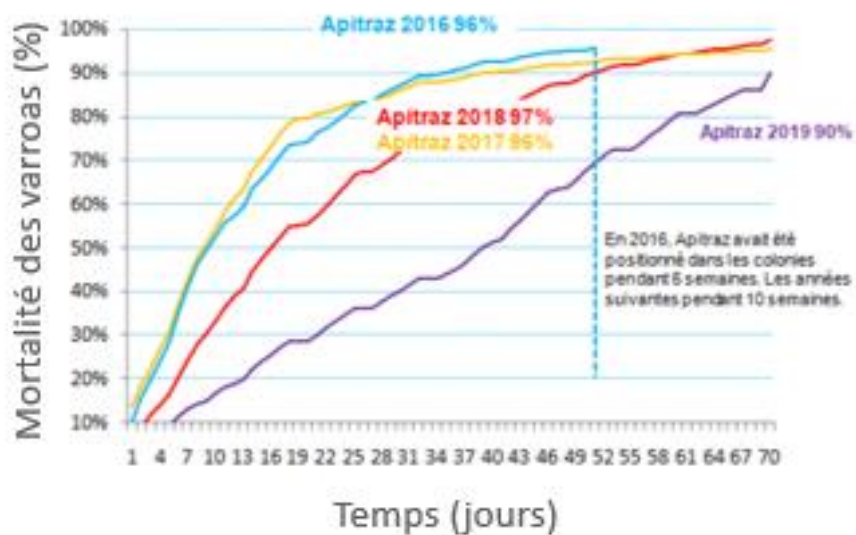


Figure 30: Représentation de la cinétique de chute des varroas (en pourcentage) au cours du traitement Apitraz. Evolution de 2016 à 2019 (La Santé de l'Abeille).

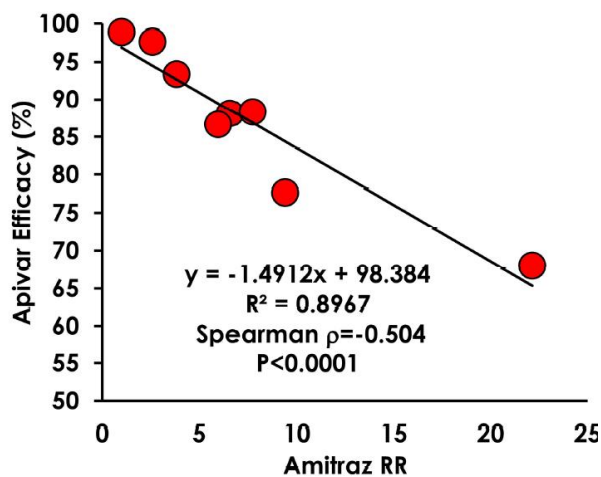


Figure 31: Relation entre le ratio de résistance à l'amitraz (RR) et l'efficacité du traitement réalisée avec le test de Pettis (Rinkevich. 2020)

Questions et objectifs de la thèse

L'arrivée de *Varroa destructor*, couplée à d'autres facteurs de risques, entraîne des conséquences négatives sur la survie des colonies d'abeilles. Les traitements acaricides ont permis pendant plusieurs années de contrôler l'infestation du varroa. Cependant, le développement de résistances des varroas à certaines substances acaricides a entraîné des baisses d'efficacité des traitements sur le terrain. Alors que la résistance au tau-fluvalinate est connue dans de nombreux pays depuis une vingtaine d'années, les études sur la résistance de varroa à l' amitraze sont moins répandues. En 2021, la gestion de *Varroa destructor* implique également la gestion des résistances aux acaricides. En France, les traitements acaricides concernés par des baisses d'efficacité sont l'Apistan® (tau-fluvalinate), l'Apivar® et l'Apitraz® (amitraze).

La piste de l'implication des résistances dans la baisse d'efficacité des traitements est très peu développée. En effet, l'absence de connaissance sur l'état de sensibilité/résistance des varroas au tau-fluvalinate et à l' amitraze en France ne permet pas de conclure sur son influence sur l'efficacité du traitement.

L'objectif de ce travail de thèse est de **détecter la présence de résistances chez varroa au tau-fluvalinate et à l' amitraze en France et de décrire les différents paramètres impliqués dans l'efficacité des traitements**. La suite de la thèse sera présentée en deux parties (incluant chacune deux chapitres) puis une discussion. La première partie portera sur la détection des résistances chez *Varroa destructor* alors que la seconde partie décrira l'influence de plusieurs paramètres, dont la résistance, sur l'efficacité des traitements.

Le chapitre 1 présentera la méthode choisie pour tester la sensibilité des varroas aux acaricides. Dans ce chapitre seront abordés les différentes méthodes utilisées pour évaluer la présence de résistances chez les insectes et acariens. Nous développerons pourquoi nous avons choisi une méthode plutôt qu'une autre et nous testerons la répétabilité et reproductibilité de cette dernière. Les méthodes de prélèvement et de collecte des varroas seront également discutées. Le chapitre 1 répondra aux questions suivantes :

- ✓ Quelle méthode d'évaluation de résistances est la plus adaptée à varroa ?
- ✓ Comment les varroas peuvent-ils être collectés ?
- ✓ A quelle(s) échelle(s) peut-on prélever les varroas ? Ruche, Rucher ?
- ✓ Comment classer les populations de varroas (sensibles -> résistantes) ?

Le chapitre 2 sera présenté sous forme d'article publié. Il présente l'application de la méthode décrite dans le chapitre 1 dans le but de réaliser un état des lieux des sensibilités/résistances des varroas au

tau-fluvalinate et à l'amitrazé en France. La relation entre l'état de sensibilité et l'historique de traitement des apiculteurs sera également abordée en fin de chapitre. Le chapitre 2 répondra aux questions suivantes :

- ✓ Quel est le niveau de sensibilité des populations de varroas en France à l'amitrazé et au tau fluvalinate ?
- ✓ Quel lien existe-t-il entre l'historique de traitement et la proportion de varroas résistants dans la population ?

Le chapitre 3 sera présenté sous forme d'article en cours de soumission. A l'aide d'un modèle de dynamique de population, nous évaluerons les différents paramètres impliqués dans l'efficacité du traitement. Nous développerons particulièrement l'influence de la proportion de varroas résistants dans la population sur l'efficacité du traitement. Ce chapitre a pour objectif d'améliorer la compréhension de l'action du traitement sur la population de varroas. Le chapitre 3 répondra aux questions suivantes :

- ✓ Quels paramètres peuvent influencer l'efficacité du traitement ?
- ✓ Quelle proportion de varroas résistants ne doit pas être dépassée pour conserver une bonne efficacité ?

Le chapitre 4 présenté également sous forme d'article (en préparation) compare l'action de deux traitements à base d'amitrazé mais aux galéniques différentes. Il mettra notamment en avant l'influence des caractéristiques propres à chaque traitement telles que la durée de traitement et la libération de la substance active. Ce chapitre développera l'importance du choix de la galénique du traitement acaricide en plus du choix de la substance active. Le chapitre 4 répondra aux questions :

- ✓ Comment la durée du traitement influence l'efficacité du traitement ?
- ✓ Comment la libération de la substance active influence l'efficacité du traitement ?

Enfin, nous finirons par une discussion générale du travail réalisé. Nous développerons notamment comment la détection des résistances permettrait de faciliter la gestion des résistances chez Varroa. Les stratégies de lutte employées dans le monde agricole seront développées pour en proposer une adaptée à la biologie du varroa et à l'apiculteur. Les perspectives de recherches y seront également développées.

« Nous voyons l'abeille se poser sur toutes les plantes et tirer de chacune le meilleur »

Isocrate

Partie 1 : Résistances de *Varroa destructor* au
tau-fluvalinate et à l'amitraze

Chapitre 1 : Diagnostiquer les résistances, un outil dans la gestion des résistances de *Varroa destructor*

1. Introduction : la lutte contre les résistances, un enjeu agricole

L'utilisation de pesticides en agriculture moderne a bien souvent entraîné le développement de résistances chez les espèces cibles. Actuellement, la présence de résistances est un facteur clé dans la gestion des ravageurs (Onstad, 2013). Depuis les années 1940, le nombre d'espèces résistantes ne cesse d'augmenter (Sparks and Nauen, 2015; Van Leeuwen et al., 2015). De même, le nombre de composés insecticides auxquels les insectes présentent des résistances continue de croître (Sparks and Nauen, 2015). A la suite de l'augmentation des résistances des insectes, champignons et adventices aux pesticides, un comité d'action sur la résistance aux insecticides a été fondé : l'IRAC (Insecticide Resistance Action Committee). Son objectif est de répertorier les espèces résistantes aux pesticides, de les classer par type de résistance et d'améliorer les stratégies concernant la gestion des résistances dans les cultures.

La gestion des résistances nécessite des connaissances à la fois sur l'espèce cible concernée mais également sur le type de composé utilisé. En effet, certaines espèces sont réputées pour développer des résistances rapidement (Van Leeuwen et al., 2015). D'autre part, certains composés, par leur mode d'action, sont connus pour faciliter le développement de résistance chez les espèces cibles (FAO, 2013). Une étape indispensable dans la lutte contre les résistances est d'établir des moyens de détection des résistances (FAO, 2013). La détection de résistance peut être réalisée en laboratoire ou directement sur le terrain. Les méthodes de détection des résistances permettent d'établir la présence d'une baisse de sensibilité de l'espèce cible à certains composés avant même qu'elle ne soit observée sur le terrain (Brattsten et al., 1986).

« Une résistance peut être observée en laboratoire sans que ne surgissent des problèmes sur le terrain [...] mais l'apparition d'une résistance doit être détectée et affrontée au tout premier stade avant qu'un échec de lutte ne soit observé sur le terrain »(FAO, 2013).

Dans la lutte contre les résistances, nous pouvons citer, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) qui a développé un test pour établir la présence de résistances chez le moustique, *Aedes spp* (OMS, 1971-2018). En plus de détecter une résistance, certains tests permettent de déterminer le niveau et l'origine de la résistance. L'IRAC a recensé 160 tests de diagnostic de résistance toutes espèces

confondues. Toutes ces informations sont indispensables pour mettre en place une stratégie de lutte adaptée à une espèce cible.

1.1. Les méthodes pour diagnostiquer une résistance

Trois méthodes sont principalement utilisées pour détecter une résistance en fonction de l'espèce cible, de son stade de développement, du pesticide et de l'information recherchée (FAO, 2013) : les méthodes phénotypique (a), protéique (b) et génétique (c). Chacune de ces méthodes présente des intérêts, des limites et apportent des informations différentes sur la résistance, notamment, la proportion d'individus résistants dans une population et l'origine de la résistance. Pour chacune de ces méthodes, il est nécessaire de définir au préalable, une **population dite de référence**, sensible à la substance insecticide/acaricide, à laquelle sera comparée toute autre population.

1.1.a. Etude phénotypique

L'étude phénotypique se réalise à l'échelle d'une population. L'une des contraintes majeures de l'étude phénotypique est la nécessité de travailler sur des individus vivants. Trois grandes étapes doivent être suivies pour réaliser un test phénotypique :

- 1) Trouver une population sensible dite de référence. Population n'ayant pas été en contact avec la substance active depuis plusieurs années (ou dans l'idéal, jamais exposée).
- 2) Etablir une courbe complète dose-réponse (Figure 32) qui représente le taux de mortalité de la population en fonction de la concentration de la substance insecticide/acaricide. Les individus vivants sont mis en contact avec différentes concentrations de la substance active. Puis, le taux de mortalité est évalué par le rapport $[\text{morts}/(\text{morts}+\text{vivants})]$. Le résultat obtenu indique un pourcentage d'individus morts et donc un pourcentage d'individus sensibles à la concentration testée dans la population. Plus la concentration en substance active augmente, plus la mortalité dans la population augmente (Figure 32).
- 3) Comparer la population de référence avec d'autres populations.
 - a. Comparer à une **concentration discriminante** : après modélisation, une courbe de relation dose-réponse permet de déterminer une concentration létale qui tue X% de la population sensible pouvant être appelée CLX (ou ECX). Par exemple, une concentration qui tue 90% de la population sera appelé CL90. Cette dernière pourra être utilisée comme concentration discriminante. A cette même concentration, la mortalité de la population testée est donc comparée à la mortalité de la population de référence sensible. L'utilisation de concentration discriminante présente l'intérêt de nécessiter peu d'individus car une seule concentration est testée.

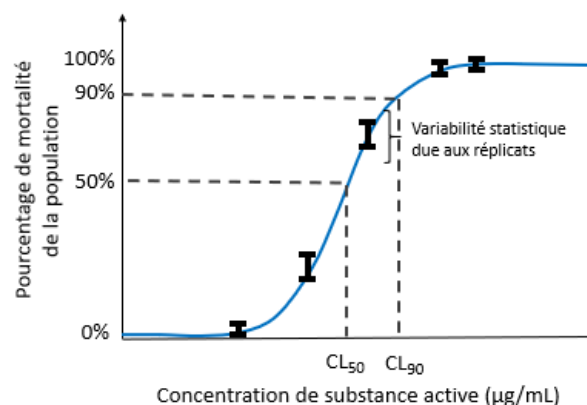


Figure 32: Courbe de relation dose-réponse utilisée en écotoxicologie. Les concentrations sont souvent transformées logarithmiquement. La CL50 correspond à la concentration qui tue 50% de la population sensible. La CL90 est la concentration qui tue 90% de la population sensible. Les CL90 ou CL99 sont souvent utilisées comme concentrations discriminantes. A la CL50, la variabilité des réplicats est plus importante.

- b. Comparer un **ratio de résistance (RR)** : l'utilisation du ratio de résistance permet de déterminer d'une part si une population est résistante mais également son niveau de résistance par rapport à une population sensible. Pour calculer ce ratio, un grand nombre d'individus est nécessaire car la totalité de la courbe doit être réalisée (soit minimum 5 concentrations) (Figure 33). Ce ratio de résistance s'évalue par le rapport de la CL50 de la population testée sur la CL50 de la population sensible (voir §2.4). Elle permet donc d'évaluer par combien doit être multipliée la concentration de substance active pour obtenir une mortalité comparable entre deux populations à la sensibilité différente (Figure 33).

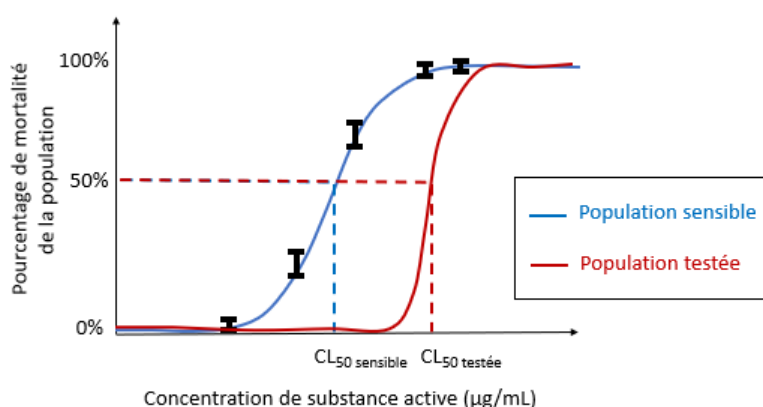


Figure 33: Comparaison de la CL50 d'une population sensible et d'une population testée permettant d'établir un ratio de résistance entre les deux populations.

1.1.b. Etude protéique

L'étude protéique nécessite des individus vivants ou conservés avec soin à très basse température. Elle permet de déterminer les différences de synthèse protéique entre des individus sensibles et résistants. Par exemple, il est possible de comparer la quantité de cytochrome P45, ou de monooxygénases

impliquées dans la détoxification entre deux individus sensible et résistant. Ce type de test permet de mettre en évidence les **résistances de type métabolique (§ Introduction)**. Une étude protéique apporte une information sur l'une des origines de la résistance. Avec une étude protéique, le mécanisme de résistance est évalué au niveau de l'individu. Grâce à cette méthode, il est possible de déterminer si un individu est plus résistant qu'un autre individu en comparant la quantité d'enzymes détoxifiantes.

1.1.c. Etude génétique ou moléculaire

Le prérequis pour réaliser des études génétiques est le séquençage de l'ADN de l'espèce étudiée. Les tests génétiques sont réalisés sur des individus morts. Lorsque le séquençage d'individus sensibles a été réalisé, une comparaison du séquençage est réalisée sur d'autres individus. Lorsqu'une ou plusieurs mutations sont à l'origine d'une résistance, il est possible de les détecter grâce à des marqueurs génétiques. De manière générale, les individus sont répartis en 3 groupes en fonction des allèles présentant les mutations : les individus sensibles sont homozygote sauvages (SS), les individus hétérozygotes (RS) (un allèle portant la mutation (résistant) et un allèle sauvage (sensible)), et les individus homozygotes résistants (RR). Cette méthode permet de révéler une **résistance de type mutation de la cible** (voir § Introduction). Comme nous l'avons vu, différentes mutations peuvent être responsables d'une modification de la cible (Van Leeuwen et al., 2010).

1.1.d. Comparaison des trois méthodes d'évaluation de résistance

L'utilisation de tests phénotypiques permet de déterminer la sensibilité moyenne d'une population à une substance insecticide/acaricide sans faire de distinction entre l'origine des résistances impliquées. Comme nous l'avons vu, généralement, plusieurs résistances peuvent être impliquées dans la diminution de sensibilité des individus à une substance. Le test phénotypique peut être vu comme un test préalable au tests protéique ou génétique puisqu'il permet de valider la présence de varroas résistants dans une population. Les études protéique et moléculaire sont indispensables pour déterminer l'origine de la résistance. Chacune de ces trois méthodes d'évaluation de résistance présente des informations et des limites différentes (Tableau 5).

Tableau 5: Description et comparaison des différents tests d'évaluation de résistance, leurs contraintes et limites

Type de test	Echelle	Résultats	Contraintes	Limites
Phénotypique	Population	Proportion d'individus résistants	Nécessite des individus vivants et nombreux	Absence d'information sur l'origine de la résistance
Protéique	Individu	Quantité d'enzymes détoxifiantes	Conservation des individus Matériel adéquat	Validation uniquement de la

					présence de résistance métabolique
Moléculaire	Individu	Mutations génétiques concernant cible	Séquençage l'espèce la Matériel adéquat	de Validation	uniquement de la présence de résistance de type génétique

1.2. Le cas de la détection de la résistance chez le moustique par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS)

Dans la lutte contre le moustique, l'OMS a mis en place un protocole complet recoupant différentes méthodes de détection des résistances (Figure 34). Ce protocole permet d'obtenir la proportion d'individus résistants, le niveau de résistance et son origine. Avec ces informations, les stratégies de lutte peuvent être adaptées pour améliorer l'efficacité des traitements et limiter le développement d'une résistance déjà présente. Elle propose 3 étapes pour étudier la résistance des moustiques.

1/ Déterminer le phénotype résistant : L'OMS recommande l'utilisation de concentration discriminante pour établir la présence de moustiques résistants dans la population. La concentration discriminante par l'OMS est deux fois la CL100. Cela implique que les individus survivants à cette concentration discriminante sont des individus présentant une forte résistance (ratio de résistance élevé).

2/ Déterminer l'intensité de résistance : une fois la présence d'individus résistants validée, il est intéressant d'évaluer le niveau de résistance de ces individus à l'insecticide. Cette étape permet notamment d'apporter une information importante pour le choix de la stratégie de lutte à adopter, notamment si une population présente des résistances croisées et qu'un choix doit être fait entre plusieurs insecticides. Cette évaluation de l'intensité de résistance est réalisée sur de nouveaux individus de la même population testés à la concentration discriminante x2 ou x5 ou X10.

3/ Déterminer l'origine de la résistance : en parallèle, des tests sur l'origine de la résistance peuvent être réalisés sur les moustiques survivants à la concentration discriminante. Un test protéique ou moléculaire est alors réalisé pour détecter la ou les origines de la résistance.

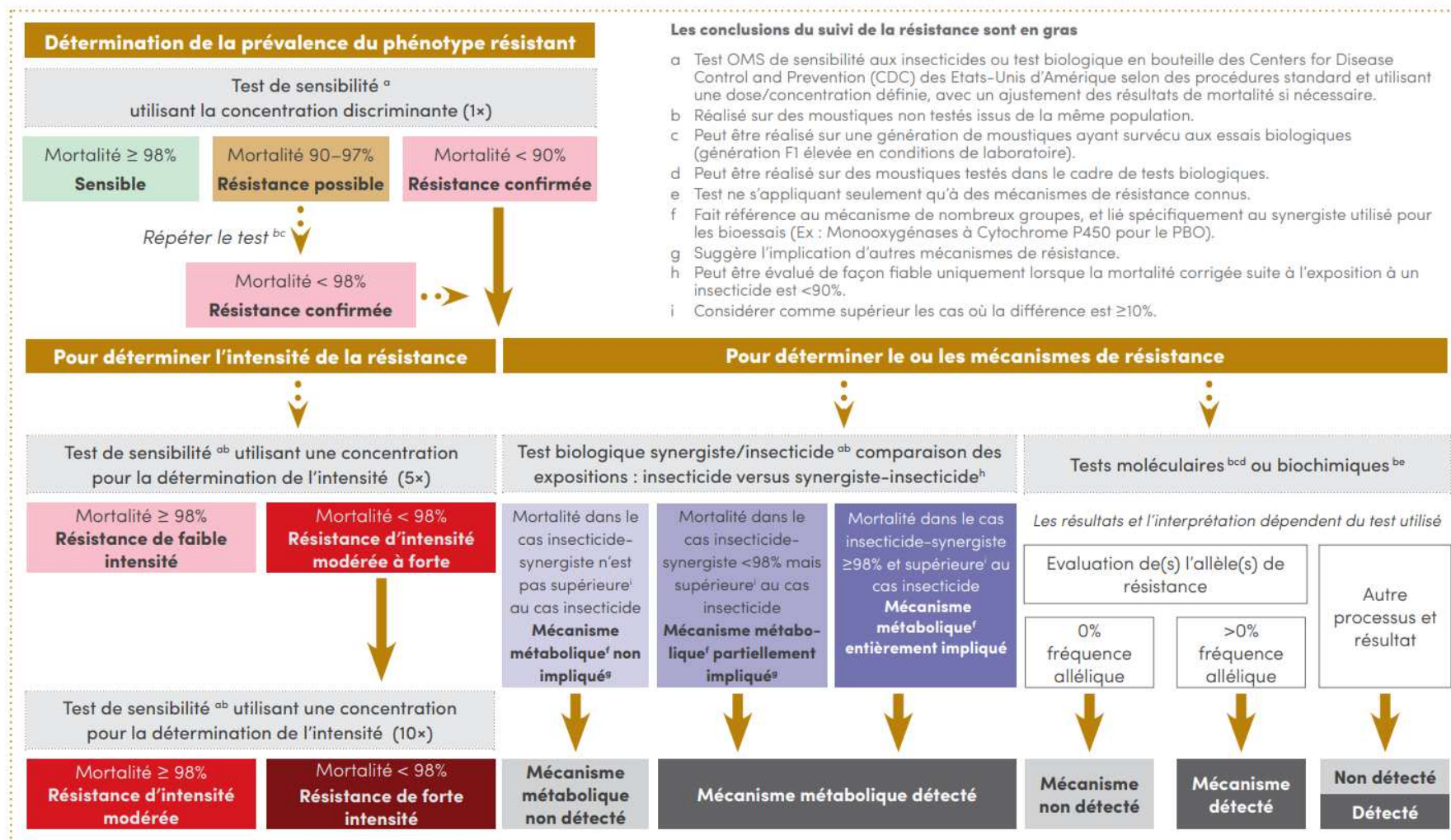


Figure 34: Synthèse du protocole suivi par l'OMS dans la lutte contre le moustique (OMS. 2018). La première étape est la détermination d'une population présentant des individus résistants. La deuxième étape est de définir le niveau de résistance de ces individus en multipliant la concentration discriminante. La dernière étape de réaliser des tests protéique et moléculaire pour déterminer l'origine de la résistance.

1.3. Détection des résistances chez *V. destructor*

La présence de résistances aux acaricides chez *Varroa destructor* est étudiée depuis 1995 (Milani, 1995). Comme la plupart des acariens, il a su développer des résistances à la plupart des composés utilisés (Van Leeuwen et al., 2015). La lutte contre *Varroa destructor* implique une connaissance sur l'état de résistance aux différentes substances acaricides en fonction des différents pays. La plupart des études ont été réalisées sur les substances acaricides de type conventionnel : tau-fluvalinate, fluméthrine, coumaphos et amitraze. Le tau-fluvalinate est la substance qui a été la plus étudiée et dont les hypothèses d'origine de résistance sont les plus complètes (tests protéique et moléculaire). Concernant les tests phénotypiques, bien que le Beebook décrive une méthode standard pour déterminer la présence de résistances aux acaricides (Milani, 1995, Dietemann et al. 2013), les méthodes entre les différentes publications présentent des variantes. Ces variantes rendent parfois la comparaison de résultats impossible. Ces variantes concernent 1) la méthode de collecte, 2) le matériel de mise en contact, 3) la pureté de la substance acaricide et 4) la durée de contact.

Premièrement, certains tests sont réalisés sur des varroas phorétiques et d'autres sur des varroas dans le couvain (Trouiller. 1998, Rodriguez-Dehaibes et al. 2005, Kamler et al., 2016). La collecte des varroas phorétiques est réalisée avec du CO₂ (Perez-Santiago et al. 2000) ou du sucre glace (Rinkevich., 2020). Deuxièmement, le matériel de contact avec l'acaricide varie en fonction des études : tube Eppendorf (Kamler et al., 2016, Rinkevich., 2020), boîte de Petri de 3 cm (Bonafos et al., 2018) ou 9 cm de diamètre (Maggi et al. 2008). Troisièmement, l'acaricide utilisé peut être la substance acaricide pure (Kamler et al., 2016, Rinkevich., 2020) ou des formulations commercialisées comme le Taktik® pour l'amitraze ou le Klartan® pour le tau-fluvalinate (Santiago et al., 2000). Enfin, la durée de contact diffère en fonction des protocoles suivis. La durée de contact avec l'acaricide varie de cinq minutes (Bonafos et al., 2008) à une heure (Milani. 1995, Trouiller. 1998, Maggi et al., 2008).

De plus, l'échelle de collecte des varroas est rarement définie : un cadre de couvain, sur plusieurs cadres, plusieurs ruches, plusieurs ruchers. Dans la plupart des études sur l'évaluation de la résistance, la collecte des varroas est réalisée sur plusieurs ruches d'un même rucher (Elzen et al., 2000; Maggi et al., 2010; Rinkevich, 2020; Rodríguez-Dehaibes et al., 2005; Trouiller, 1998). Dans certains cas, l'information concernant la méthode de collecte n'est pas précisée (Kamler et al. 2016).

Par ailleurs, la répétabilité et la reproductibilité de ces tests n'ont jamais été évaluées. De même, les limites d'interprétation de ces tests sont très peu discutées et pourtant indispensables pour conclure sur la présence de résistances. De plus, l'influence de l'échelle de collecte des varroas n'a jamais été étudiée, pourtant celle-ci pourrait entraîner des interprétations différentes.

Nous chercherons donc à évaluer les limites du test phénotypique pour à terme améliorer l'interprétation des résultats concernant la résistance au tau-fluvalinate et à l'amitraze. Les objectifs de ce chapitre sont de 1) Décrire le choix de la méthode utilisée pour déterminer la sensibilité des varroas aux acaricides, 2) Evaluer la répétabilité de la méthode 3) Evaluer l'impact des échelles de collecte des varroas (reproductibilité) et 4) Proposer un protocole complet de diagnostic phénotypique d'une résistance chez *Varroa destructor*.

2. Evaluation de la sensibilité des varroas aux acaricides par un test phénotypique

Comme cela a été précédemment décrit, de nombreuses méthodes existent pour détecter une résistance chez *Varroa destructor*. Parmi ces méthodes, la méthode de Maggi et ses collaborateurs de 2008 a été choisie. Cette méthode présentait l'avantage de ne pas nécessiter de matériel particulier hormis des boîtes de Petri et une hotte aspirante. L'utilisation de boîte de Petri a été préférée au tube Eppendorf pour simplifier la manipulation des varroas. La méthode suivie est décrite dans le Tableau 6. Les étapes du test phénotypique reproduisent celles décrites dans la partie 1.1.a. Pour valider la méthode de Maggi et al. 2008, plusieurs tests complémentaires ont été réalisés dont 1) le choix de la méthode de collecte (varroas phorétiques ou dans le couvain) 2) l'échelle de collecte des varroas (reproductibilité du test) et 3) la répétabilité de la méthode.

2.1. Choix de la méthode de collecte

L'évaluation de la sensibilité des varroas se réalise sur les fondatrices matures (Milani. 1995). La méthode de collecte des varroas peut varier en fonction des études. Certains auteurs prélèvent les varroas directement dans le couvain (1), d'autres prélèvent les varroas phorétiques sur les abeilles adultes à l'aide de CO₂ (2) ou de sucre glace (3). En juillet 2019, dans un rucher de 28 colonies, les varroas sont prélevés sur 5 colonies selon les 3 méthodes de collecte différentes. Les varroas sont ensuite transférés et placés dans des boîtes de Petri avec 3 nymphes pour se nourrir et répartis selon la méthode de collecte (couvain, phorétique au CO₂ ou sucre glace). Entre 10 et 16 réplicats sont réalisés par méthode de collecte. Un réplicat correspond à une boîte de Petri contenant 15 varroas. L'ensemble des boîtes de Pétri sont conservées avec les varroas dans une étuve (30±0.5°C et Humidité 60±10%). La mortalité naturelle des varroas est contrôlée 24h après la collecte. Les taux de mortalité naturelle sont comparés entre les 3 méthodes de collecte par un test de Wilcoxon sur le logiciel RStudio. Ce protocole permet de comparer l'influence de la méthode de collecte sur la mortalité naturelle des varroas.

2.2. Déterminer la concentration discriminante

2.2.a. Choix des populations sensibles

Le choix des populations sensibles définit l'ensemble des résultats concernant la sensibilité des varroas. Il est nécessaire de s'assurer que les populations testées peuvent bien être considérées comme des populations sensibles. Ces populations correspondent à des populations n'ayant jamais été en contact avec la substance active ou n'ayant pas eu de contact depuis plus de 10 années avec la substance testée. Ces populations ne sont pas toujours faciles à trouver. En effet, la présence d'autres apiculteurs à proximité rend cette recherche délicate sachant que les varroas s'échangent facilement entre ruchers.

Les populations sensibles au tau-fluvalinate (n=4) : elles proviennent de ruchers non-traités au tau-fluvalinate depuis plus de 10 ans (n=2) et de deux apiculteurs pratiquant l'apiculture biologique (n=2) dans des zones isolées. Des populations de varroas de Guyane Française et de la Réunion n'ayant jamais été traitées au tau-fluvalinate sont venues confirmer les résultats observés sur les populations sensibles de métropole.

Les populations sensibles à l'amitrazé (n=4) : l'ensemble des populations provient de ruchers d'apiculteurs pratiquant l'apiculture biologique sur des ruchers sédentaires loin des zones de transhumance (n=4). Une population venant de Suisse a permis de valider ces résultats. La Suisse a été choisie car l'utilisation de tau-fluvalinate et d'amitrazé y est interdite. Les apiculteurs utilisent de l'acide formique pour traiter le varroa.

2.2.b. Choix de la concentration discriminante

La concentration discriminante permet en testant une seule concentration de déterminer si une population réagit comme une population sensible ou non. Elle permet donc de gagner du temps pour conclure sur la proportion de varroas résistants dans la population. Le tableau 6 présente l'ensemble des 5 étapes nécessaires pour réaliser le protocole d'évaluation de sensibilité. Le protocole est identique qu'il s'agisse du tau-fluvalinate ou de l'amitrazé, excepté les concentrations des deux substances actives qui varient.

Des morceaux de couvain d'environ 15cmx15cm sont prélevés dans la colonie pour collecter les varroas. Soit les couvains sont prélevés directement puis ramenés au laboratoire lorsque les ruchers sont à proximité, soit les couvains sont envoyés au laboratoire par la poste. Le temps de trajet doit durer moins de 2 jours. Une fois les couvains réceptionnés, ils sont placés à l'étuve à $30\pm0.5^{\circ}\text{C}$ et à $60\pm10\%$ d'humidité jusqu'à l'étape de la collecte. Uniquement les varroas femelles matures sont

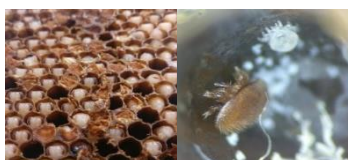
collectées en désoperculant chaque cellule du couvain. Une fois le varroa prélevé de la cellule, il est placé dans une boîte de Pétri avec une nymphe. Plusieurs femelles varroas peuvent patienter ensemble dans la même boîte de Pétri. Lorsque le nombre de varroas collectés est suffisant, ils sont mis en **contact avec la substance acaricide** (amitrazé ou tau-fluvalinate) **pendant une heure** dans les boîtes de Pétri (sans nymphe) préalablement contaminées à différentes concentrations et placées dans une étuve ($30\pm 0.5^{\circ}\text{C}$, $\text{HM}=60\pm 10\%$). Puis, ils sont transférés dans des boîtes de Pétri **non-contaminées** avec 3 nymphes et replacés à l'étuve ($30\pm 0.5^{\circ}\text{C}$, $\text{HM}=60\pm 10\%$) **pendant 24h**. La mortalité est évaluée 24h après la mise en contact. Pour chaque concentration 4 réplicats sont réalisés. Pour chaque réplicat, 15 à 20 varroas sont testés. Entre 45 et 60 varroas sont donc nécessaires pour évaluer l'effet d'une substance active à une concentration précise sur la sensibilité des varroas. Pour réaliser une courbe dose-réponse complète, il faut tester au minimum 5 concentrations, soit entre 300 et 400 varroas. Pour chaque test réalisé, des varroas témoins permettent de contrôler la mortalité naturelle des varroas. Si le taux de mortalité naturel des varroas est supérieur à 30%, le test est rejeté. A partir de ce taux de naturel est calculé un taux de mortalité corrigé : M_c (Tableau 6). Ce dernier permet de s'affranchir de la mortalité naturelle des varroas (qui pourrait être due au transport).

Une fois les taux de mortalités obtenus pour chaque concentration, l'utilisation de modèle généralisé mixte (GLM) permet de tracer la courbe dose-réponse des populations sensibles (Figure 32). A partir de cette courbe et du package ECOTOX du logiciel RStudio, les concentrations létales (CL) à différentes concentrations seront déterminées. Nous avons arrêté notre choix sur la CL90 comme concentration discriminante. Une concentration discriminante plus élevée est utile dans le cas avéré de résistance forte (comme c'est le cas chez les moustiques) (OMS, 2018). Dans notre cas, nous cherchons des résistances faibles à modérées. Une fois la CL90 évaluée, seule cette concentration sera testée pour chaque population. L'utilisation de la concentration discriminante permet de limiter les erreurs de mesure puisque le nombre de varroas et le nombre de réplicats sont assez élevés pour une seule concentration.

Tableau 6: Description des différentes étapes du test de sensibilité phénotypique



Contamination des boîtes de Petri.
(photo prise sans hotte pour une meilleure vision)



Couvain désoperculé (à gauche) et
Fondatrice varroa avec
protonympe (à droite)



Mise en contact des varroas avec la
substance active

Transfert des varroas dans des boîtes
non-contaminées avec nymphes



Evaluation de la mortalité

1^{er} ETAPE : Contamination des boîtes de Petri

Les boîtes de Petri utilisées sont des boîtes de 9cm de diamètre. Le couvercle des boîtes ne dispose d'aucun écart pour éviter aux varroas de s'échapper.

Préparation de différentes concentrations de solution :

- Solvant : Hexane
- Amitraze (Sigma Aldrich®) / tau-fluvalinate (Sigma aldrich®)

Sous hotte, la face interne du fond de la boîte de Petri ainsi que celle du couvercle sont contaminées respectivement avec 1 ml de la solution. Laisser l'hexane s'évaporer sous la hotte. Des boîtes témoins sont préparées uniquement avec de l'hexane. Les solutions sont conservées maximum 1 an au congélateur (-20°C).

2^{ème} ETAPE : Collecte des varroas dans le couvain

Les fondatrices varroas sont collectées dans le couvain sans distinction des différents stades de développement des abeilles. Les fondatrices sont conservées dans des boîtes de Petri avec des nymphes le temps de la récolte dans une étuve à 30°C±1°C et 60±10% d'humidité.

3^{ème} ETAPE : Contamination des varroas

Dans chaque boîte de Petri préalablement contaminée sont placés 15 varroas pendant 1h à l'étuve (30°C±2°C et 60%±5%).

Par concentration testée :

- 4 réplicats (4 boîtes de Petri)
- 15 varroas / boîte de Pétri
- 60 varroas au total

4^{ème} ETAPE : Transfert des varroas

Les varroas sont transférés dans des boîtes de Petri non-contaminées avec 3 nymphes pour leur permettre de se nourrir pendant 24 heures

5^{ème} ETAPE : Evaluation de la mortalité

Le taux de mortalité des varroas par boîte de Petri est évalué 24h après la mise en contact.

$$\text{Taux de mortalité} = \text{Varroas morts} / \text{Varroas totaux}$$

Le taux de **mortalité corrigée, Mc** est appliqué à chaque boîte de Pétri (Formule de Shneider). Elle permet de tenir compte de la mortalité du témoin. Si la mortalité des témoins est supérieure à 30%, le test est rejeté (Riva, 2017).

$$Mc = \frac{\text{Taux de varroas morts} - \text{Taux de varroas morts du témoin}}{1 - \text{Taux de varroas morts du témoin}}$$

2.3. Validation de la méthode

2.3.a. Généralités

En biologie, la variabilité des méthodes est peu évaluée. Les limites d'interprétation des résultats sont ainsi peu discutées et pourtant nécessaires pour attribuer de la valeur aux résultats obtenus. Pour valider une méthode, il est nécessaire d'évaluer la **fidélité** (par rapport à une valeur théorique réelle), la **répétabilité** et la **reproductibilité** de cette dernière (Figure 35) (Desquilbet, 2012). La détermination de la dispersion des données ainsi que l'écart-type donnent des informations concernant ces 3 paramètres.

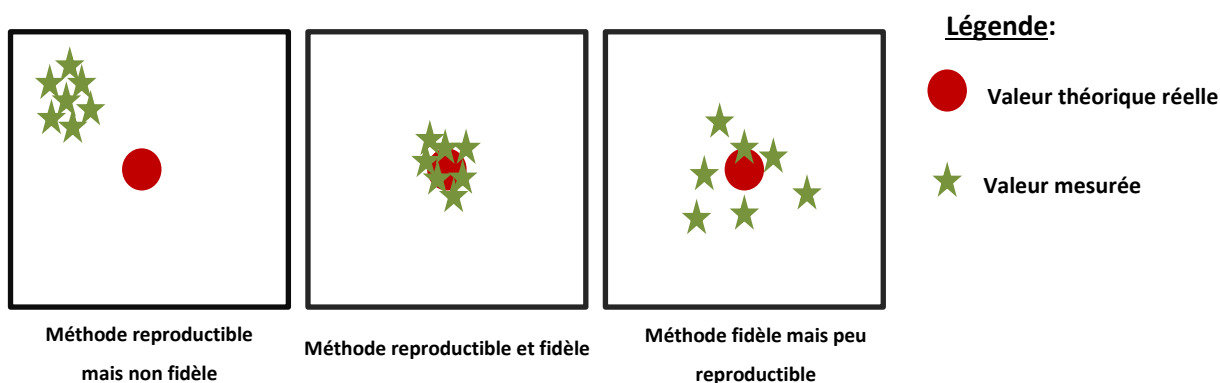


Figure 35: Représentation des valeurs mesurées par rapport à la valeur réelle théorique

Plus concrètement, la répétabilité indique la fiabilité de la méthode à un instant t dans des conditions similaires. Une méthode reproductible indique que les résultats mesurés par d'autres opérateurs ou dans des conditions différentes sont identiques. En fonction des résultats recherchés plusieurs contextes peuvent être décrits en fonction des **opérateurs**, des **conditions de mesures** et des **méthodes de mesure** (Desquilbet, 2012). Dans notre cas, la méthode de mesure est similaire car nous ne comparons pas nos résultats avec d'autres méthodes de phénotypage de la sensibilité des varroas.

2.3.b. Validation de la méthode

Les essais pour tester la répétabilité et la reproductibilité de la méthode ont été réalisés sur le même rucher situé à Nieul-sur-mer (17 137) en juillet 2020 en pré-traitement. Pour chaque colonie testée, les varroas sont prélevés dans le couvain et testés à la CL90 à l'amitraze (uniquement) selon la méthode précédemment décrite (§2.2). L'étude de la répétabilité consiste à évaluer si le résultat obtenu est comparable dans des conditions totalement similaires. La reproductibilité permet d'évaluer si les résultats sont comparables pour des conditions de mesures différentes (changement d'opérateur, échantillonnage sur des cadres différents) (Tableau 7).

Tableau 7: Description des différents tests de Répétabilité et Reproductibilité réalisés sur un même rucher. La répétabilité correspond à des opérateurs et des conditions de mesures identiques. Les différentes reproductibilités indiquent des variations d'opérateurs ou de collecte des varroas.

Contexte	Opérateurs		Conditions de mesures	
	Identiques	Différents	Identiques	Différents
Répétabilité sur une même ruche	x		x	
Reproductibilité inter-opérateurs		x	x	
Reproductibilité inter-cadre	x			x
Reproductibilité intra-cadre	x			x
Reproductibilité intra-rucher	x			x

- La **répétabilité** a été testée sur une ruche du rucher de Nieul-sur-mer. Six essais ont été réalisés sur cette ruche. Pour chaque essai, 4 réplicats ont été réalisés. Au total, 1440 varroas ont été utilisés sur l'ensemble des 6 essais.
- La **reproductibilité inter-opérateurs** : sur une même ruche et le même jour a été réalisé un test de sensibilité à la CL90 par trois opérateurs différents. Ici, les opérateurs sont des personnes différentes formées réalisant les tests dans le même laboratoire, simultanément. Chacun des trois opérateurs contamine ses boîtes de Pétri, prélève ses varroas, les contamine, les transfère et évalue la mortalité 24h plus tard.
- La **reproductibilité inter-cadres** : Sur trois ruches du rucher de Nieul-sur-mer, deux cadres de couvain ont été prélevés C1 et C2. Pour chaque ruche et chaque cadre de couvain différents sont prélevés les varroas. A terme, nous aurons 2 échantillons (1 par cadre) pour chaque ruche, soit 6 échantillons au total.
- La **reproductibilité intra-cadre** : Plusieurs études ont montré que les varroas n'infestent pas de manière homogène le cadre de couvain (Le Conte et al. 2000). Sur deux ruches utilisées pour la reproductibilité inter-cadres, la variation intra-cadre a été en plus testée (prélèvement sur les deux faces du cadre). La sensibilité des varroas à la CL90 a été réalisée sur des varroas collectés sur deux faces de deux cadres de deux ruches différentes. A la fin du test, 4 échantillons par ruche ont été testés à la CL90.
- La **reproductibilité intra-rucher** : Plusieurs ruchers (n=7) répartis en France, ont permis de définir les variations intra-rucher (c'est-à-dire inter-ruches d'un même rucher). Entre 3 et 15 ruches ont été utilisées par rucher pour tester la variation de sensibilité des varroas intra-rucher. Pour chaque ruche dont le couvain est prélevé, les varroas sont testés à la CL90 à l' amitraze selon la méthode décrite dans le tableau 6. La sensibilité des varroas à l' amitraze est comparée entre les ruches d'un même rucher.

2.3.c. Analyses statistiques

La recherche de variances et de moyennes aberrantes est indispensable avant l'évaluation de la répétabilité et de la reproductibilité. L'évaluation de valeurs aberrantes est calculée avec le package « outliers » et les tests de Cochran (pour la variance) et de Grubbs (pour la moyenne). Un test d'Anova viendra compléter ces tests. La répétabilité de la méthode est évaluée par la variance des données dans de mêmes conditions appelée **variance de répétabilité ou variance résiduelle** (notée σ^2_r). La variance liée aux conditions de mesure (par exemple, les opérateurs, ruche, rucher...) est appelée **variance factorielle** (notée σ^2_f). La somme de ces deux dernières variances permet de mesurer la **variance de reproductibilité** (notée σ^2_R) (Equation 3).

Equation 3

$$\sigma^2_R = \sum \sigma^2_r + \sigma^2_f$$

A cela, peut s'ajouter l'évaluation d'un coefficient de variation (notée CV) mesurant une dispersion relative qui peut également apporter des informations sur la justesse des valeurs (Abdi, 2010) (Equation 4). Il représente l'écart-type à la moyenne. La moyenne est représentée par μ . Le CV varie de 0 à $\sqrt{N-1}$ (le résultat peut donc être supérieur à 100%). Il est le plus souvent exprimée en pourcentage. Plus sa valeur est élevée, moins la valeur est précise. Le coefficient de variation a l'avantage de permettre de comparer des séries de données d'unités différentes.

Equation 4

$$CV(r) = \sqrt{\sigma^2_r}/\mu \text{ et } CV(R) = \sqrt{\sigma^2_R}/\mu$$

Les comparaisons entre les différents échantillons ont été analysées par les tests de comparaison de moyenne : test de Kruskal-Wallis (comparaison de plusieurs échantillons), test de Wilcoxon (échantillons appariés) ou de Mann-Whitney (échantillons indépendants).

2.4. Définir les classes de sensibilités et les ratios de résistance

2.4.a. Classe de sensibilité

L'évaluation de la résistance d'une population de varroas a été mesurée à partir de la proportion de varroas sensibles dans l'échantillon testés à la concentration discriminante. Les classes de sensibilité permettent de définir à partir de quelle proportion de varroas sensibles la population peut être considérée comme résistante ou sensible. En 1998, Elzen et ses collaborateurs ont défini ainsi des

classes de sensibilité pour le tau-fluvalinate (Elzen et al., 1998). Les classes définies par Elzen sont présentées dans le Tableau 8. Ces classes ont été définies à partir de retour d'apiculteurs sur les efficacités / échecs de traitement de l'Apistan® aux Etats-Unis dans différentes régions. Une forte variabilité a été observée entre les différents états aux Etats-Unis (Elzen et al., 1999b).

Tableau 8: Classes de sensibilité définies en 1998 pour le tau-fluvalinate (Elzen et al. 1998)

Classes	% Mortalité à la CL90
Très sensible	>90%
Sensible	75%<M<90%
Résistance modérée	65%<M<75%
Résistance forte	<65%

Pour l'amitrazé, aucune classe n'a pour l'instant été définie car 1) trop peu de populations ont été testées (Kamler et al., 2016; Maggi et al., 2010) et 2) la méthode des ratios de résistance a été utilisée dans la plupart des études (Kamler et al., 2016; Rinkevich, 2020). A partir des différentes populations testées en laboratoire, les classes de sensibilité ont été mises à jour pour le tau-fluvalinate et créées pour l'amitrazé. Les classes ont été définies en réalisant une analyse de groupe suivi d'une analyse de comparaison de moyenne par le test de Dunn sur le logiciel RStudio 2.2. Les classes de sensibilité ont été évaluées pour le tau-fluvalinate et l'amitrazé avec respectivement 22 et 35 populations de varroas.

2.5. Ratio de résistance

L'évaluation d'un ratio de résistance nécessite de tester la sensibilité des varroas sur plusieurs concentrations et de tracer une courbe complète dose-réponse (Equation 5) (voir §1.1.a). Nous avons pu réaliser une courbe dose-réponse complète pour les populations sensibles à l'amitrazé (n=4), pour une population présentant une mortalité de 65% à la CL90 (localisée à Lagord) et une population présentant une mortalité de 50% à la CL90 (localisée à Aubière). Ces courbes ont permis d'évaluer les concentrations létales à 50% et 90% pour les populations sensibles, la population de Lagord et d'Aubière. Les CL50 et CL90 ont été évaluées à partir du package ECOTOX selon la méthode décrite pour les CL90 des populations sensibles (voir § Choix de la concentration discriminante).

Le ratio de résistance (RR) correspond au rapport de la concentration nécessaire pour tuer 50% de la population testée sur la concentration nécessaire pour tuer 50% d'une population sensible (Figure 33, Equation 5, voir 1.1.a).

Equation 5

$$RR = \frac{\text{CL50 de la population testée}}{\text{CL50 de la population de référence}}$$

2.6. Test à l'aveugle

Nous avons réalisé la plupart des essais en laboratoire en suivant des tests à l'aveugle. Cette méthode a été mise en place avec les ADAs et notamment l'ADA AURA, l'ADAPI et l'ADANA. Les ADAs envoyaient des échantillons de couvain sans que l'historique de traitement ne soit connu par l'opérateur en laboratoire. Une fois les résultats de sensibilité des populations obtenus, les informations concernant l'apiculteur étaient échangées. En 2019 et 2020, 21 échantillons ont été envoyés par l'ADA AURA, l'ADAPI et l'ADA NA en suivant le protocole du test à l'aveugle. Sur l'ensemble de l'étude des sensibilités, environ 30% des échantillons de varroas testés ont été testés à l'aveugle.

3. Résultats

3.1. Choix de la méthode de collecte

La méthode de collecte influence la mortalité naturelle des varroas dans les 24h après la collecte (Test de Kruskal-Wallis, $c^2=7.25$, $df=2$, $p=0.026$) (Tableau 9). La méthode de collecte dans le couvain présente une mortalité significativement plus faible que celle des varroas prélevés avec le sucre glace (test de Dunn, Couvain-Sucre glace : $p=0.011$). La méthode de collecte avec le CO_2 est la méthode intermédiaire (test de Dunn, CO_2 -Sucre glace : $p=0.15$, Couvain- CO_2 : $p=0.37$). La méthode au sucre glace permet plus difficilement de dissocier les varroas affaiblis et sains lors du transfert dans les boîtes de Pétri. L'utilisation d'un témoin et de la mortalité corrigée permet néanmoins de réduire les erreurs en fonction de la méthode de collecte. La majorité des prélèvements seront donc réalisés sur varroas prélevés dans le couvain pour diminuer les risques de mortalité liés à la méthode de collecte.

Tableau 9 : Influence de la méthode de collecte des varroas sur la mortalité sur 24h

Méthode de collecte	Nombre de réplicats	Nombre de varroas	Mortalité à 24h ¹
Couvain	16	163	0.10±0.03 a
CO2	15	193	0.15±0.03 a
Sucre glace	10	153	0.23±0.04 b

¹ Les différentes lettres indiquent une différence significative entre les méthodes de collecte

3.2. Evaluation de la concentration discriminante

3.2.a. Courbes dose-réponse des populations de référence

La courbe dose-réponse à l'amitrazé est présentée sur la Figure 36 et la dose réponse au tau-fluvalinate est présentée sur la Figure 37. Pour réaliser une courbe dose-réponse complète, il faut compter entre 500 et 1000 varroas. Les varroas sont particulièrement sensibles aux variations de concentration d'amitrazé (transformation logarithmique des concentrations). A concentrations égales, les varroas

sont plus sensibles à l'amitrazé qu'au tau-fluvalinate. Les informations concernant la modélisation de la courbe dose-réponse sont indiquées dans le Tableau 10.

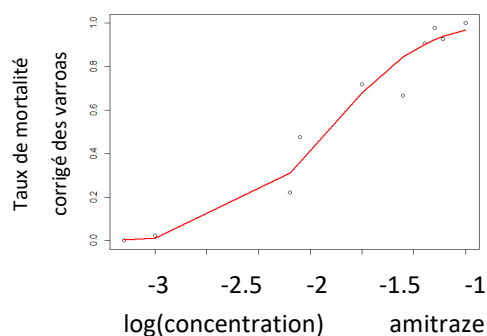


Figure 36: Courbe dose-réponse des varroas à l'amitrazé. L'axe des abscisses correspond aux log (concentrations)

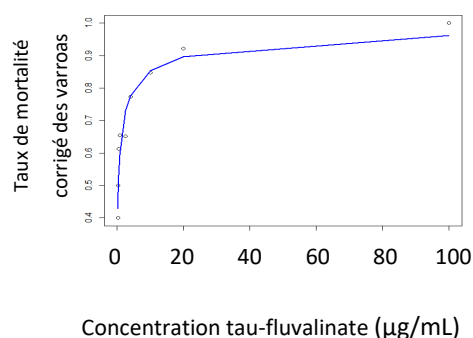


Figure 37: Courbe dose-réponse des varroas en fonction de la concentration en tau-fluvalinate.

Tableau 10: Paramètres du modèle (GLM) pour la courbe dose-réponse pour l'amitrazé et le tau-fluvalinate.

Acaricide	R ²	Pente ± SE	95% CI		P-value	Intercept ± SE	95% CI		P-value	n ¹
Amitrazé	0.95	1.38 ± 0.1	1.18	1.59	2.0e-16	1.85 ± 0.11	1.63	2.07	2.59e-16	678
Tau-fluvalinate	0.88	0.73 ± 0.08	0.059	0.886	2.71e-13	0.32 ± 0.056	0.218	0.438	5.36-09	834

¹ correspond au nombre de varroas utilisés pour réaliser la courbe.

3.2.b. Détermination de la concentration discriminante : la CL90

Grâce aux courbes dose-réponse des populations sensibles, il est possible de déterminer la CL90 : concentration à laquelle meurt 90% de la population de varroas. Le package ECOTOX a permis de mesurer cette concentration discriminante à **0.4 µg/mL** pour l'amitrazé et à **20µg/mL** pour le tau-fluvalinate (Tableau 11). Ce sont ces concentrations qui seront utilisées pour évaluer la sensibilité des populations de varroas. La concentration discriminante permet en une seule mesure d'évaluer la proportion de varroas résistants dans la population par rapport à une population sensible. Ces deux concentrations discriminantes seront utilisées pour l'ensemble des essais d'évaluation de sensibilité.

Tableau 11 : Détermination des CL90 pour l'amitraze et le tau-fluvalinate

	Amitraze				Tau-fluvalinate			
	Valeurs ajustées ± SE (µg/mL)	µg /cm ²	95% CI (µg/mL)		Valeurs ajustées ± SE (µg/mL)	µg/cm ²	95%CI (µg/mL)	
LC ₅₀	0.046 ± 0.03	0.5e-2	0.0343	0.0609	0.36 ± 0.03	0.39e-1	0.2214	0.5735
LC ₉₀	0.39 ± 0.01	0.42e-2	0.2979	0.50789	20 ± 0.01	0.22	11.516	34.574

3.3. Validation de la méthode : Répétabilité & Reproductibilité

3.3.a. Répétabilité de la méthode sur une même colonie

Sur un temps très court de 2 jours, un maximum de réplicats a été testé pour déterminer la variabilité du test dans les mêmes conditions (Tableau 12). Les varroas ont été prélevés sur des morceaux de couvain différents pour obtenir un échantillon plus représentatif de la colonie. Sur la même colonie, 6 essais ont été répétés (x4 réplicats). Les résultats sont présentés dans le Tableau 12. La répétabilité est indiquée par la variance. Il n'y a pas de différence significative entre les moyennes obtenues par les 6 tests différents (test de Kruskal-Wallis, $\chi^2=3.39$, $df=5$, $p\text{-value}=0.64$). Les différents coefficients de variation indiquent que le même écart est évalué entre chaque mesure sur la même ruche allant de 22% à 60%. Lorsqu'on moyenne l'ensemble des réplicats, la moyenne de mortalité est de 0.58, l'écart-type de 0.23, et le coefficient de variation est de 39%. La méthode pour tester la sensibilité des varroas est répétable dans des conditions similaires mais le coefficient de variation de répétabilité (CVr) indique qu'il peut y avoir des variations importantes, nécessitant des précautions lors de l'interprétation des résultats.

Tableau 12: Répétabilité du test de sensibilité phénotypique à la CL90 (amitraze) sur une même ruche avec 6 essais (4 réplicats par essai).

Numéro d'essai	Mortalité à la CL90 ± SD	Nb de varroas	Variance	CVr (%)
1	0.63±0.28	60	0.0784	44
2	0.65±0.37	60	0.137	60
3	0.55±0.12	60	0.0144	22
4	0.43±0.2	60	0.044	49
5	0.55±0.14	60	0.020	26
6	0.66±0.26	60	0.068	40

3.3.b. Reproductibilité inter-opérateur

La mortalité des varroas témoins (sans substances acaricides) ne présente pas de différence significative entre les trois opérateurs (Test de Kruskal-Wallis, p-value=0.47) (Tableau 13). De même, les variances sont homogènes (Test de Cochran, C=0.083, df=3, k=3, p-value=0.09).

La variance, ainsi que le coefficient de variation, est similaire à la répétabilité (voir § Répétabilité sur une même ruche), soit 45%. La mortalité des varroas à la CL90 ne présente pas de différence significative entre les trois opérateurs (Test de Kruskal-Wallis, p-value=0.37) (Tableau 13). De plus, la variance de répétabilité est plus importante que la variance factorielle. **Il n'y a donc pas d'effet d'opérateur sur les résultats de sensibilité à l' amitraze. La variance observée correspond à la répétabilité de la méthode. Le test sur la sensibilité des varroas est donc reproductible inter-opérateurs lorsque ces derniers sont formés.**

Tableau 13: Mortalité des varroas à la CL90 en test inter-opérateurs

	Mortalité du témoin±SD	Mortalité à la CL90±SD	Nombre de répétition	Variance de la mortalité à la CL90
Opérateur 1	0.03±0.05	0.45±0.12	3	0.014
Opérateur 2	0.05±0.04	0.45±0.33	3	0.11
Opérateur 3	0.09±0.03	0.51±0.09	3	0.0081

3.3.c. Reproductibilité inter-cadre

Trois ruches d'un même rucher ont été sélectionnées ainsi : les varroas ont été échantillonnés sur deux cadres différents séparés par au moins un cadre de couvain dans la ruche. Le même opérateur a réalisé tous les tests. Ces résultats indiquent qu'il n'y a pas de différence significative entre la sensibilité des varroas à l' amitraze sur des cadres différents d'une même ruche (Test de Wilcoxon) (Tableau 14). Les varroas répartis sur des cadres différents présentent la même sensibilité dans la même ruche. D'après le coefficient de variation de reproductibilité (CVR), la plus grande variation entre les valeurs provient de CVR, c'est-à-dire de la répétabilité de la méthode. **On peut considérer que l'effet cadre est négligeable sur les résultats de sensibilité à l' amitraze.**

Tableau 14: Reproductibilité inter-cadre sur 3 ruches différentes du même rucher

	Mortalité à la CL90 Cadre 1±SE	Mortalité à la CL90 Cadre 2±SE	CVr (%)	CVR (%)	p-value ¹
Ruche 1	0.63±0.28	0.55±0.12	36	40	1
Ruche 2	0.5±0.22	0.66±0.12	37	60	0.62
Ruche 3	0.67±0.14	0.66±0.14	21	23	1

¹Test de comparaison de Wilcoxon

3.3.d. Reproductibilité intra-cadre

Tout comme les varroas testés en inter-cadre, les varroas provenant des deux faces du même cadre ne présentent pas de différence significative de la sensibilité à l'amitrazé (Test de Wilcoxon) (Tableau 15). Les coefficients de variation indiquent tout comme la reproductibilité inter-cadres que la majorité de la variation provient de la méthode elle-même. **On peut considérer que l'effet « cluster intra-cadre » n'a pas d'effet sur la sensibilité des varroas à l'amitrazé.**

Tableau 15: Reproductibilité intra-cadre. Collecte des varroas sur deux faces d'un même cadre. L'essai a été répété sur deux ruches.

	Cadre 1					Cadre 2				
	Mortalité à la CL90±SE		p-value ¹	CVr(%)	CVR (%)	Mortalité à la CL90±SE		p-value ¹	CVr(%)	CVR (%)
	Face 1	Face 2				Face 1	Face 2			
Ruche 1	0.63±0.14	0.65±0.19	0.88	51	56	0.55±0.06	0.43±0.1	0.63	35	39
Ruche 2	0.5±0.12	0.52±0.15	0.88	53	58	0.66±0.06	0.53±0.11	0.1	30	34±7

¹Test de comparaison de Wilcoxon

3.3.e. Reproductibilité intra-rucher

Comme nous l'avons vu, définir une population de varroa n'est pas clair, notamment à cause des échanges souvent sous-estimés de varroas inter-ruches (Forfert et al., 2015; Greatti et al., 1992). Il était indispensable pour nous d'estimer si la sensibilité d'une ruche était représentative de la sensibilité moyenne du rucher. Le Tableau 16 indique la variabilité de la sensibilité à l'amitrazé intra-rucher sur différents ruchers de différentes régions.

Tableau 16: Reproductibilité intra-ruchers. Le test phénotypique a été réalisé sur plusieurs ruches d'un même rucher. La différence de sensibilité entre les ruchers est évaluée par un test de Kruskal-Wallis. Le coefficient de variation permet de déterminer la variation des résultats obtenus entre les ruches du même rucher.

Ruchers	Mortalité moyenne à la CL90±SD	Nombre de ruches testées	CVr (%)	CVR (%)	p-value ¹
Rucher 1	0.77±0.21	15	26.5	35.66	0.12
Rucher 2	0.57±0.20	5	30.5	43.9	0.166
Rucher 3	0.27±0.21	5	46.7	66.2	0.091
Rucher 4	0.24±0.21	5	56.6	100%	0.0189
Rucher 5	0.4±0.22	6	46.1	68	0.075
Rucher 6	0.62±0.27	3	26.2	49.1	0.68
Rucher 7	0.69±0.19	3	28	36.7	0.31

¹ Test de Kruskal-Wallis entre les ruches composant chaque rucher

Six ruchers testés ne présentent pas de différence significative de la sensibilité à l'amitraze des varroas entre les ruches. Néanmoins, un rucher présente une différence significative entre la sensibilité obtenue sur 5 ruches différentes. Nous pouvons constater que le coefficient de variation de reproductibilité pour le rucher 4 est de 100%. Cela implique une grande variabilité entre la sensibilité des varroas entre les 5 ruches échantillonnées.

L'interprétation des données à l'échelle d'un rucher devront être testées avec précaution. Le test de reproductibilité intra-ruche indique qu'un maximum de ruches devra être testée pour limiter la variabilité intra-rucher. Ce résultat indique également qu'un **résultat obtenu sur une seule ruche ne peut pas être directement interprété à l'échelle du rucher.**

3.4. Classes de sensibilité et ratio de résistance

3.4.a. Détermination des classes de sensibilité

Les classes de sensibilité que nous avons définies diffèrent de celles décrites par Elzen en 1998. L'analyse de groupe a permis de répartir les populations en 3 groupes de sensibilité (contre 4 pour Elzen en 1998). Le test de Dunn a permis de distinguer les différentes classes (Tableau 17). Les classes de sensibilité sont identiques pour le tau-fluvalinate et l'amitraze. Une population qui présente en laboratoire plus de 76% des varroas morts sera considérée comme une population sensible. Une population qui présente moins de 75% de varroas morts sera considérée comme résistante. Une population présentant moins de 40% de varroas morts sera considérée comme une population fortement résistante. En effet, seulement 40% des varroas sont alors sensibles à la substance acaricide.

Ces classes de sensibilité nous semblent plus adaptées au vu des écarte-types et coefficients de variation obtenus lors du test en laboratoire (Tableau 12, Tableau 17). Il n'est pas rare d'obtenir une erreur standard de $\pm 10\%$, il est donc délicat de créer des classes présentant moins de 10% d'écart comme c'est le cas dans les classes définies par Elzen et ses collaborateurs en 1998. Il est important de ne pas confondre ces classes avec des niveaux de résistance de la population qui sont évalués à l'aide des ratios de résistance.

Tableau 17: Classe de sensibilité définies pour l'amitrazé et le tau-fluvalinate en 2019 et classification des populations échantillonnées en France.

Substance Acaricide	Classification	Taux de mortalité à la CL90	Pourcentage de population de varroas (%)	Nombre de populations (k)
Amitraze	Résistance forte	$0 \leq M \leq 0.4$ (a)	14	5
	Résistance modérée	$0.41 \leq M \leq 0.75$ (b)	57	20
	Sensible	$0.76 \leq M \leq 1$ (c)	29	10
Tau- fluvalinate	Résistance forte	$0 \leq M \leq 0.4$ (A)	24	5
	Résistance modérée	$0.41 \leq M \leq 0.75$ (B)	33	7
	Sensible	$0.76 \leq M \leq 1$ (C)	43	9

3.5. Les ratios de résistances

Les populations de varroas de Lagord et d'Aubière peuvent être considérées comme des populations modérément résistantes avec une mortalité respective à la CL90 (amitrazé) de 65% et 50% (Tableau 18). Les courbes doses-réponses à l'amitrazé pour ces 2 populations sont présentées dans le Tableau 18. Les ratios de résistance à la CL50 sont respectivement pour les populations de Lagord et d'Aubière de 8.26 et 10.21. De même, les ratios de résistance à la CL90 sont respectivement pour les populations de Lagord et d'Aubière de 3.69 et 3.9 (Tableau 19 et Figure 38). Ces ratios de résistance mettent en évidence le niveau de résistance des varroas à l'amitrazé. Le ratio de résistance des varroas décrit pour la population d'Aubière est plus élevé que celui de la population de Lagord. Comparées à la population sensible, les deux populations résistantes présentent un ratio de résistance assez proche (Figure 38).

Tableau 18 : Modélisation des courbes dose-réponse de populations modérément résistantes

Population	R ²	Pente $\pm$ SE	95% CI		P-value	Intercept $\pm$ SE	95% CI		P-value	n
Lagord	0.57	1.18 $\pm$ 0.23	0.74	1.64	4.73 ^e -07	1.09 $\pm$ 0.14	0.81	1.38	1.49 ^e -14	193
Aubière	0.83	4.6 $\pm$ 0.68	3.42	5.85	1.11 ^e -11	1.5 $\pm$ 0.19	1.17	1.85	1.19 ^e -15	244

Tableau 19: Description des concentrations d'amitrazé pour tuer 50% (CL50) et 90% de la population (CL90). Les ratios de résistances indiquent le degré de résistance des varroas par rapport à une population sensible

	Concentration létale ¹		Ratio de résistance ²	
	50%±SE	90%±SE	CL50	CL90
Sensible	0.046±0.03	0.39±0.01	0	0
Résistance modérée (Lagord)	0.38±0.062	1.44±0.03	8.26	3.6
Résistance modérée (Aubière)	0.47±0.047	1.52±0.028	10.21	3.8

¹Les concentrations létales CL50 et CL90 sont évaluées à l'aide du package ECOTOX sur Rstudio.

²Les ratios de résistance sont calculés par l'équation 1.

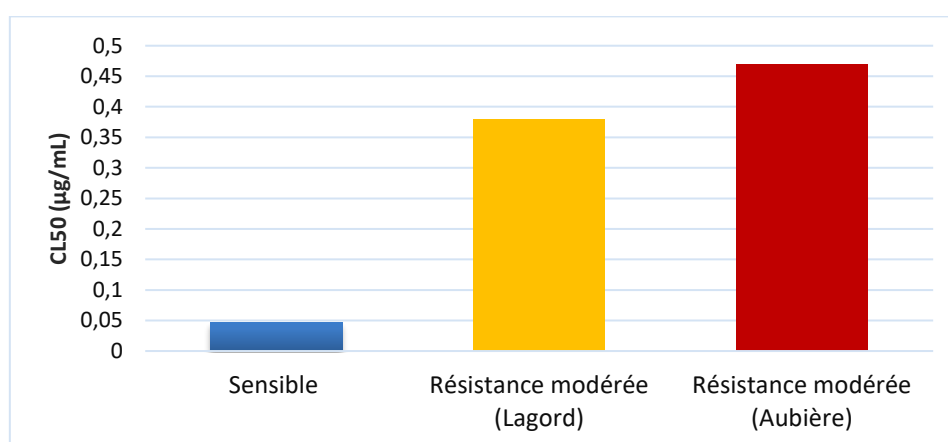


Figure 38: Concentration létale à 50%, CL50 (µg/mL) définie à partir d'une courbe dose-réponse complète. Les trois populations ont été réparties au préalable dans 3 classes de sensibilité à partir des résultats obtenus à la CL90 (concentration discriminante). La population sensible est une population provenant d'un apiculteur pratiquant l'apiculture biologique en France. Les populations en résistance modérée sont des populations de Lagord et d'Aubière

4. Discussion

Le diagnostic des résistances aux acaricides est indispensable dans la gestion des résistances. L'utilisation d'outil de diagnostic de résistances chez *Varroa destructor* permettrait aux vétérinaires de proposer des stratégies de lutte adaptées en fonction de l'état de résistance aux différentes substances acaricides. Cet outil de diagnostic correspond à la méthode décrite par Maggi et ses collaborateurs en 2008. L'avantage de cette méthode est l'accessibilité de son matériel qui pourra donc être mise en place facilement dans de nombreux laboratoires.

4.1. Validation et limites de la méthode

Bien que nous ayons choisi une méthode déjà existante (Maggi et al. 2008), il était nécessaire de vérifier la répétabilité et la reproductibilité de cette méthode, ainsi que d'en connaître ses limites d'interprétation. Grâce aux études de répétabilité et de reproductibilité, nous avons pu mettre en évidence que le test était répétable sur une même ruche avec un coefficient de variation moyen (aux alentours de 20%) (Tableau 12). Ces écarts-types sont comparables à ceux observés dans d'autres études utilisant des tests phénotypiques (Elzen et al. 1999b, Maggi et al. 2008, 2010, Kamler et al. 2016, Rinkevich. 2020). Cette variation ne proviendrait pas de la méthode de mesure car la méthode présente une bonne reproductibilité inter-opérateurs (Tableau 13). De plus, l'analyse de reproductibilité a permis de mettre en évidence qu'à l'échelle d'une ruche, les varroas ne présentaient pas de sensibilité significativement différente à l'amitrazé en fonction de la localisation de la collecte (intra et inter-cadre) (Tableau 14 et Tableau 15). Néanmoins, l'analyse de reproductibilité a montré une limite concernant l'interprétation des résultats à l'échelle d'un rucher (Tableau 16). Bien que les transferts de varroas entre ruches d'un même rucher soient importants pendant une miellée (Greatti et al. 1992), quelques ruches ne représentent pas avec certitude la sensibilité moyenne du rucher. En effet, un rucher sur les sept ruchers testés, présente une différence significative de sensibilité à l'amitrazé entre les ruches. Cette différence de sensibilité pourrait s'expliquer par une réinfestation de colonie par une ruche voisine dû au pillage (Peck & Seeley. 2019). Ainsi, une colonie va être infestée par des varroas n'ayant pas subi la même pression de sélection due à l'historique de traitement, d'autant que les colonies les plus infestées sont les colonies prélevées pour réaliser les tests de sensibilité. Pour limiter ce biais d'interprétation, nous conseillons de réaliser les essais sur un maximum de ruches pour extrapoler le résultat obtenu à l'échelle du rucher. Nous n'avons pas pu réaliser de tests sur différents ruchers à proximité pour établir si la sensibilité des varroas étaient similaires. Actuellement, il n'est donc pas possible de définir si l'analyse de la sensibilité des varroas peut être généralisée aux ruchers voisins ou sur une zone géographique. Nous devons noter que nous avons réalisé ces essais de répétabilité et de reproductibilité uniquement pour l'amitrazé et non pour le tau-fluvalinate. Il faudrait, dans l'idéal, reproduire tous ces tests pour le tau-fluvalinate pour valider la répétabilité et la reproductibilité de la méthode. Les analyses de reproductibilité intra-ruche demanderaient à être répétées pour valider les résultats observés sur ces ruches. Dans la suite du manuscrit, une population de varroas sera associée à une population au niveau du rucher puisque plusieurs colonies sont souvent prélevées et envoyées ensemble.

4.2. Populations sensibles et résistantes

Pour diagnostiquer une résistance, il est nécessaire de définir une population sensible. Nous avons pu en décrire 4 pour l'amitrazé et 4 pour le tau-fluvalinate. Les concentrations discriminantes : 0.4µg/mL (amitrazé) et 20µg/mL (tau-fluvalinate) correspondent aux ordres de grandeur définis par Maggi et ses collaborateurs en 2008 bien que notre concentration discriminante pour le tau-fluvalinate soit plus élevée (rapport 1.5). Cela implique que Maggi et ses collaborateurs ont trouvé des populations de référence plus sensibles au tau-fluvalinate que celles que nous avons pu trouver en Europe. La différence de CL50 ou CL90 pour les populations sensibles a déjà été mise en évidence dans plusieurs études (Watkins. 1997, Schaub et al. 2002). Ces différences indiquent que selon les régions, les niveaux de sensibilité des populations sensibles peuvent varier (Maggi et al. 2011). La comparaison de nos concentrations discriminantes avec d'autres méthodes est délicate car il faudrait ramener la quantité de matières active par cm² pour comparer les méthodes. Lorsque suffisamment d'informations sont présentes dans les articles, nous avons pu comparer nos résultats avec ceux d'autres études. Une fois encore les ordres de grandeur des concentrations discriminantes à la CL90 sont très similaires aux nôtres (Bonafos et al., 2018; Kamler et al., 2016). Les populations de référence devraient être retestées tous les ans pour confirmer les résultats obtenus en laboratoire entre différentes régions du monde.

Les populations dites résistantes sont des populations qui réagissent de manière significativement différente à une substance acaricide comparées à une population sensible. Il existe plusieurs méthodes pour diagnostiquer une population résistante. Nous avons choisi la méthode de la concentration discriminante, CL90 (OMS, 2018; Roush and Tabashnik, 2012). Pour faciliter l'interprétation des résultats, nous nous sommes inspirés de l'idée développée par Elzen et al. 1998. Cette équipe avait défini des classes de sensibilité pour le tau-fluvalinate en fonction de la mortalité des varroas à la concentration discriminante et au retour de suivi d'efficacité de l'Apistan® sur le terrain. Nous avons finalement retenu 3 classes de sensibilité : Sensible, Résistance moyenne et Résistance forte (Tableau 17). En plus des résultats par les analyses statistiques, ces résultats nous semblent plus adaptés au vu des coefficients de variation obtenus lors de l'analyse de répétabilité. Il est important de noter que ces classes n'indiquent pas le niveau de résistance par rapport à une population sensible mais indique une proportion plus ou moins importante de varroas résistants dans la population. Les niveaux de résistance sont évalués par l'analyse de ratio de résistance. Ces classes de sensibilité ne permettent pas de définir le niveau de résistance de chaque individu à la substance active mais indiquent la proportion de varroas résistants dans une population (Roush and Tabashnik, 2012).

Le ratio de résistance n'a été évalué que sur deux populations, ce qui n'est pas représentatif de l'ensemble des échantillons. Ce ratio de résistance est supérieur à ceux observés par Rodriguez-Dehaibes et ses collaborateurs en 2005 mais inférieur à certaines populations testées en Argentine (Maggi et al. 2010), en République-Tchèque (Kamler et al. 2016) et aux Etats-Unis (Rinkevich. 2020). Les ratios de résistance les plus élevés pour l' amitraze sont de 39 (Maggi et al. 2010) contre 87 pour le tau-fluvalinate (Kamler et al. 2016) et même 327 pour la fluméthrine (Rodriguez-Dehaibes et al. 2005) ainsi que 889 pour le coumaphos (Maggi et al. 2009, 2011). Ces ratios de résistance à l' amitraze sont également comparables à ceux observés sur d'autres espèces d'acariens (Andrew et al. 2004, Chevillon et al. 2007, Cutullé et al. 2012). Cela indique que la résistance à l' amitraze est moins élevée comparée à d'autres acaricides. Cela n'empêchera pas des échecs de traitement mais pourra être utilisé dans la mise en place de stratégie de lutte alternée pour estimer le temps qu'il faut à une population pour perdre sa résistance à l' amitraze. Nous pouvons supposer que si le ratio de résistance est moins élevé, le temps pour perdre la résistance serait plus court comme c'est le cas chez d'autres acariens (Chevillon et al., 2007; Maciel et al., 2015).

4.3. Application de la méthode

Ces tests de diagnostic présentent un intérêt pour la recherche mais peuvent être également applicables sur le terrain. D'ailleurs, l'OMS a très bien adapté un test de diagnostic de sensibilité des moustiques aux différents insecticides. L'application sur le terrain nécessite au préalable de définir pour chaque substance active une concentration discriminante commune entre différents pays. Le choix d'une concentration discriminante plutôt qu'un ratio de résistance permet d'obtenir un résultat nécessitant moins d'individus (Kwon et al., 2015; OMS, 2018). Un apiculteur cherchera à obtenir une information à l'échelle de son rucher/ses ruchers. Or, pour extrapoler les résultats à l'échelle d'un rucher, il est nécessaire de tester un maximum de colonies (Tableau 16). Nous avons montré qu'il n'y avait pas de différence significative de la mortalité naturelle entre les 2 méthodes de collecte des varroas : couvain et CO₂. Pour un gain de temps, les varroas phorétiques pourraient être prélevés sur la majorité des colonies à partir des outils d'évaluation d'infestation de la colonie. Les varroas phorétiques seraient alors récupérés à l'aide d'un pinceau et entreposés dans des boîtes de Pétri le temps du transport. La méthode de collecte peut donc être adaptée en fonction du but recherché. La Figure 39 présente le protocole à suivre pour obtenir des informations sur le choix du traitement à réaliser.

Un autre test pourrait être complémentaire au testage phénotypique des varroas. Ce test a été développé par monsieur Pettis lors des premières résistances au tau-fluvalinate (décrit dans BeeUK). Le test de Pettis avait été développé pour tester l'efficacité de l'Apistan®. Le test de Pettis utilise

directement le produit acaricide (il n'utilise pas la substance acaricide pure). Entre 200 et 300 abeilles sont prélevées dans une colonie et mises en contact avec une lanière (Apistan® ou Apivar®) pendant 4h. Un grillage permet de compter le nombre de varroas morts pendant la durée du test. Au bout des 4h, les abeilles sont lavées pour récupérer les varroas résiduels (résistants à la substance acaricide). Ce test permet donc d'établir un pourcentage d'efficacité du traitement à petite échelle en seulement 4h. Il présente donc un intérêt certain, néanmoins, il nécessite de se déplacer au rucher et de faire la manipulation soit même (l'envoi d'abeilles étant plus délicat). Il s'agit d'un test complémentaire qui pourrait être facilement réalisé par les apiculteurs ou vétérinaires. Il reste encore approximatif car le temps d'attente et la quantité d'abeilles sont rarement homogènes entre les différents apiculteurs. Il dépend également du niveau d'infestation de la colonie prélevée. De plus, ce test ayant été créé pour l'Apistan®, il doit être validé pour toute utilisation d'autres produits et dépend notamment de la galénique du produit (support de la substance acaricide). La validation de la méthode nécessitera de trouver des populations sensibles pour déterminer la quantité de lanières et la durée de contact à adapter pour chaque produit. Un autre test similaire vient d'être décrit par une équipe de chercheurs canadiens (Bahreini et al., 2021). Cette méthode permet également d'établir la relation dose-toxicité sur les abeilles.

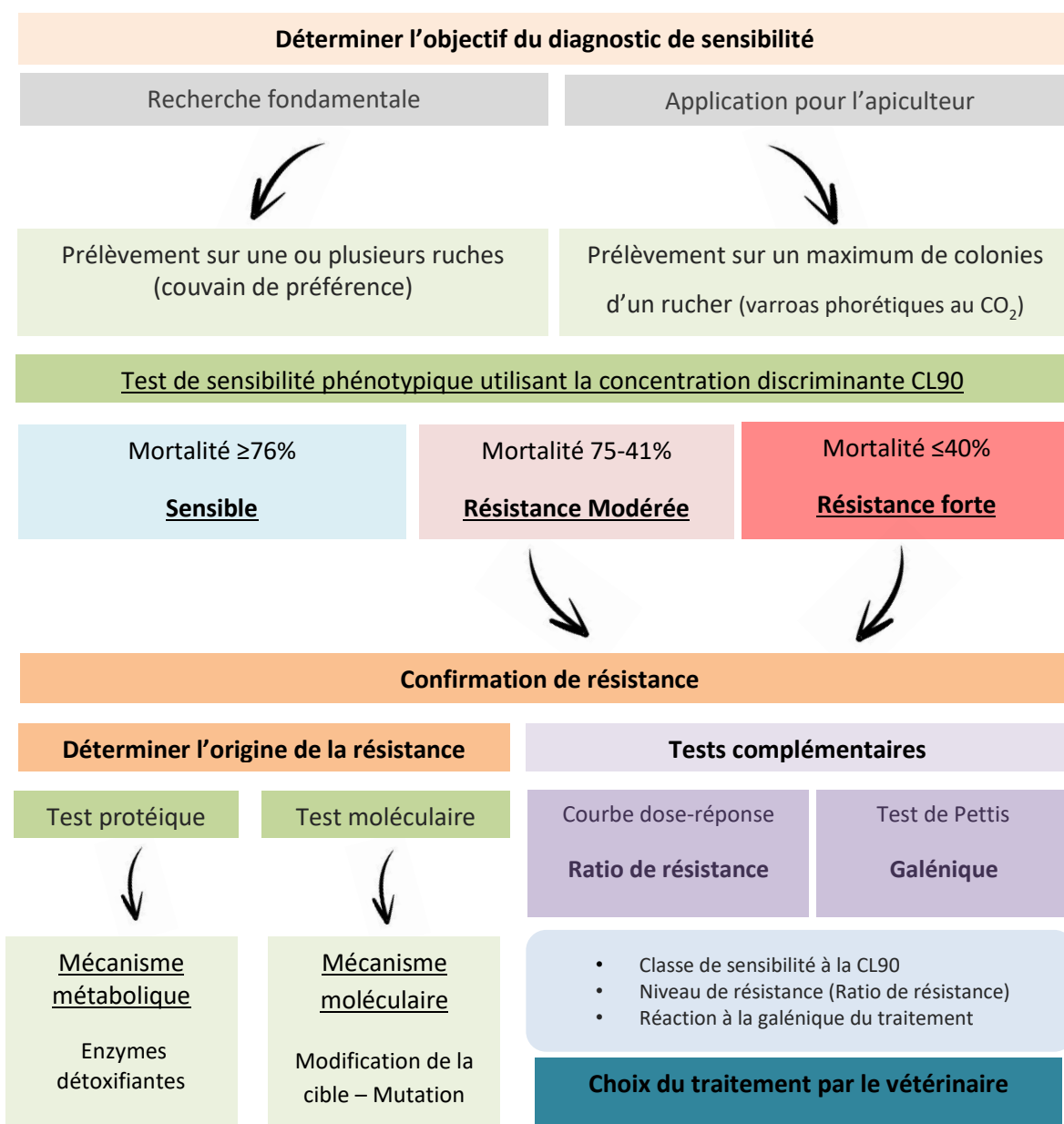


Figure 39: Etapes à suivre lors de la mise en place d'un diagnostic de résistance de *Varroa destructor* aux acaricides. Après la confirmation de la résistance, les varroas peuvent être utilisés pour déterminer l'origine de la résistance. Pour le tau-fluvalinate, plusieurs enzymes détoxifiantes sont impliquées comme les monooxygénases et les Cytochromes P450. Concernant les mutations de la cible, la mutation L925V est la plus répandue en Europe. Des tests complémentaires peuvent être réalisés sur la population d'origine pour fournir des informations concernant le choix du traitement : réaliser 1) une courbe complète dose-réponse ou 2) un test de Pettis.

« La logique vous mènera de A à B. L'imagination vous emmènera partout »

Albert Einstein

Chapitre 2 : Inventaire des sensibilités des varroas à l'amitrazé et au tau-fluvalinate en France

Avant-propos

Varroa destructor a développé des résistances à plusieurs substances acaricides. La sensibilité au tau-fluvalinate n'a pas été vérifiée depuis plus de 15 ans et la sensibilité du varroa à l'amitrazé n'a pas été contrôlée en France depuis les années 2000. La détection des résistances sera évaluée à partir de la méthode décrite dans le chapitre 1. Cette méthode a été établie pour détecter rapidement la présence de résistances chez le varroa.

En France, depuis les dernières décennies, les pratiques des apiculteurs ont évolué notamment à la suite d'apparition de résistances au tau-fluvalinate. L'évaluation des niveaux de sensibilité actuels des varroas aux acaricides apportera des informations nécessaires à la mise en place de stratégies de lutte. L'objectif de ce chapitre est d'apporter des éléments sur l'état de sensibilité des varroas aux acaricides en France. Nous avons posé plusieurs hypothèses sur l'état de résistance des varroas. 1) Les varroas qui sont en contact avec les mêmes substances acaricides depuis plusieurs années présentent des résistances à ces derniers. 2) Une résistance peut se perdre si le varroa n'est pas en contact avec l'acaricide depuis plusieurs années. 3) Les moyens de lutte employés par l'apiculteur peuvent influencer le développement de résistances chez le varroa.

Dans ce chapitre, présenté sous forme d'article, nous décrirons le niveau de sensibilité à l'amitrazé et au tau-fluvalinate chez 59 populations de varroas prélevés chez des apiculteurs aux pratiques différentes. Le lien entre les stratégies de lutte apicoles et les résultats de sensibilité aux acaricides obtenus seront abordés en fin de chapitre.

1. Inventory of *Varroa destructor* susceptibility to amitraz and tau-fluvalinate in France

Gabrielle Almecija ^{1,2}, Benjamin Poirot ¹, Précillia Cochard ¹ and Christelle Suppo ²

¹ APINOV, Research and training center, 10 rue Henri Bessemer, F-17140 LAGORD, France.

² Institut de Recherche sur la Biologie de l’Insecte, UMR 7621, CNRS-Université de Tours, F-37200 Tours, France.

Corresponding author: gabrielle.almecija@apinov.com

ORCID :

Gabrielle Almecija : [0000-0002-5850-0767](https://orcid.org/0000-0002-5850-0767)

Précillia Cochard : 0000-0001-5681-7886

Christelle Suppo : 0000-0002-2277-2859

Number of tables: 5

Number of figures: 3

Journal: Experimental and Applied Acarology

Declarations:

Funding: This manuscript is funded by the National Agency of Technology Research (ANRT) (n°2018/0060), Vita beehealth Europe and the Research and Training center, APINOV.

Conflicts of interest/Competing interests: Gabrielle Almecija, Précillia Cochard and Benjamin Poirot are members of Apinov. Apinov has received research grants from Vitabeehealth to provide Research and Development of Vita beehealth’s products in France. Vita beehealth sells the Apistan® product and they also funded a lot of research into the tau-fluvalinate resistance between 1995 and 2000.

Ethics approval: not applicable

Consent to participate: not applicable

Consent for publication: not applicable

Availability of data and material: The datasets generated during and/or analysed during the current study are available from the corresponding author upon reasonable request

Code availability: not applicable

Authors' contributions: Benjamin Poirot and Christelle Suppo supervised the research. Material preparation and data collection was carried out by Gabrielle Almecija, Precillia Cochard and Benjamin Poirot. Statistical analysis was collated by Gabrielle Almecija, Précillia Cochard and Christelle Suppo. All authors contributed to the redaction.

Abstract

Varroa destructor is one of the greatest threats for the European honeybee, *Apis mellifera*. Acaricides are required to control mite infestation. Three conventional chemical acaricide substances are used in France: tau-fluvalinate, flumethrin and amitraz. Tau-fluvalinate was used for over ten years before experiencing a loss of effectiveness. In 1995, bioassay trials showed the first mite resistance to tau-fluvalinate. In some countries, amitraz was widely used, also leading to a resistance of *V. destructor* to amitraz. In France, some efficiency field tests showed a loss of treatment effectiveness with amitraz. We adapted the bioassay from Maggi and its collaborators to determine mite susceptibility to tau-fluvalinate and amitraz in France in 2018 and 2019. The lethal concentration (LC) which kills 90% of susceptible mite strains (LC90) is 0.4µg/mL and 20 µg/mL for amitraz and tau-fluvalinate. These concentrations were chosen as the determining factors to evaluate mite susceptibility. Some mites, collected from different apiaries, present a resistance to amitraz and tau-fluvalinate (71 % of the mite samples show resistance to amitraz and 57% show resistance to tau-fluvalinate). As there are few active substances available in France, and if mite resistance to acaricides continues to increase, the effectiveness of the treatments will decrease and therefore more treatments per year will be necessary. To prevent this situation, a new strategy needs to be put in place to include mite resistance management. We suggest that a bioassay would be a good tool with which to advise the policymakers.

Keywords: acaricide, mite, beekeeping, honeybees, resistance

1. Introduction

European honeybees, *Apis mellifera*, have an important ecological and economic role with pollination of the natural ecosystem and crops and beekeeping. Honeybees, like many insects, undergo many threats such as the destruction and loss of habitat (Grab et al., 2019; Losey and Vaughan, 2006; Zulian et al., 2013), the intensification of agriculture with its increased use of pesticides (Goulson et al., 2015), the decrease of floral abundance (Baude et al., 2016) and the increasing number of invasive pathogens (Loope et al., 2019; Ryabov et al., 2017). For honeybees, one of the greatest threats is the ectoparasitic mite *Varroa destructor* (Anderson and Trueman, 2000a). The Varroa mite is a natural ectoparasite of *Apis cerana* from Asia and moved to a new host, *Apis mellifera*, during the 20th Century (Dietemann et al., 2019; Techer et al., 2019; K. S. Traynor et al., 2020). It has now spread worldwide owing to the transportation of honeybee hives. The Varroa mite is a threat for beekeeping because it is responsible for varroosis (Rosenkranz et al., 2010). Varroosis is the consequence of a high mite infestation rate in colonies (Dooremalen et al., 2012). Indeed, varroa mites are virus transmitters and multipliers (Beaurepaire, 2020; Mondet et al., 2014; Wegener et al., 2016).

When *V. destructor* arrived in France in 1982 (Colin et al., 1983), many acaricidal chemicals such as amitraz (Taktik®) and coumaphos (Perizin®) were being used. This was until the arrival of tau-fluvalinate (Apistan®) and its ease of use (1989). Indeed, without annual treatment, most colonies collapse within three years or less (around 80% colony loss) (Fries et al., 2006). However, in 1995, the first case of tau-fluvalinate resistance was reported under laboratory conditions (Milani, 1995). After resistance to tau-fluvalinate had been observed, beekeepers in France started using amitraz instead of tau-fluvalinate. Amitraz was particularly used with Apivar®. Today, there are few acaricidal chemicals available in France. Among the chemical treatments available, there are three acaricidal chemicals that are used as conventional acaricides: tau-fluvalinate, flumethrin (both pyrethroid II) and amitraz (formamidine).

The first test developed to evaluate mite resistance to tau-fluvalinate is a bioassay (Milani, 1995). A dose-dependent curve was established with mite mortality in order to determine the necessary acaricide concentrations for susceptible mite populations (where Apistan® presents high efficiency). The necessary increase of the lethal concentration to kill 50% of susceptible mites (LC₅₀) confirmed the existence of resistance in some mite populations to tau-fluvalinate. For many years, resistance to tau-fluvalinate was studied all over the world for *V. destructor* and other mites. Mite susceptibility to tau-fluvalinate differs from region to region (Elzen et al., 1998) depending on multiple factors (Bianchi et al., 2003). A recent study evaluated different origins of tau-fluvalinate resistance as mutations and detoxification. In the varroa mite, tau-fluvalinate resistance comes from different mutations

(Alissandrakis et al., 2017; González-Cabrera et al., 2016, 2013). The L925V mutation is the most common in Europe (González-Cabrera et al., 2018). However, metabolic resistance as a form of detoxification could also be to blame for tau-fluvalinate resistance (Dmitryjuk et al., 2014, 2014; Hillesheim et al., 1996). Tau-fluvalinate resistance can be detected with a genetic test (L925V mutation) (Farjamfar et al., 2018) or phenotypic test (Trouiller, 1998). Concerning amitraz, some bioassays showed resistance to amitraz for different species of mites including *Varroa destructor* (Kamler et al., 2016; Maggi et al., 2008; Rinkevich, 2020). Indeed, different studies highlighted different hypotheses about amitraz resistance in mites (*Rhipicephalus* sp or *Tetranychus* sp) (Baron et al., 2018, 2015; Li et al., 2004; Sungirai et al., 2018; Xu et al., 2018) but no consensus has been validated. Resistance development depends on the species, the acaricidal chemicals and the frequency of their application (Bianchi et al., 2003; Ilias et al., 2014; Sparks and Nauen, 2015). Indeed, the presence of resistance and its degree can be highly variable. For example, mites are known to develop high resistance to pyrethroid as tau-fluvalinate (Maciel et al., 2015; Van Leeuwen et al., 2010), whereas, resistance to amitraz appears slower and the resistance rate is often lower (Dutta et al., 2017; Jonsson and Hope, 2007).

Phenotypic tests do not allow us to evaluate the origin of the resistance but do enable us to consider all types of resistance. In France, phenotypic tests on the varroa mite resistance to tau-fluvalinate have not been repeated for 15 years (data not published, pers.communication). For amitraz, an increase in the lethal time was observed for a resistant strain with bioassay and Apivar® (Mathieu and Faucon, 2000). Also, some efficiency field trials showed that Apivar® had a reduced effect (Adjlane, 2017; Gregorc et al., 2018). In France, the French Federation of Departmental Beekeeping Welfare Organizations (FNOSAD) observed, for 100 beehives, a loss of field efficiency with Apivar® (Vandame, 2018) going from 99% in 2016 to 85% in 2017 and 2018. Field trials are thorough and depend on more parameters than varroa mites' resistance to acaricidal chemicals, initial infestation rates, quantity of brood and reinfestation (Gregorc et al., 2018). Resistance bioassays are brief and could predict treatment efficiency.

The four objectives of this study are 1) To evaluate discriminant lethal concentrations of amitraz and tau-fluvalinate to rapidly determine mite susceptibility, 2) To compare the impact of the mite collection method with mite mortality, 3) To establish the variables of mite susceptibility to amitraz in an apiary and 4) To test different apiaries and determine the susceptibility of mites to amitraz and tau-fluvalinate in France. This article is written according to these four points.

The development of resistance seems different between tau-fluvalinate and amitraz for other mites. We expected to find different results between the use of amitraz and tau-fluvalinate in France, depending on the treatment strategy.

2. Materials and Methods

Many bioassays are performed with vials to test arthropods susceptibility (Kanga et al., 2010; OMS, 2018; Sparks and Nauen, 2015). The following method to test varroa mite susceptibility comes from Milani's test developed in 1995 and described in the Coloss Beebook (Dietemann et al., 2013; Milani, 1995). This method was simplified and modified by many researchers. We therefore chose the readily applicable method described by Maggi and his collaborators in 2008.

2.1 Evaluate the discriminating concentration: LC_{90}

A lethal concentration at 90% (LC_{90}) for a susceptible population can be one of the reference concentrations to compare all populations (OMS, 2018). This LC_{90} was determined after testing on a susceptible mite strain with amitraz (k=3) and with tau-fluvalinate (k=4) (Table 1). Susceptible French mite strains come from organic beekeepers who had used neither amitraz (k=2, n=1049) nor tau-fluvalinate (k=1, n=1040) for at least five years. In Switzerland (k=1, n=186), French Guyana (k=1, n=135) and Reunion Island (k=1, n=98), beekeepers never used tau-fluvalinate. The mites sampled allowed us to compare the susceptible strain from France with other populations that were never exposed to tau-fluvalinate. Infected worker and drone broods were collected and sent to the laboratory in Lagord (FRANCE) by beekeepers or veterinarians.

Table 1 : Susceptible mite strains sampled to determine discriminant concentrations

Localization of sampled mites	Acaricide chemicals tested (k, number of sample)	Number of tested concentrations	Number of tested mites (n)
<u>Mites not exposed to amitraz and tau-fluvalinate for 5 years</u>			
France	Tau-fluvalinate (k=1)	6	1040
	Amitraz (k=2)	6	1049
<u>Mites never exposed to tau-fluvalinate</u>			
Reunion Island	Tau-fluvalinate (k=1)	1	98
French Guyana	Tau-fluvalinate (k=1)	2	135
Switzerland	Tau-fluvalinate (k=1)	2	186
<u>Mites not exposed to amitraz</u>			
Switzerland	Amitraz (k=1)	3	104

2.1.a Bioassay : preparation of the contaminated Petri dishes

Different concentrations of amitraz (PESTANAL®, Sigma Aldrich) and tau-fluvalinate (PESTANAL®, Sigma Aldrich) were prepared with hexane as a solvent. For amitraz, nine concentrations were tested: 0.005, 0.02, 0.025, 0.1, 0.25, 0.4, 0.5, 0.6 and 1 µg/mL. For tau-fluvalinate, nine concentrations were tested: 0.2, 0.3, 0.45, 2.5, 4, 10, 20, 40 and 100µg/mL. Mites were more susceptible to amitraz than tau-fluvalinate which explains the difference in tested concentrations between amitraz and tau-fluvalinate (Maggi et al. 2008; Kamler et al. 2016). Then 2 mL of the acaricide solution was deposited on glass Petri dishes; 1 mL in the lid and 1 mL at the bottom of the Petri dishes (under the extractor hood). The solution was spread across the Petri dishes to assure a uniform distribution of the acaricide solution (Plapp and Vinson, 1977). We considered the Petri dishes ready to use when the hexane had totally evaporated. Contaminated Petri dishes can be conserved for 3 weeks in the freezer (Temperature = -20°C) and the solution with hexane for one year in the freezer (verified by an analysis carried out by an independent laboratory).

2.1.b Bioassay : Miticide exposure

For each tested mite sample (from the same apiary), three to four replicates were carried out. For each replicate (Petri dish), between 15 to 20 varroa mites were used. The number of tested mites per sample was from 60 to 80 mites per concentration (the same quantity of mites was used for the control). Mature female mites were placed in contaminated Petri dishes and left in for 1 hour at 30±2°C. Mites were then moved to uncontaminated Petri dishes containing three pupal stage honeybees for 24 hours in an incubator (30 ±2°C, 70±5% RH) until mortality confirmation 24 hours later. For each test, a control (Petri dishes contaminated with hexane only) was used.

Mite mortality for each replicate was noted 24h after contact with the acaricide. Mites were considered alive if they moved spontaneously after being prodded, otherwise they were considered dead. Mortality rate is defined by the ratio of dead mites compared to the total number of mites. The average mortality rate was calculated for the 4 replicates. If the average mortality rate of the control was ≥5% and ≤30%, then a corrected dose was applied to control the mortality resulting from the acaricidal chemicals (using Schneider-Orelli's formula):

$$\text{Corrected mortality} = \frac{\text{Mortality rate (with amitraz or tau - fluvalinate)} - \text{Mortality control rate}}{1 - \text{Mortality control rate}}$$

Indeed, if the mortality rate of the control was >30% the test was rejected. And if the mortality rate of the control was <5%, then no corrected dose was calculated (WHO 2017).

2.2 Compare mite collection

To test the influence of mite collections, mites from the same beehive (in Lagord, France) were collected with three different methods: directly in the brood or on nurse honeybees with either CO₂ or icing sugar (using varroa tester Swienty A/S, Denmark). With CO₂ and icing sugar, 200 nurse bees were collected from the brood frame (method described by Oliver, 2017). Mites were brought to the laboratory and placed in an incubator (30±2°C, RH=70±10%) until the beginning of the discriminating concentration bioassay (section 2.1). Only amitraz susceptibility was tested on these samples. The mites were tested with amitraz LC₉₀. The number of mites per replicate was 15 to 20 and the number of replicates was 16, 15 and 10 for mites collected in the brood with CO₂ and icing sugar (Table 2). In total, 509 mites were collected from the same beehive to compare the collection methods on mite mortality.

Table 2: Collection methods on the same beehive: brood, CO₂ and icing sugar.

Collection method	Number of replicates	Total number of mites tested
Brood collection	16	163
CO ₂ collection	15	193
Icing sugar collection	10	153

The number of replicates indicates the number of Petri dishes used for each collection method. The total number of mites corresponds to the number of mites used for each collection method. The number of mites per replicate was from 10 to 15 mites.

2.3 Susceptibility variation at apiary scale

Intra-apiary mite susceptibility was observed in one apiary in Lagord (FRANCE), near the laboratory (number of colonies, k=28). From the 18/07/19 to the 23/08/19, we tested mite susceptibility from the 15 most infested beehives (the other colonies did not present enough mites to conduct the bioassay). Mites were collected on nurse honey bees, with the tester Swienty A/S, Denmark or in the brood. Viable mites were sampled, brought to the laboratory and tested against amitraz LC₉₀ to compare the susceptibility of different beehives from the same apiary.

2.4 Mite susceptibility to different apiaries in France

Different mite populations (from different apiaries and beekeepers) were sampled and tested with amitraz and tau-fluvalinate LC₉₀. In 2018 and 2019, 35 mite populations were tested against amitraz

(k=35) and 21 mite populations to tau-fluvalinate at the LC₉₀ (k=21). Furthermore, 18 sampled mites were tested to both tau-fluvalinate and amitraz (k=18). The data collected to determine the discriminant lethal concentration is included in section 2.1. These brood collection mite samples were carried out by beekeepers, associations of beekeepers or veterinarians and sent to the laboratory in France (Lagord) for the bioassay. Mite transport usually lasted one or two days. On arrival at the laboratory, the brood samples were conserved in an incubator (30±2°C) until the beginning of the bioassay (section 2.1). For each sample, the brood infestation was evaluated. The number of cells infested by mites was evaluated on 50 cells. For multi-infestation, the number of mites per cell was taken into account. We dissociate mite infestation (the number of infested cells) and the total number of mites infesting brood cells. Some mite samples were tested after treatment failure (Apistan® or Apivar®). In this case, we tested the susceptibility of the remaining mites and evaluated the brood infestation after treatment.

2.5 Data analysis

All statistical analyses were done with R software (R Core Team 2005). The LC₉₀ was determined with an analysis probit model (ECOTOX package) for amitraz and tau-fluvalinate. The influence of mite collection on mortality was compared with a Kruskal-Wallis test and its post-hoc test, the Dunn-test. The intra-apiary susceptibility variable was analysed with a Kruskal-Wallis test. The LC₉₀ comparison between mite samples in France and Switzerland was analysed with a Kruskal-Wallis test and its post-hoc test, the Dunn test. The determination of classes was made with a cluster analysis which determined the best number of clusters (NbClust package). The distribution of the population in the different groups was carried out with the k-means method.

3. Results

3.1 Determination of the discriminating concentration

The probit model for amitraz showed the significant effect of logarithmically transformed concentrations on mites' mortality ($\chi^2 = 19.7$, $p < 0.001$; Table 3). The same result was observed for tau-fluvalinate ($\chi^2 = 12.7$, $p < 0.001$). The amitraz slope ($a = 1.38 \pm 0.1$) was higher than tau-fluvalinate slope ($a = 0.73 \pm 0.08$) (Table 3).

Varroa mites are more susceptible to amitraz than to tau-fluvalinate. Indeed, lethal concentrations (LC₅₀ and LC₉₀) are lower for amitraz than for tau-fluvalinate (Table 4). For amitraz the discriminant concentration, LC₉₀, is 0.39 ± 0.01 µg/mL. For tau-fluvalinate, the LC₉₀ is 20 ± 0.01 µg/mL (Table 4).

Table 3: Parameters for probit regression model. Mite mortality rate depending on acaricide concentration (amitraz and tau-fluvalinate) for susceptible mite sampled¹.

Acaricide	R ²	Slope ± SE	95% CI		P-value	Intercept ± SE	95% CI		P-value	n
Amitraz	0.95	1.38 ± 0.1	1.18	1.59	2.0e-16	1.85 ± 0.11	1.63	2.07	2.59e-16	678
Tau-fluvalinate	0.88	0.73 ± 0.08	0.059	0.886	2.71e-13	0.32 ± 0.056	0.218	0.438	5.36e-09	834

¹ The different susceptible mite populations were pooled when no significant differences were observed between the mites sampled.

Table 4: Fitted evaluation of different lethal concentrations (LC50, LC90) for susceptible mite populations

	Amitraz				Tau-fluvalinate			
	Fitted values ± SE (µg/mL)	95% CI (µg/mL)	µg /cm ²		Fitted values ± SE (µg/mL)	95%CI (µg/mL)	µg/cm ²	
LC ₅₀	0.046 ± 0.03	0.0343	0.0609	0.5e-02	0.36 ± 0.03	0.2214	0.5735	0.39e-1
LC ₉₀	0.39 ± 0.01	0.2979	0.5078	0.42e-02	20 ± 0.01	11.516	34.574	0.22

3.2 Influence of the collection methods on the mortality

The mortality control was influenced by the mite collection method (Kruskal-Wallis test, $\chi^2=7.25$, df=2, p-value=0.026). There was a significant difference between the mortality control obtained with icing sugar and the brood collection (Dunn test, Brood-CO₂: p-value=0.37, Icing sugar-CO₂: p-value=0.15, Brood-Icing sugar: p-value=0.011, Table 5). The corrected mite mortality level and the mortality level without correction did not differ significantly between the collection methods carried out on the same beehive (Kruskal-Wallis test, $\chi^2=4$, df=4, p-value=0.406). The corrected mortality level takes into account the mite mortality level of the control, but the standard error was higher with icing sugar collection method.

Table 5: Influence of collection methods on mite susceptibility to amitraz.

Mites collection method ¹	Nb. of replicates	Nb. of mites	Mean mortality for control $\pm$ SE	Mean mortality at the LC90 without correction $\pm$ SE	Mean corrected mortality at the LC90 $\pm$ SE ²
Brood	16	163	0.10 $\pm$ 0.03 ^a	0.81 $\pm$ 0.04 ^A	0.79 $\pm$ 0.04 ^A
CO2	15	193	0.15 $\pm$ 0.03 ^{ab}	0.8 $\pm$ 0.04 ^A	0.75 $\pm$ 0.05 ^A
Ice sugar	10	153	0.23 $\pm$ 0.04 ^b	0.78 $\pm$ 0.1 ^A	0.84 $\pm$ 0.09 ^A

¹ Mites were collected with three methods: in the brood, with CO₂ or icing-sugar in the same beehive. The mean mortality for control corresponds to the mite mortality without acaricide (Petri dishes contaminated with hexane only). The corrected mortality of the LC₉₀ corresponds to mortality when mites were tested with Petri dishes contaminated with amitraz at 0.4 µg/mL (discriminant concentration). The different letters indicate significant differences between mite collection method (Dunn test, $p < 0.05$).

² The corrected mortality is evaluated by the Schneider-Orelli's formula (section 2.1) to consider the mortality of the control which does not depend on the acaricidal substance.

3.3 Mite susceptibility to amitraz on apiary scale

The average mite mortality rate from the 15 beehives sampled in the same apiary in Lagord was 0.77 $\pm$ 0.03 ($k=15$). There was no significant difference in the mean mite mortality rate at the LC₉₀ (amitraz) between beehives (Kruskal-Wallis test, $\chi^2 = 20.31$, $df = 14$, p -value = 0.12). In this apiary, we observed the same susceptibility to amitraz with all beehive mite samples at the end of the season.

3.4 Determination of mite susceptibility in France

Mite populations sampled in different regions and apiaries showed a heterogeneous response to acaricides (at the LC₉₀). The mortality rate at the LC₉₀ of all tested mite populations was significantly different for amitraz (Kruskal-Wallis test, $\chi^2 = 87.86$, $df = 34$, p -value = 1.188e-06). Mite mortality also differs significantly between populations with tau-fluvalinate (Kruskal-Wallis test, $\chi^2 = 62.42$, $df = 20$, p -value = 2.989e-06). To facilitate the interpretation of the mortality rate at the LC₉₀, susceptibility classification of the mite population has been evaluated. The cluster analysis suggests three groups for both tau-fluvalinate ($n=21$) and amitraz ($n=35$). According to cluster analysis, we decided to determine three susceptibility classes: Susceptible, Moderately Resistant, and Highly Resistant (Table 6). Brood infestation after treatment gave additional information on top of the cluster analysis (Table 6). The average brood infestation (section 2.4) by class is reported in Table 6. High mite infestation rate in the brood (>20%) after treatment may indicate a loss of treatment effectiveness or a reinfestation during the treatment process. However, the combination of the brood infestation rate and the mortality rate at the LC₉₀ may let us know about mite resistance to acaricidal products (Table 6). For amitraz, the three classes are significantly different (Dunn test, Susceptible-Moderately resistant: p -value=1.0e-04,

Susceptible-Highly resistant: $p\text{-value} < 1.0\text{e-}04$ and Highly resistant-moderately resistant: $p\text{-value}=0.73\text{e-}02$) (Table 6). Most of the mite samples tested (71%) were found to be resistant (moderately and highly) to amitraz. For tau-fluvalinate, the three classes were also significantly different (Dunn test, Susceptible-Moderately resistant: $p\text{-value}=0.02$, Susceptible-Highly resistant: $p\text{-value}<1.0\text{e-}04$ and Moderately resistant-Highly resistant: $p\text{-value}=0.049$) (Table 6). About half of the mite samples tested (57%) were resistant to tau-fluvalinate. We found that less than half of the sampled mites were susceptible to amitraz (29%) and tau-fluvalinate (43%) (Table 6). Figure 1 represents the mortality frequency for the tested populations. For amitraz, most of the mite samples were moderately resistant (Table 6 and Fig.1). For tau-fluvalinate, 43% of the populations were susceptible.

Table 6: Determination of the mite susceptibility classes to amitraz and tau-fluvalinate depending on mite mortality.

Acaricide	Classification	Mortality rate classes at LC_{90} ¹	Percentage of mites sampled (%)	Number of mites sampled (k)	Field treatment	
					Percentage of brood infestation after treatment ² (%)	Treatment
Amitraz	Highly Resistant	$0 \leq M \leq 0.4$ (a)	14	5	45 ± 24 (k=3)	Apivar®
	Moderately resistant	$0.41 \leq M \leq 0.75$ (b)	57	20	58 ± 27 (k=7)	Apivar®
	Susceptible	$0.76 \leq M \leq 1$ (c)	29	10	0 (k=5)	Apivar®
Tau-fluvalinate	Highly Resistant	$0 \leq M \leq 0.4$ (A)	24	5	79 ± 20 (k=4)	Apistan®
	Moderately resistant	$0.41 \leq M \leq 0.75$ (B)	33	7	-	-
	Susceptible	$0.76 \leq M \leq 1$ (C)	43	9	-	-

¹The mortality classes were determined with group analysis and k-means analysis. The different letters indicated significant differences between the three classes for amitraz and tau-fluvalinate.

²The percentage of brood infestation was estimated for each sample and pooled for each susceptibility class when no significant difference was observed.

Mapping of mite susceptibility is represented in Figure 2. Most sampled mites came from the region of Auvergne-Rhône-Alpes (FRANCE) from different beekeepers. Some populations were tested for resistance to both amitraz and tau-fluvalinate (k = 18) in different regions in France (Fig. 2).

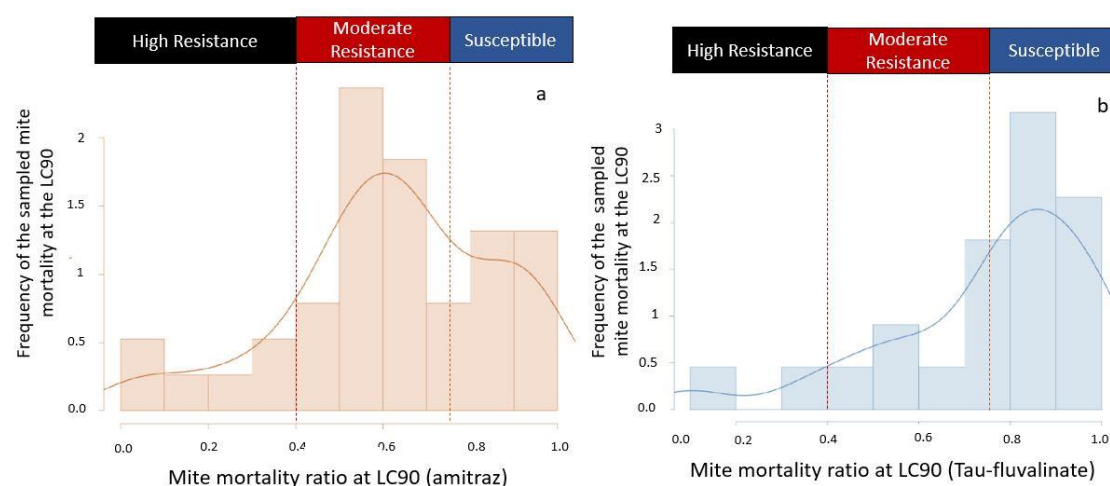


Fig 1 : Density of sampled mite in relation to the mite mortality rate at the LC₉₀ for amitraz (k=35) (a) and for tau-fluvalinate (k=21) (b). Density corresponds to the density of the frequency of the different sampled mites. The three susceptibility classes are represented on the graphs (Table 5). Mites tested to amitraz and tau-fluvalinate come from France (section 2.4).

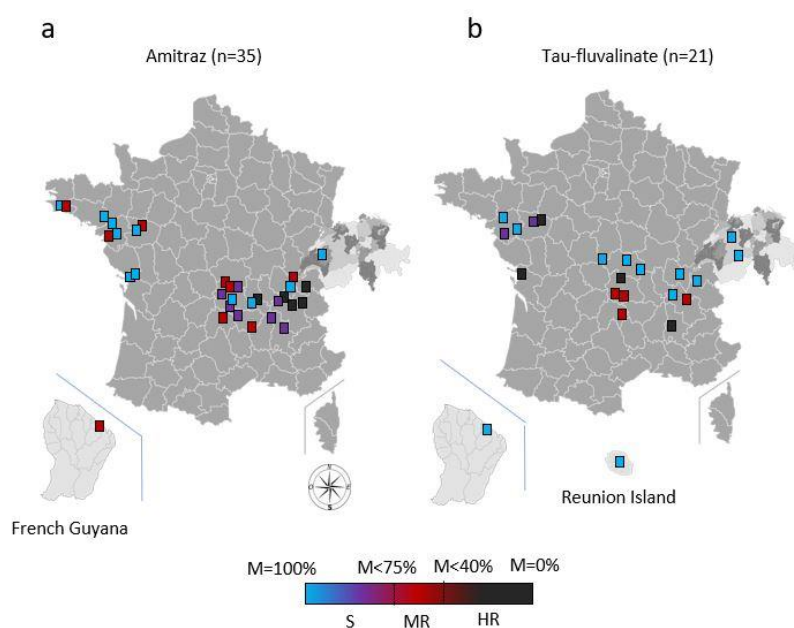


Fig 2 : Mapping the mite susceptibility to a) amitraz (k=35) and b) tau-fluvalinate (k=21) from different mite sampled in France and Switzerland. The gradient of the mite mortality rate indicates mite susceptibility to amitraz or tau-fluvalinate. Susceptible mites sampled (S) had a mortality rate from 0.75 to 1 ; Moderately resistant mites sampled (MR) had a mortality rate from 0.4 to 0.75 ; Highly resistant mites sampled (HR) had a mortality rate from 0 to 0.4 (see Table 5).

Mites sampled from organic beekeepers present the usual susceptibility to tau-fluvalinate and amitraz (k=4) (Fig. 3). No highly cross-resistant populations have been observed. On the contrary, a high resistance to amitraz in mite samples (mortality 0.16 ± 0.05 , k = 4) meant a high susceptibility to tau-

fluvalinate (mean mortality, 0.90 ± 0.08 , $k=4$). However, mite populations that presented a high resistance to tau-fluvalinate were moderately resistant to amitraz ($k=2$) (Fig. 3).

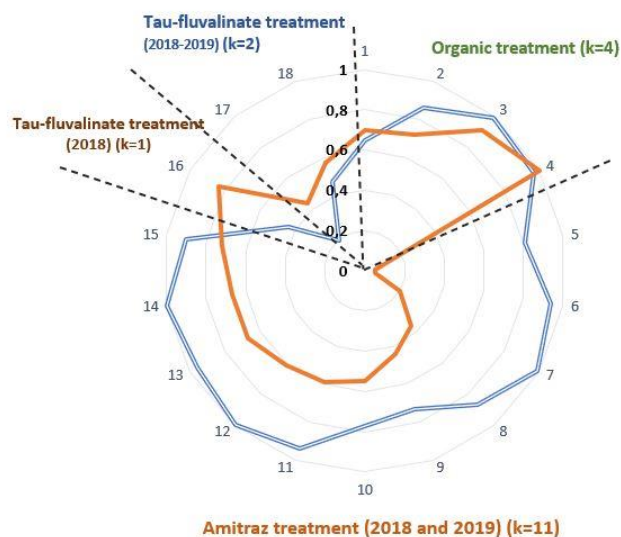


Fig 3 : Presentation of the 18 sampled mites tested both with amitraz (simple line) and tau-fluvalinate (double line)) ($k=18$) in France. The axis represented the mite mortality rate to the LC_{90} (amitraz and tau-fluvalinate) (from 0 to 1). Mites sampled were classified depending on the strategy of treatment in the year 2018 and 2019 (separated by dotted lines) : Organic treatment (without amitraz and tau-fluvalinate), treatment with amitraz (2018 and 2019), tau-fluvalinate (2018 and 2019) and treatment with tau-fluvalinate in 2018 and not treated in 2019.

4. Discussion

Mite susceptibility to amitraz and tau-fluvalinate seems heterogeneous in France with resistant and susceptible mite strains for both acaricides. This variation in mite susceptibility to acaricides could depend on the previous treatments due to selection pressure. Indeed, mite samples with high susceptibility to acaricides were found where beekeepers had not use tau-fluvalinate or amitraz.

The collection of mites can significantly increase the mortality of the control (Table 2). We advise collecting mites in the brood or with CO_2 to reduce the mortality of the control. Our results on the evaluation of the lethal concentration for a susceptible population are similar to other studies where acaricidal mass per cm^2 is compared (Maggi et al., 2008; Kamler et al., 2016) (Table 4). This comparison entails that mite samples, which have never been in contact with an acaricidal substance, present the same susceptibility in different parts of the world. Comparison of the results is not possible with our study when the acaricide bioassay requires paraffin (Milani 1995, Trouiller 1998) or Eppendorf vial (Elzen et al. 1999a., Rinkevich 2020). The apiary study, in Lagord (France), shows there was no

significant difference in mite susceptibility from different beehives in August in the same apiary (section 3.3). This result could be explained by mite migration. Indeed, several studies have found that the natural honeybee drift can transfer 75 mites per day per colony during honey flow (Greatti et al., 1992; Peck et al., 2016) and many mites can migrate to other colonies also after a colony collapse (Cervo et al. 2014., Messan et al. 2017., Peck and Seeley 2019). A study on mite genetics indicates that the percentage of variation is low on an apiary scale (2.5%) compared to the variation among individuals within the beehive (44%) (Dynes et al. 2017). This statement implies that many mites in the same beehive are required to overcome mite diversity within the hive. Moreover, the genetic variation among individuals increases throughout the season while variation on an apiary scale decreases from spring to summer (Dynes et al. 2017). Inbreeding can explain this variation because it occurs in spring and late summer and gives diversity to mites (Beaurepaire et al., 2017). Finally, concerning mite susceptibility, we could expect to have one mite population on an apiary scale at the end of the season due to mite migration. The comparison between beehives in the same apiary should be tested with many apiaries in order to confirm this result.

With organic treatment, mite susceptibility to amitraz and tau-fluvalinate is high (Table 3 and 4, Fig 3). We also found that the amitraz slope was higher than the tau-fluvalinate slope (Table 3) (Kamler et al. 2016). This indicates that mites are more susceptible to the variation of amitraz concentrations than to the tau-fluvalinate ones. Concerning other mites, the development of resistance to amitraz appears slowly (Jonsson and Hope 2007) and the resistance ratio is much lower (between 2 and 10) than for tau-fluvalinate (between 10 and 1000) (Li et al. 2004; Chevillon et al. 2007). This could explain why, in beekeeping, amitraz resistance is so discreet but still present (Maggi et al. 2010; Kamler et al. 2016; Rinkevich 2020). A recent study highlighted the relation between mite susceptibility to amitraz and field effectiveness with Apivar® (Rinkevich, 2020). When varroa mites are resistant, the field efficiency of the treatment decreases ($a=-1.49$, $R^2=0.89$).

The results of mite susceptibility in France show that many mites present resistance to amitraz or to tau-fluvalinate, and that it is probably a result of the preceding treatment strategy (Fig 3). However, as has been observed for tau-fluvalinate in some countries (Elzen and Westervelt, 2004; Jonsson and Hope, 2007; Milani and Vedova, 2002; Panini et al., 2019), without treatment (pressure selection), resistance decreases (Fig 4). An interesting point is that no high level of resistance was observed in both tau-fluvalinate and amitraz (Fig 4.). This indicates that susceptibility to acaricides can be preserved if treatment application is controlled by Integrated Resistance Management (IRM) (Denholm 1998). Mites and ticks can develop multiple and cross-resistance. It has noticed in some tick populations, as *Rhipicephalus microplus* (Chevillon et al., 2007; Klafke et al., 2017), *Varroa destructor* (Kamler et al. 2016) and other mites (Van Leeuwen et al. 2010). If varroa mites develop high levels of

resistance to both tau-fluvalinate and amitraz, control strategy could be more complicated to set up. IRM must be applied before the frequency of high resistance increases in the population. Concerning pest management resistance, two strategies are applied to control pests as well as limit the development of resistance (Sudo et al., 2018): alternate treatment or mixture. To conserve the treatment efficiency, *Varroa destructor* resistance management should involve strategies, such as alternating chemicals and organic treatments in an integrated resistance management approach.

Acknowledgements

We acknowledge all the beekeepers, the veterinarians and the Association of Beekeeping Development in the Auvergne-Rhône-Alpes region (ADA AURA) for their participation in this project. We also would like to thank Robin Azemar and Roman Catherin for participating in the bioassay trial. We also would like to thank the reviewers for their advice and their participation in the improvement of the clarity of this article.

Funding

This study was supported by Vita beehealth, the Research and Training center Apinov, and the National Agency of the Technology Research (ANRT).

2. Compléments d'informations sur les stratégies de lutte

Les sensibilités des varroas à l'amitrazé et au tau-fluvalinate sont très hétérogènes en France (Figure 40) (carte mise à jour en 2020). Cette hétérogénéité peut s'expliquer par la diversité des pratiques de traitement des apiculteurs. En effet, les apiculteurs sont libres de choisir le traitement et leur fréquence pour gérer l'infestation de leurs colonies. Cette liberté apporte une grande diversité de méthodes de gestion des varroas en fonction des cheptels apicoles. Les ADA et la FNOSAD décrivent tous les ans les différentes stratégies et moyens de lutte employés par les apiculteurs (médicamenteux, biotechniques).

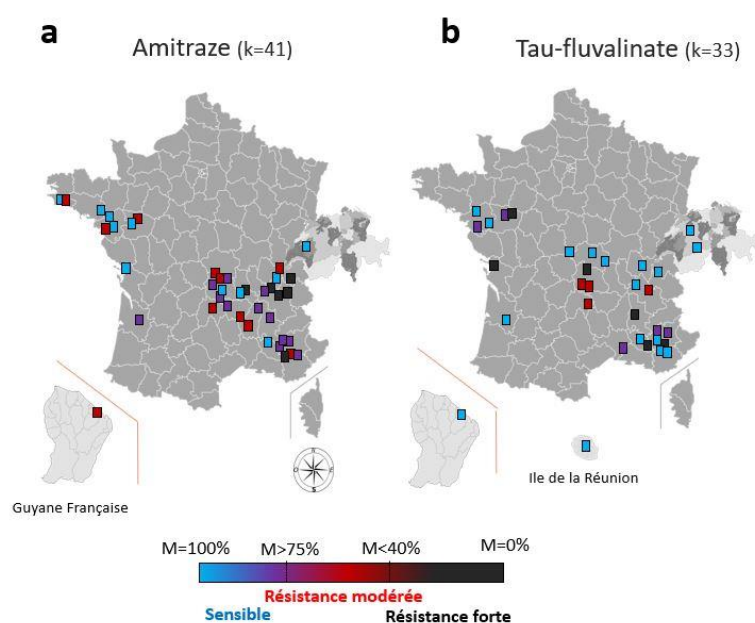


Figure 40: Localisation des populations de varroas et de leur mortalité à la CL90 à l'amitrazé (a) et au tau-fluvalinate (b) (mise à jour en 2020). Les carrés bleus indiquent les populations avec une forte proportion de varroas sensibles et les carrés noirs les populations de varroas avec une forte proportion de varroas résistants.

Les populations de varroas ont été classées en fonction des différents moyens de lutte employés par l'apiculteur. Pour certains groupes, peu de populations ont été testées, dans des environnements différents et avec des apiculteurs différents. C'est pourquoi, les résultats présentés ici permettent d'apporter des éléments de discussion sur les différentes pratiques mais aucune conclusion ne sera réalisée sur la meilleure stratégie de lutte à employer dans le cadre de la gestion des résistances.

2.1. Influence de l'utilisation d'amitrazé et du tau-fluvalinate sur la sensibilité des varroas

De manière générale, les populations de varroas en contact régulier avec de l'amitrazé présentent une sensibilité à l'amitrazé plus faible que les populations de varroas de référence échantillonnées

(traitements biologiques) (Test de Wilcoxon, $W=464$, $p=9.1 \times 10^{-3}$) (Figure 41). En effet, l'amitrazé entraîne une pression de sélection sur la population de varroas qui augmente la proportion de varroas résistants. Néanmoins, les populations échantillonnées présentent une faible proportion de varroas résistants au tau-fluvalinate, principalement parce que peu d'apiculteurs utilisent le tau-fluvalinate en France (Figure 41). En l'absence de pression de sélection avec du tau-fluvalinate, les varroas retrouvent donc leur sensibilité au tau-fluvalinate comme cela a été observé dans d'autres régions (Milani and Vedova, 2002; Panini et al., 2019). Néanmoins, certaines populations échantillonnées chez des apiculteurs n'utilisant pas d'amitrazé présentaient une sensibilité moyenne à l'amitrazé et au tau-fluvalinate (Mortalité 75-40%). Ces résultats pourraient s'expliquer par la dérive des abeilles lors de transhumances sur des zones à haute densité de ruches, comme c'est le cas sur la miellée de lavande en Provence-Alpes-Côte-D'Azur (Forfert et al., 2015; Frey and Rosenkranz, 2014). Inversement certaines populations de varroas en contact régulier avec de l'amitrazé présentent une forte sensibilité à l'amitrazé (Mortalité >75%). Ces résultats montrent que certaines pratiques influencent la présence de varroas résistants dans une population.

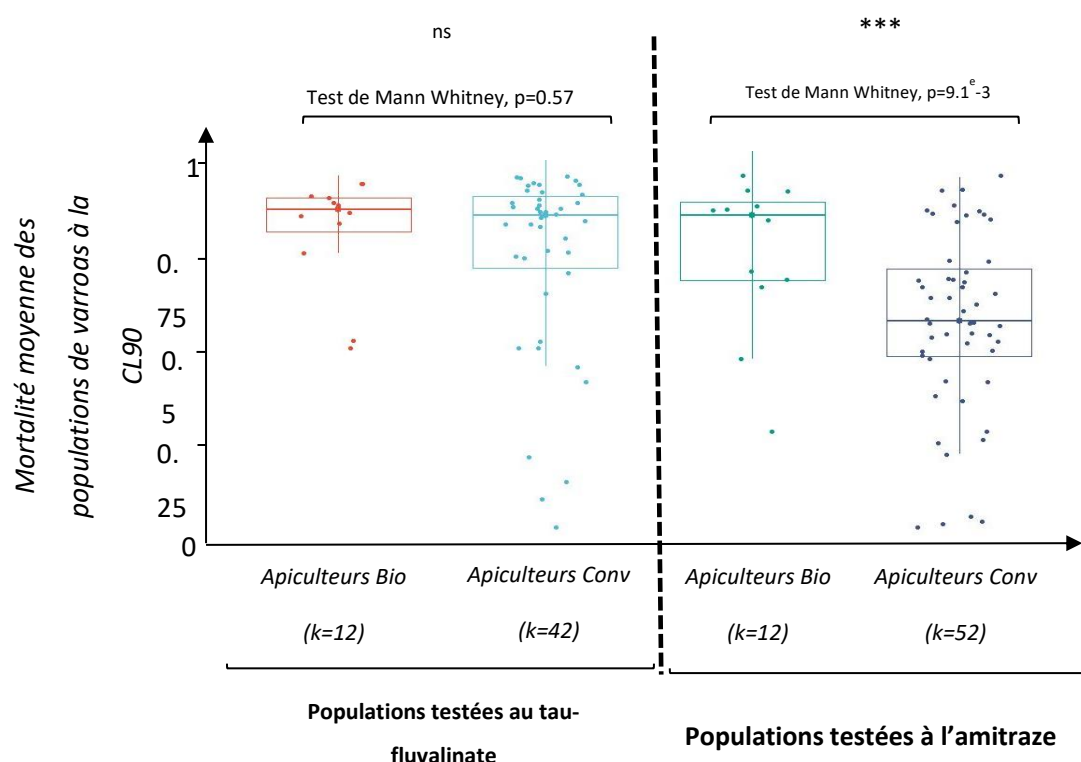


Figure 41: Représentation des sensibilités au tau-fluvalinate et à l'amitrazé (CL90) des populations de varroas prélevées chez des apiculteurs pratiquant l'apiculture biologique et conventionnelle. Chaque point représente une population de varroas différente

2.2. Traitements avec Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) et hors AMM

Les pratiques de traitements pourraient expliquer la variabilité de sensibilité des varroas à l'amitraz. En effet, les apiculteurs peuvent utiliser des traitements différents à base d'amitraz : Apivar®, Apitraz® et des traitements hors AMM (à base de Taktik®) (non autorisés). Seulement 7 populations de varroas d'apiculteurs utilisant des traitements hors AMM ont pu être testées contre 28 qui utilisent des traitements avec AMM. Nous ne ferons donc pas de conclusion généralisée de ces observations. D'après nos échantillons, les apiculteurs qui utilisent des traitements hors AMM à base d'amitraz présentent des populations de varroas moins sensibles à la CL90 (donc plus résistantes) que les apiculteurs utilisant des traitements avec AMM. La différence entre les deux groupes n'est pas significativement différente ; elle est probablement due à la différence de taille d'échantillon (Test de Wilcoxon, $W=104$, $p=0.059$) (Figure 42). Les caractères pharmacocinétiques qui diffèrent entre deux traitements pourraient influencer la sensibilité/résistance des varroas. Une étude à plus grande échelle devrait être réalisée pour confirmer ces observations.

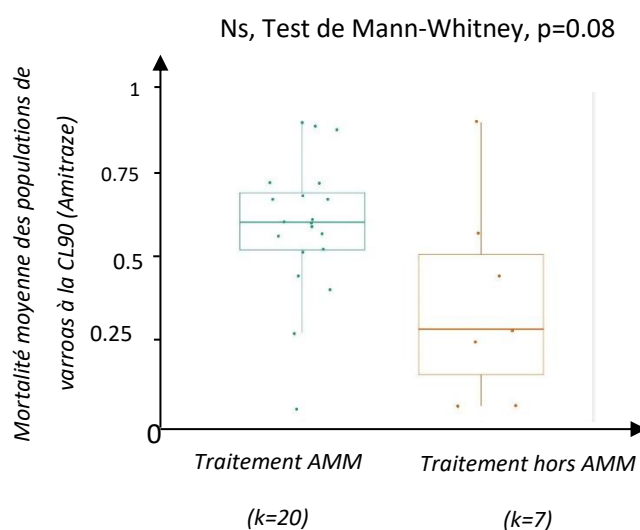


Figure 42: Mortalité des varroas à l'amitraz (CL90) entre des populations provenant d'apiculteur traitant en conventionnelle avec des traitements avec autorisation de mise sur le marché (AMM) et hors AMM

2.3. Autres facteurs liés à la sensibilité des varroas

1) Posologie des traitements

Même lorsque deux apiculteurs utilisent le même traitement, certaines actions peuvent avoir des effets sur la sensibilité des varroas à l'acaricide. Par exemple, certains apiculteurs vont modifier la durée de pose des lanières dans la colonie. La plupart du temps, les lanières sont laissées plus longtemps que la durée indiquée dans le résumé caractéristique produit (RCP) (Kretzschmar et al.,

2019). Il n'est même pas rare qu'un traitement soit laissé tout l'hiver et enlevé au printemps (soit 28 semaines au lieu des 10 semaines maximum légales). Les apiculteurs espèrent une meilleure efficacité du traitement en utilisant cette pratique, néanmoins le risque de sélection de varroas résistants peut potentiellement augmenter. Bien que ce résultat n'ait jamais pu être prouvé chez le Varroa, l'influence de la durée de traitement sur le risque de développement de résistance a déjà été mise en évidence chez d'autres insectes et acariens (FAO, 2013).

2) Lutte alternée

Depuis quelques années, certains Groupements de Défense Sanitaires Apicole (GDSA) proposent aux apiculteurs des lutttes alternées pour limiter le développement de résistances du varroa. Ces lutttes alternées proposent bien souvent une alternance entre les traitements à base d'amtiraze (Apivar® et Apitraz®) et de tau-fluvalinate (Apistan®). Elle est utilisée dans la gestion des résistances de certains insectes/acariens grâce sa simplicité de mise en place (Onstad, 2013; Roush, 1989) bien que celle-ci ne soit pas toujours la plus efficace (Sudo et al., 2018). Pour la gestion des résistances chez *V. destructor*, la mise en place d'une lutte alternée est également la plus simple à mettre en place pour les apiculteurs. Les populations de varroas testées à l'amtiraze chez des apiculteurs qui pratiquent la lutte alternée (sensibilité moyenne à l'amtiraze de 0.62 ± 0.03) ne présentent pas de sensibilité significativement différente avec des populations de varroas prélevées chez des apiculteurs utilisant l'amtiraze depuis plusieurs années sans alternance (sensibilité moyenne à l'amtiraze de 0.5 ± 0.05) (Test de Wilcoxon, $W=197.5$, $p=0.19$) (Figure 43). Néanmoins, aucune population échantillonnée chez des apiculteurs pratiquant la lutte alternée ne présente une forte proportion de varroas résistants à l'amtiraze (Figure 43). Nous pouvons donc supposer que dans la gestion de résistance à l'amtiraze, la lutte alternée permettrait de limiter le risque de sélectionner des populations de varroas avec une forte proportion de varroas résistants mais n'empêche pas d'avoir une population modérément résistante.

En France, le tau-fluvalinate sous forme d'Apistan® est utilisé uniquement en lutte alternée pour éviter le retour de résistances des varroas. D'après des données issues d'une seule région, les apiculteurs pratiquant la lutte alternée avec le tau-fluvalinate présentent des populations de varroas plus résistants que les apiculteurs n'utilisant plus de tau-fluvalinate (Test de Mann Whitney, $W=40.5$, $p=2.4e-3$) (Figure 43). Les populations de varroas sans contact avec le tau-fluvalinate depuis plusieurs années présentent une sensibilité élevée au tau-fluvalinate (Figure 43). Cette information indique que les varroas sont capables de retrouver leur sensibilité au tau-fluvalinate comme cela a été montré par plusieurs études (Milani and Vedova, 2002; Panini et al., 2019). L'évaluation du temps nécessaire à une population pour perdre une résistance, appelé période de réversion, est un préalable à la mise en place

de la lutte alternée. Dans la limite des éléments à notre disposition, nous n'avons pas pu conclure quant à une période de réversion nécessaire pour l'amitraze ou le tau-fluvalinate.

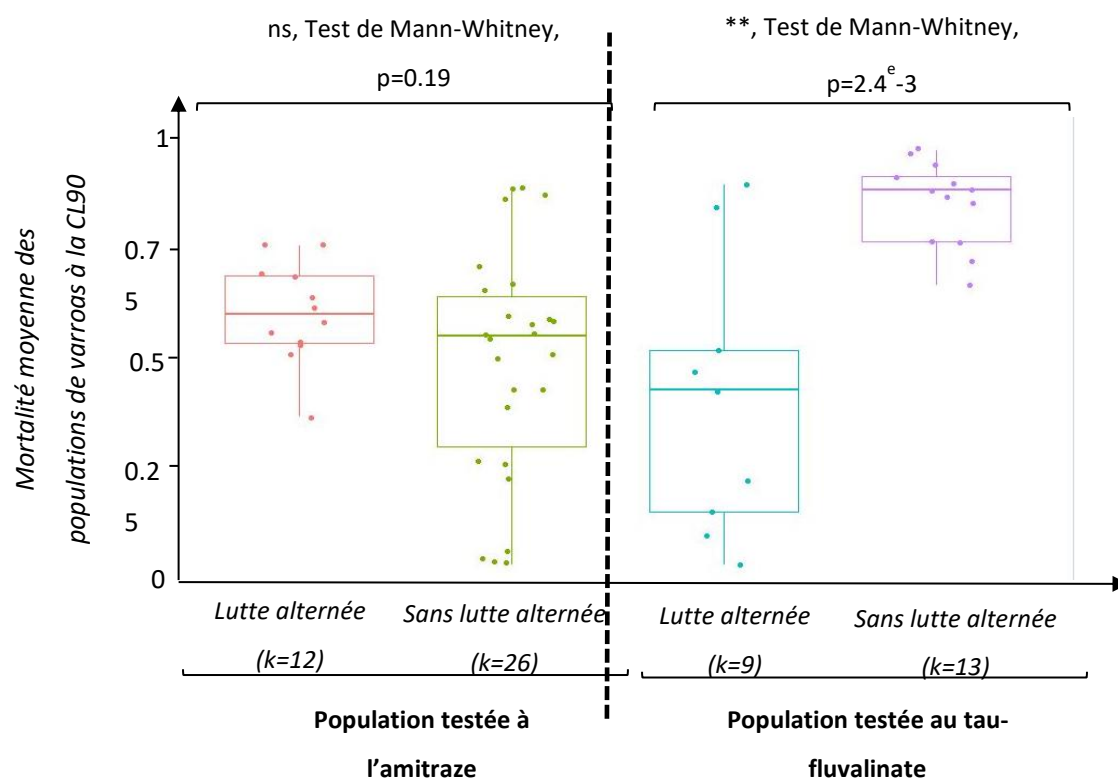


Figure 43: Mortalité de plusieurs populations de varroas à la CL90 (amitraze et tau-fluvalinate) sur des populations où la lutte alternée entre Apivar® et Apistan® a été mise en place ou non par l'apiculteur

Traitement hivernal, une lutte alternée ?

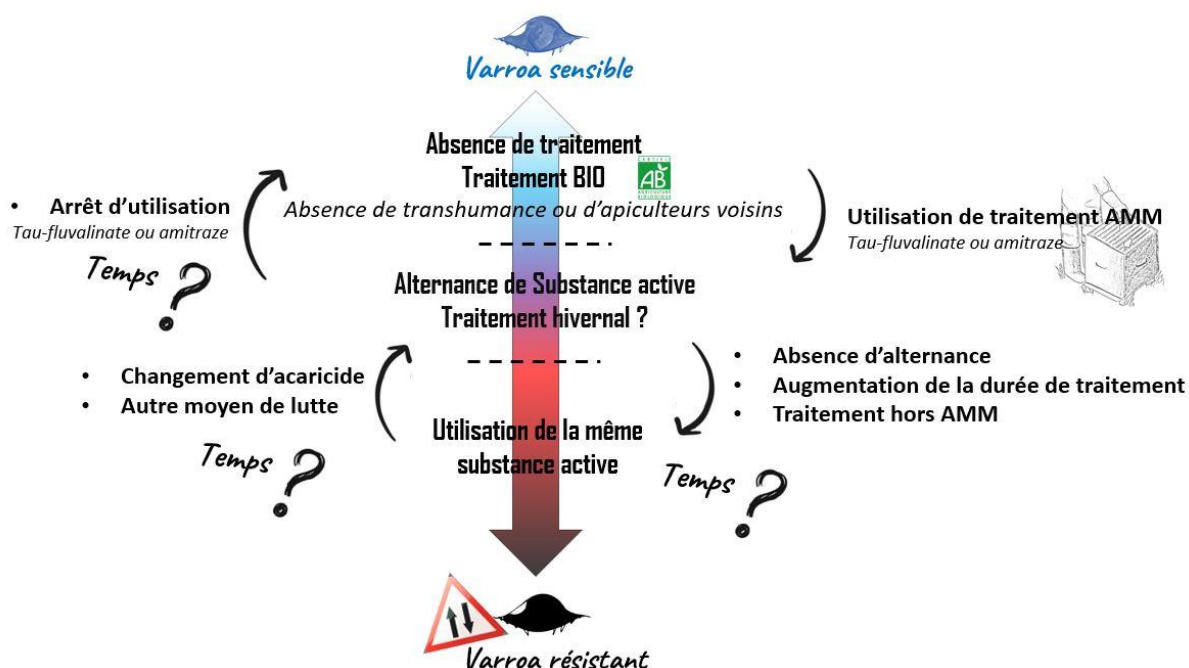
La plupart des apiculteurs appliquent un second traitement à base d'acide oxalique en hiver. Ce traitement hivernal pourrait être considéré comme une lutte alternée puisqu'une autre substance active est utilisée en été, notamment l'amitraze ou le tau fluvalinate. Empiriquement, les données de terrain montrent que l'utilisation de ce second traitement ne permet pas de réduire la proportion de varroas résistants à l'amitraze. En effet, 90% des populations de varroas fortement résistantes à l'amitraze sont traitées avec un traitement hivernal à l'acide oxalique (k=10). Nous pouvons poser l'hypothèse que la période entre les deux traitements n'est pas suffisante pour perdre la résistance. L'utilisation d'un traitement à l'acide oxalique en hiver pourrait correspondre à une stratégie de lutte alternée si les varroas résistants à l'amitraze ou au tau-fluvalinate étaient plus sensibles à l'acide oxalique. A ce jour, aucune étude n'a pu mettre en évidence que le traitement hivernal pouvait être utilisé dans la stratégie de lutte alternée.

Conclusion Chapitre 2

L'utilisation de traitements acaricides entraîne une pression de sélection sur les varroas qui induit le développement de résistances. Bien que de nombreuses informations soient encore manquantes pour proposer une stratégie de lutte adaptée contre le varroa, nous avons pu apporter de nouvelles informations concernant l'état de résistance au tau-fluvalinate et à l'amitraz en France.

1. La résistance au tau-fluvalinate est toujours présente en France. Cependant, lorsque les apiculteurs n'ont pas traité avec de l'Apistan® depuis plusieurs années, leurs populations de varroas présentent une sensibilité au tau-fluvalinate comparable aux populations sensibles de référence. Le tau-fluvalinate doit être obligatoirement utilisé dans une stratégie de lutte alternée pour permettre aux varroas de perdre leur résistance les années suivantes.
2. La résistance à l'amitraz a été mise en évidence chez de nombreuses populations en France. Il existe encore des populations de varroas sensibles à l'amitraz. Le retour à des populations sensibles ou avec une résistance moyenne devrait être possible avec de bonnes pratiques.

Nous disposons de peu d'informations sur la période de réversion des varroas (temps pour perdre une résistance), notamment en ce qui concerne l'amitraz. Pourtant il est nécessaire de la connaître pour conseiller des stratégies de lutte aux apiculteurs qui permettraient de retrouver une sensibilité suffisante aux différentes substances acaricides.

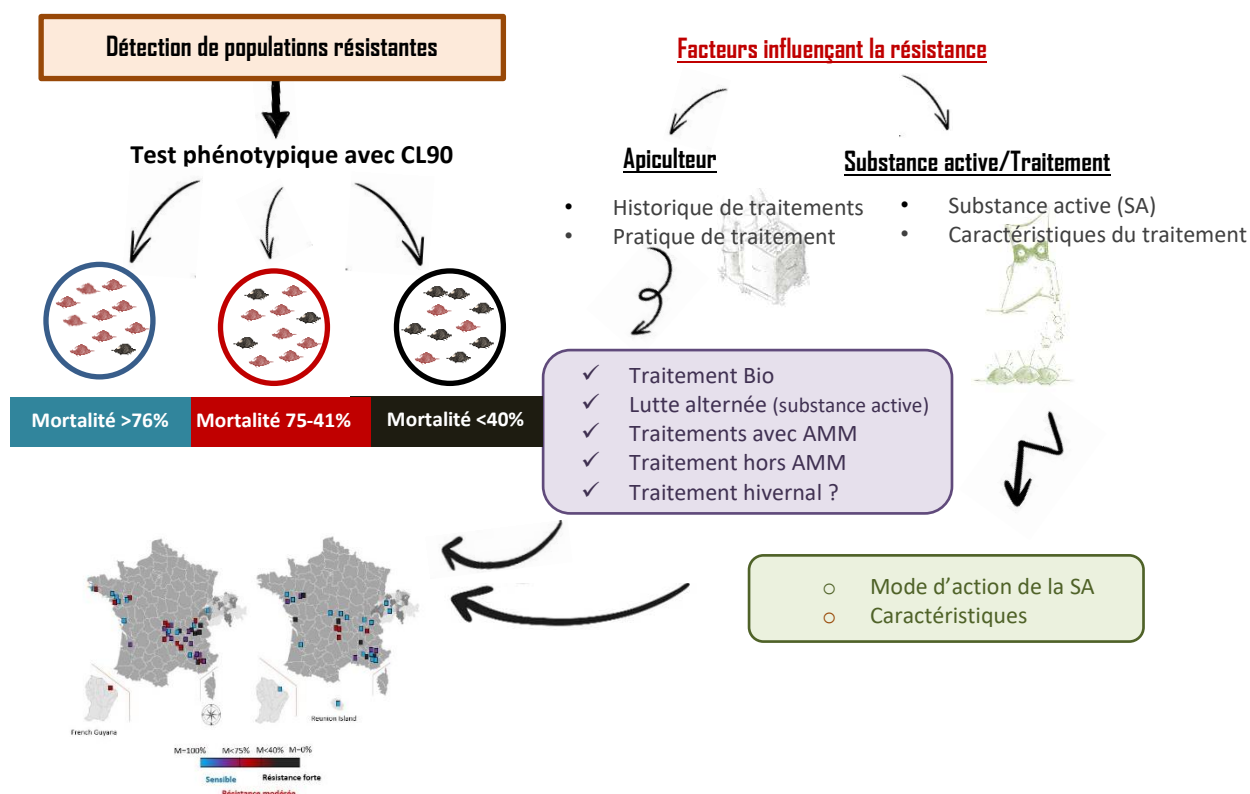


Conclusion Partie 1

Cette partie nous a permis de valider la méthode pour détecter la présence de résistances au tau-fluvalinate et à l'amitraze dans une population de varroas. Parmi l'ensemble des méthodes existantes, nous avons choisi la méthode précédemment décrite par Maggi et ses collaborateurs en 2008. Avec cette méthode, nous avons choisi d'évaluer la proportion de varroas résistants d'une population en testant une concentration discriminante (CL90). En fonction de la proportion de varroas résistants dans la population, ces dernières sont réparties en 3 classes : sensibles (Mortalité >76%), résistance modérée (Mortalité 75-41%) et résistance forte (Mortalité <40%).

Les apiculteurs traitant les colonies sans amitraze ou tau-fluvalinate ont des populations de varroas plus sensibles que les autres apiculteurs. Plusieurs facteurs, dont certains semblent maîtrisables par l'apiculteur, peuvent influencer la proportion de varroas résistants dans une population (historique de traitement et stratégies de lutte). Différentes stratégies de lutte pourraient être employées pour gérer les résistances de varroas aux acaricides.

D'autres facteurs ne dépendent pas du choix de la substance active par l'apiculteur mais du traitement en lui-même. Le risque de développer une résistance peut dépendre des caractéristiques pharmacocinétiques du traitement. Ces facteurs seront développés dans la partie 2 qui présentera les paramètres impliqués dans l'efficacité du traitement et l'influence d'une résistance sur l'action du traitement.



« Je recherche l'or du temps »

André Breton

Partie 2 : Modélisation de l'efficacité des

traitements acaricides sur Varroa

Les varroas ont développé des résistances à l' amitraze et au tau-fluvalinate. La présence de varroas résistants dans la population induit une baisse d'efficacité du traitement. Or, la relation entre la proportion de varroas résistants à l' amitraze et l'efficacité du traitement sur le terrain n'a jamais été mise en évidence. La méthode de détection de résistance développée en laboratoire permettrait de faire le lien entre la proportion de varroas résistants dans la population et l'efficacité du traitement sur le terrain.

L'objectif de cette partie est d'étudier l'influence de différents paramètres sur l'efficacité du traitement. Nous décrirons notamment les paramètres qui exercent une influence sur l'action du traitement et sur la population de varroas. L'étude de ces paramètres permettra de comprendre comment la proportion de varroas résistants dans une population influence l'efficacité d'un traitement. Pour comprendre cela, nous utiliserons un modèle de dynamique de population de varroas dans lequel nous inclurons l'action du traitement Apivar®. A partir de données issues du terrain et du modèle mathématique, nous comparerons l'action de deux traitements à base d' amitraze sur une population de varroas. Cette partie sera présentée sous forme de 2 chapitres :

- Chapitre 3 : Modélisation de l'action du traitement Apivar® sur la dynamique de population de varroas et influence d'une résistance à l' amitraze (article en révision).
- Chapitre 4 : Influence des caractéristiques de traitements à base d' amitraze sur l'efficacité (article en préparation)

Chapitre 3 : Modélisation de l'action du traitement Apivar® sur une population de varroas et influence d'une résistance à l'amitrazé

Avant-propos

La révélation de la présence de résistance à l'amitrazé du varroa en France implique un suivi d'efficacité des traitements à base d'amitrazé. Ces dernières années, les suivis réalisés par la FNOSAD ont conduit à une observation de baisse d'efficacité du traitement Apivar® et Apitraz® chez certains apiculteurs. La relation entre la présence de varroas résistants et l'efficacité du traitement sur le terrain n'a toutefois pas encore été établie. En effet, d'autres paramètres peuvent influencer l'efficacité du traitement.

L'objectif de ce chapitre 3 est d'évaluer les différents paramètres pouvant influencer l'efficacité du traitement Apivar® (traitement le plus utilisé par les apiculteurs). Les trois paramètres développés ayant une influence sur l'action du traitement sont :

- 1) La période de traitement (date de début de traitement)
- 2) L'infestation initiale de la colonie au printemps qui induit l'infestation en pré-traitement
- 3) Le taux de mortalité quotidien des varroas lié à la substance active du traitement

L'étude de ces paramètres permettra d'évaluer comment le traitement Apivar® agit sur la population de varroas *via* la simulation du nombre de varroas morts par jour. Nous avons choisi de simuler la proportion de varroas résistants dans la population en modifiant le taux de mortalité quotidien lié au traitement. Ce dernier diminue d'autant que la population de varroas est résistante à l'amitrazé.

Modelling the impact of Apivar® treatment on a *Varroa* mite population and the influence of resistance

Almecija G.^{1,2}, Poirot B.¹, Ventelon M.³ & Suppo C.²

¹ Apinov, Scientific Beekeeping & Training Center, 10 rue Henri Bessemer, 17140 Lagord, France

² Institut de Recherche sur la Biologie de l’Insecte, UMR 7621, CNRS-Université de Tours, 37200 Tours, France

³ Association for the Development of Beekeeping in Auvergne Rhône Alpes (ADA AURA), 9 allée de Fermat, 63170 Aubière, France

Authors’ contributions

Gabrielle Almecija: Developed the model, analysed all the data, evaluated mite resistance in the laboratory and contributed to the drafting of the manuscript.

Benjamin Poirot: Drafting of the manuscript and critical revision for important intellectual content.

Marie Ventelon: Participated in the acquisition and analysis of field data

Christelle Suppo: Developed the treatment model and participated in the drafting of the manuscript.

Publié dans Pest Management Science

Abstract

BACKGROUND: *Varroa destructor* is a parasite of honeybees. It causes biological damage leading to the colony collapse in the absence of treatment. In recent years, acaricide resistance has emerged in *Varroa* mites, leading to a decrease in treatment efficacy. We modelled the action of Apivar® (amitraz) treatment, using three input parameters: treatment duration, treatment period, and daily mortality due to the treatment. The output parameters were cumulative mite mortality during treatment, the residual number of *Varroa* mites, and treatment efficacy, expressed as a percentage.

RESULTS: The model was validated by monitoring efficacy in the field, in 36 treated hives. According to the model, treatment in the absence of brood is optimal. For a long period without egg laying during the winter, an initial infestation of 100 mites and a start date for treatment of August 7th, a minimal treatment efficacy of 98.8% is required for stabilisation of the population for year to year. More effective treatment is associated lower cumulative numbers of dead *Varroa* mites over the entire treatment period. Thus, the total number of dead mites observed during the monitoring of field efficacy provides information about more than just the initial level of colony infestation. The proportion of resistant mites can be modeled by a decreased of daily mortality rate influencing treatment efficacy. Management of the initial *Varroa* mite infestation of the colony by the beekeeper can compensate for the decrease in treatment efficacy for resistance thresholds of up to 40% of resistant mites.

CONCLUSION: Treatment efficacy depends on several parameters, including initial level of infestation, treatment period and the presence of acaricide resistance. Amitraz resistance may lead to treatment failure, even if the beekeeper is able to keep initial infestation rates low.

Keywords: Honeybee, Amitraz, Beekeeping, Management

1. Introduction

The honeybee (*Apis mellifera*) has been used in beekeeping for thousands of years (Crane, 1999). However, over the last few decades, beekeepers around the world have reported the collapse of a large number of bee colonies (Ellis et al., 2010; Potts et al., 2010; vanEngelsdorp et al., 2009). France is among the countries affected (Mackowiak, 2009). Human activities, decreasing floral resources and causing pollution, (Cochard et al., 2021; Durant, 2019; Henry et al., 2017; Sanchez-Bayo and Goka, 2014) climate change, (Le Conte and Navajas, 2008) and the emergence of new pathogens have been implicated in colony collapse disorder (McMenamin and Genersch, 2015; Mondet et al., 2014). In particular, since the 1970s, a mite originating from Asia, *Varroa destructor*, has spread throughout the

world and is now one of the principal pathogenic agents in bee hives (Le Conte et al., 2010; Traynor et al., 2020). *Varroa* mites cause a disease called varroosis, which, in the absence of acaricide treatment at the end of the summer, can lead to the loss of overwintering (Boecking and Genersch, 2008; Rosenkranz et al., 2010). Acaricidal treatments can be used to keep the mite population below the critical pathological threshold for the colony (Beyer et al., 2018; Dooremalen et al., 2012). In temperate climates, two treatments per year may be required to manage mite infestations in bee colonies: one treatment at the end of the summer, and another during the winter (Cahier technique, 2019). Furthermore, the emergence of resistance to acaricidal agents (tau-fluvalinate, flumethrin, coumaphos, amitraz) has led to a decrease in treatment efficacy (Rinkevich, 2020; Trouiller, 1998).

Different treatments and active ingredients with acaricidal action are authorised in different countries. Certain criteria must be satisfied before treatment is authorised: treatment efficacy and safety for bees, beekeepers and consumers. In Europe, conventional treatments with an authorisation for market release (AMM) must have an efficacy of more than 95% (Céline, 2018). In addition to their efficacy against *Varroa* mites, authorised treatments must not be lethal to bees and must not be detectable in the honey. The most widely used treatment in France is Apivar® (strip treatment), based on the active ingredient amitraz (Cahier technique, 2019). Treatment efficacy depends on several input parameters. The pharmacological parameters of the agent used, such as its pharmacokinetics (the amount of active ingredient released per day) and dose (treatment duration) may influence its efficacy. Biological parameters linked to the mite or to beekeeping practices, such as the level of colony infestation, brood levels, the level of resistance to the active agent in the mites, reinfestation and treatment periods may also modify treatment efficacy (Gracia et al., 2017).

Most models simulating the impact of treatment on the mite population apply a decrease in the mite population corresponding to the percent efficacy of the treatment (Calis et al., 1999). These models do not take into account the effects of the parameters cited above on treatment efficacy. At hive level, not all the elements required are available, and it is therefore difficult to interpret treatment efficacy fully. In particular, the initial number of mites in the colony is unknown. Modelling based on field data could help to explain how Apivar® treatment acts on the mite population. We describe and rank the parameters underlying treatment efficacy. To our knowledge, the various parameters contributing to treatment efficacy have never before been studied in this way. Our objective here was to define the parameters that beekeepers should check as a matter of priority, to optimise Apivar® treatment efficacy. The emergence of resistance to the acaricidal agent has been shown to modify treatment efficacy (Adjlane et al., 2012; Rinkevich, 2020). Our model also explains the effect of resistance on the efficacy of Apivar® treatment.

2. Materials and methods

2.1 The model

In our mechanistic model, we aimed to analyse the effect of Apivar® treatment on the dynamics of the *Varroa* mite population during the period of treatment application. Unlike most *Varroa* models, this model does not focus on the effect of the mites on the bees. We developed a model based on a previously developed population dynamics model for *Varroa* mites (Calis et al., 1999). This model was programmed in RStudio version 1.3.1093 software, with the addition of input parameters relating to treatment. These parameters can be used to evaluate the daily effect of treatment on the *Varroa* population. The dynamics of the bee population must first be simulated (2.1.1), followed by the dynamics of the natural *Varroa* mite population (2.1.2), and, finally, the dynamics of the *Varroa* population in the presence of treatment (2.1.3).

2.1.1 Dynamics of the bee population

We modelled the dynamics of a healthy population of bees in a temperate climate, with a long and total cessation of egg-laying during the winter period (Fig.1 and Table 1) as it is used by some studies (Beaurepaire et al., 2017; Calis et al., 1999; Martin, 1998). Equation (1) represents the temporal dynamics of the adult bee population over a period of one year, $H(t)$. Equations (2A) and (2b) correspond to the brood dynamics of the workers, $B_w(t)$ and the drones, $B_d(t)$, respectively. The dynamics of mite populations depend on the dynamics of the worker bee population and the proportions of the brood corresponding to drones and workers, which we have dissociated here.

Table 1: Presentation of the various fixed factors in the model of bee population dynamics

Fixed factors	Time period concerned	References
Complete cessation of egg laying during the winter period	November 1 st to February 29 th	(Beaurepaire et al., 2017)
Decrease in laying	June 8 th	(Beaurepaire et al., 2017; Calis et al., 1999)
Recommencement of summer laying	July 18 th	(Beaurepaire et al., 2017)

$$H(t) = a + b \times \frac{1}{S_1\sqrt{\pi}} \exp\left(-\frac{(t-M_1)^2}{2S_1^2}\right) + c \times \frac{1}{S_2\sqrt{\pi}} \exp\left(-\frac{(t-M_2)^2}{2S_2^2}\right) \quad \text{Equation (1)}$$

$$Bw(t) = a + b \times \frac{1}{S_1\sqrt{\pi}} \exp\left(-\frac{(t-M_1)^2}{2S_1^2}\right) + c \times \frac{1}{S_2\sqrt{\pi}} \exp\left(-\frac{(t-M_2)^2}{2S_2^2}\right) + d \times \frac{1}{S_3\sqrt{\pi}} \exp\left(-\frac{(t-M_3)^2}{2S_3^2}\right) \quad \text{Equation (2a)}$$

$$Bd(t) = a + b \times \frac{1}{S_1\sqrt{\pi}} \exp\left(-\frac{(t-M_1)^2}{2S_1^2}\right) + c \times \frac{1}{S_2\sqrt{\pi}} \exp\left(-\frac{(t-M_2)^2}{2S_2^2}\right) \quad \text{Equation (2b)}$$

With the values for these parameters indicated in Table 2.

Table 2: Description of the parameters of the model of bee population dynamics: workers, proportions of the brood corresponding to workers and drones

	a	b	c	d	S ₁	M ₁	S ₂	M ₂	S ₃	M ₃
Worker bees	10000	4500000	300000	/	50	180	15	241	/	/
Worker bee brood	0	2600000	380000	500000	40	158	17	220	25	250
Drone brood	0	30000	9000	/	30	130	30	190	/	/

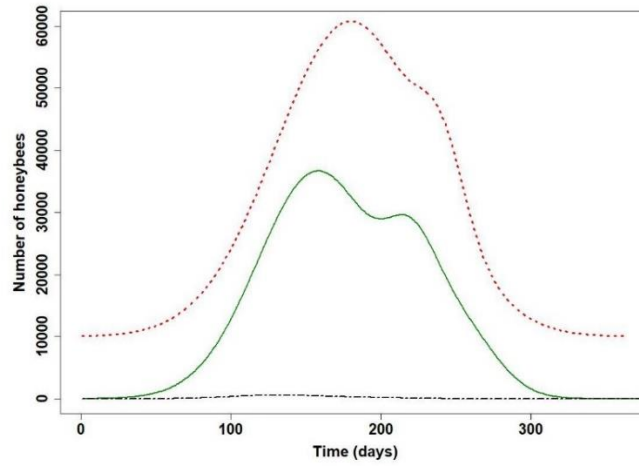


Figure 1: Dynamics of the bee population: workers (red dotted line), worker bee brood (green solid line) and drone brood (black double-dashed line)

2.1.2 Dynamics of the Varroa mite population

The *Varroa* population dynamics model is a discrete-time model with increments of one day. This time step makes it possible to compare the data of this model with those gathered in the field. The model

is compartmental (Fig. 2). Each compartment represents a category of *Varroa* mites: phoretic mites and mites in the brood (worker or drone brood). At the end of the winter period, the phoretic mites, $P(t)$, infest the worker brood, $lw(t)$, and the drone brood, $ld(t)$. The mites reproduce in the worker and drone broods for 12 and 14 days, respectively. The number of mites present the worker and drone broods is denoted $lbw(t)$ and $lbd(t)$, respectively. At the end of the reproduction cycle, the mites emerge from the cells with their descendants, denoted $E(t)$ (Appendix 1). The mortality of the phoretic mites is denoted $M(t)$ (equations 4 and 5). The model, like that of Calis et al. (1999), is based on two hypotheses: 1) cells do not present multiple infestations. There is only one mite per cell, and 2) the model is a closed system and there is, therefore, no reinfestation. However, we have also added a third hypothesis: 3) the phoresis phase lasts five days (Martin, 1998).

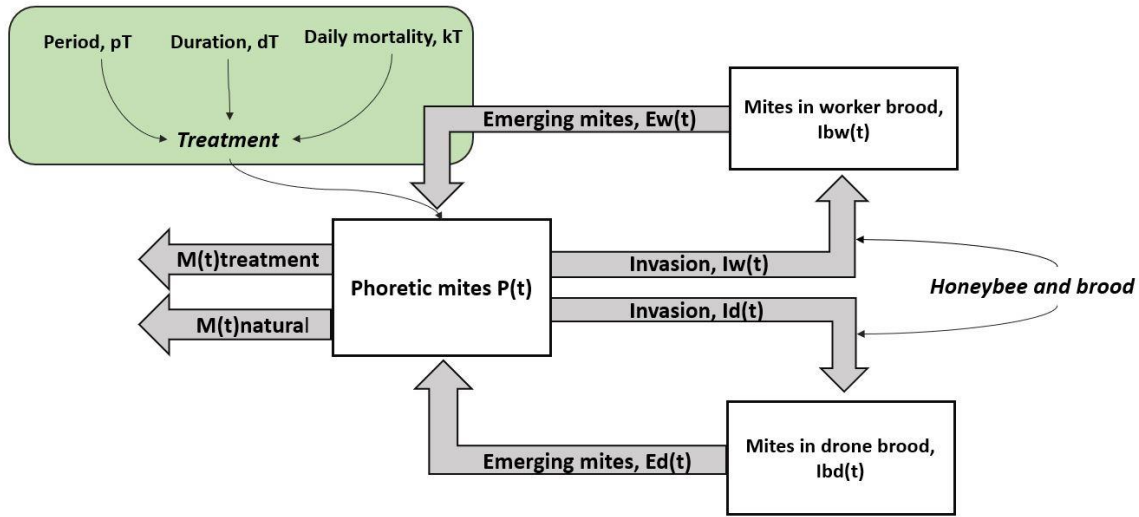


Figure 2: Representation of the compartmental model of the dynamics of the mite population. The grey arrows indicate the flow of mites between the various stages (phoretic or in the brood). The black arrows indicate the effect of the parameters on the mites. The green shape indicates the parameters involved (pT , dT , kT) in the impact of treatment on the population of phoretic mites, $P(t)$.

Equation (4) models the dynamics of the phoretic mite population, $P(t)$.

$$\begin{cases} P(1) = P_i > 0 \\ P(t) = P(t-1) - I(t) + E(t) - k \times P(t) \text{ for } t \geq 2 \end{cases}$$

Equation (4)

In the absence of treatment, the daily mortality rate, k , corresponds to natural mortality (k_{natural}).

During the treatment period, it corresponds to the natural mortality rate plus mortality due to

treatment (kT). Cumulative mortality, $Mcum_{MODEL}(t)$, corresponds to the cumulative number of mite deaths (Equation 5).

$$Mcum_{MODEL}(t) = \sum_{t=pT}^{pT+dT} M(t) \quad \text{Equation (5)}$$

The infestation of the cells with mites, $I(t)$ (Equation 6) depends on the amount of brood available in the colony, evaluated as rw and rd for the worker and drone broods, respectively (equations 7a and 7b). The rate of infestation for cells of the worker brood ($Iw(t)$) or the drone brood ($Id(t)$) varies according to equations (8a and 8b). $Ib(t)$ is the number of mites present in the worker and drone broods at time t (equation 9). The number of mites emerging from the cells, $E(t)$, is represented by equation 10. Equations 11a and 11b distinguish between mites emerging from the cells of the worker and drone broods. The details of each parameters is described on the table 3.

$$\text{For } t \geq 60, I(t) = P(t - \tau) \times (1 - \exp(-rw(t) + rd(t))) \quad \text{Equation (6)}$$

$$rw(t) = \frac{0.56 \times Bw(t)}{H(t)} \quad \text{and} \quad rd(t) = \frac{6.49 \times Bd(t)}{H(t)} \quad \text{Equations (7a and 7b)}$$

$$Iw(t) = \frac{I(t) \times rw(t)}{(rw(t) + rd(t))} \quad \text{and} \quad Id(t) = \frac{I(t) \times rd(t)}{(rw(t) + rd(t))} \quad \text{Equations (8a and 8b)}$$

$$Ib(t) = \sum_{\beta=0}^{12} I(t - \beta) \quad \text{Equation (9)}$$

$$E(t) = Ew(t) + Ed(t) \quad \text{Equation (10)}$$

$$\text{where } Ew(t) = Iw(t - C_w) \times rs_w \quad \text{and} \quad Ed(t) = Id(t - C_d) \times rs_d \quad \text{Equations (11a and 11b)}$$

Table 3: Description of the various parameters and variables use for the mite population model.

Parameters of the mite model	Description	Values	References
$k_{\text{natural}} (\text{summer})$	Natural mite mortality in summer	0.03	-
$k_{\text{natural}} (\text{winter})$	Natural mite mortality in winter	0.004	-
C_w	Duration of worker cell operculation	12 days	
C_d	Duration of drone cell operculation	14 days	
rs_w	Reproductive success in the worker brood	1.56	(Calis et al., 1999)
rs_d	Reproductive success in the drone brood	2.34	(Calis et al., 1999)
τ	Duration of the phoretic phase in mites	5 days	(Martin, 1998)

2.1.3 Dynamics of the mite population with the application of treatment

We completed this model by integrating the effect of daily Apivar® treatment on the mite population. We defined a daily phoretic mite mortality constant over the entire period of treatment (Table 4). Three input parameters were used to model the action of treatment: treatment duration (dT), treatment period (pT) and the daily mortality rate linked to treatment (kT) (Table 4). The treatment period, pT, was counted in calendar days from the day on which the treatment started. For each simulation, two direct output variables were measured: the number of dead mites per day, $M_{\text{MODEL}}(t)$ and the cumulative number of mite deaths, $M_{\text{cumMODEL}}(t)$ (equations 5 and 6). Based on these output variables, the following indirect output variables were evaluated: the efficacy of the modelled treatment, the slope of the cumulative mortality curve over 70 days, modelled efficacy and the residual number of mites (Table 4). The influence of amitraz resistance in the mites was integrated into the model by decreasing the mortality rate, kT.

Table 4: Input and output variables linked to treatment

Input variables for treatment	Description	Variation
dT	Treatment duration	Variable, from 4 to 12 weeks
pT	Treatment period	Variable, from 190 to 250 calendar days
kT	Daily mortality $P(t)$ during treatment	Variable, from 0.03 to 1
Direct output variables	Description	
M(t)	Daily number of dead individuals	
$M_{cumMODEL}(t)$	Cumulative number of dead individuals	
Indirect output variables		
$S70_{MODEL}$	Slope of the 70-day cumulative mortality curve	
$Eff_{field\ MODEL}$	Field model efficacy	
$Eff_{Control\ MODEL}$	Control model efficacy	
$V_{remainingMODEL}$	Number of mites killed by the control treatment, after treatment with amitraz	

2.2 Evaluation of treatment efficacy

2.2.1 Efficacy of treatment in the field

Apivar treatment was monitored in the field by ADA AURA (The Apiculture Development Association of the Auvergne-Rhône Alpes Region, France). Efficacy was evaluated by ADA AURA, beginning on August 10th, 2020. ADA AURA monitored the efficacy of treatment with amitraz (Apivar®) on 36 hives in three apiaries (Apiary A, $n = 10$; Apiary B, $n = 11$, both at Silhac, and Apiary C, $n = 15$, at Aubières). Apivar® is an acaricidal treatment applied as conventional strips left in place for 10 weeks. The efficacy of treatment in the field, Eff_{FIELD} (Equation 12), was evaluated by counting the dead mites on sticky board placed under the hive. These sticky board were changed every three days throughout the treatment period. The cumulative mortality of mites over the entire 10-week treatment period ($M_{cumFIELD}$) was calculated by determining the total number of dead mites. After treatment, the queen was caged for 21 days (drone broodless). At the end of this period, all the mites were phoretic. At this time point, an oxalic acid treatment (Apibioxal®) was applied for one day. In France, Apibioxal presents

an efficacy of 90% in 2016. We suggested using an efficacy of 90% for the control treatment with the model. All the dead mites drop on the sticky board between the end of amitraz treatment and the end of the control treatment were considered to be remaining mites ($V_{remaining_FIELD}$).

$$Eff_{FIELD} = \frac{M_{cum_FIELD}}{M_{cum_FIELD} + V_{remaining_FIELD}} \times 100 \quad \text{Equation (12)}$$

2.2.2 Treatment efficacy according to the model

Based on the model, percent efficacy is evaluated in two ways: modelled field efficacy and modelled control efficacy. The modelled field efficacy (Eff_{field_MODEL}) is calculated from the results of a simulation of the method employed in the field (use of a control treatment; Equation 13). M_{cum_MODEL} is the cumulative number of dead mites during the treatment period. $V_{remaining_MODEL}$ is the number of mites killed by the control treatment, applied after the initial treatment. The modelled field efficacy is used to compare the data for the model with those obtained in the field.

$$Eff_{field_MODEL} = \frac{M_{cum_MODEL} \times 100}{M_{cum_MODEL} + V_{remaining_MODEL}} \quad \text{Equation (13)}$$

The modelled control efficacy ($Eff_{Control_MODEL}$) is calculated from the results of two simulations, one with treatment and one without treatment, comparing the number of residual mites in the colony on the same date (Equation 9). V_T is the number of residual mites in the colony after treatment on October 17th (71 days after the simulated treatment). V_{WT} is the total number of mites (phoretic mites and mites reproducing in the brood) in the colony in the absence of treatment, on October 17th.

$$Eff_{Control_MODEL} = 100 - \frac{V_T \times 100}{V_{WT}} \quad \text{Equation (14)}$$

2.3 Validation of the model

The model of the natural dynamics of mite populations was validated by Calis et al., 1999. Treatment modelling was validated with field data collected from 36 hives in three apiaries (A, B and C) by ADA AURA (see section 2.2.1). The data obtained were the number of dead mites during treatment, M_{cum_FIELD} , and the remaining number of mites after treatment, $V_{remaining_FIELD}$. Based on these data,

the following were evaluated in the field: the percent efficacy of treatment and the slope of the curve for the cumulative number of dead mites over 70 days ($S70_{\text{FIELD}}$).

Treatment duration, dT , was defined by the conditions of use for Apivar®. It was fixed at 10 weeks of treatment (the legal period for the use of this agent). The treatment period, pT , was fixed as beginning on August 7th in the model. The daily mortality rate during treatment, kT , was initially fixed so as to ensure that $\text{Eff}_{\text{field MODEL}}$ and $\text{Eff}_{\text{FIELD}}$ were similar. The initial infestation, P_i , was then fixed so as to ensure that the cumulative number of dead mites during treatment, $\text{Mcum}_{\text{MODEL}}$ was similar to that observed in the field, $\text{Mcum}_{\text{FIELD}}$.

The output variables, $V_{\text{remaining MODEL}}$, and the slope of the cumulative mite mortality curve over a period of 70 days, $S70_{\text{MODEL}}$, were compared with the data obtained in the field (Student tests), to validate the model with treatment.

2.4 Analysis of the sensitivity of the model

We analysed the sensitivity of the parameter k_{natural} for the model without treatment. The coefficient of elasticity (equation 15) was determined for a variation of k_{natural} of -10% to +10%, with the number of mites after 100 days taken as the output variable.

Equation (15)

$$\text{Coefficient of elasticity} = \frac{\text{output values B} - \text{output values A}}{\text{output values A}} \bigg/ \frac{\text{input values B} - \text{input values A}}{\text{input values A}}$$

For the model with treatment, we analysed the sensitivity of four input variables: kT , P_i , pT and dT . We calculated the coefficient of elasticity for each output variable (Table 4 and equation 15). The fixed values of these four input variables were $kT=0.265$, $P_i=100$, $pT=220$, and $dT=10$. For evaluation of the coefficient of elasticity for a particular input variable, the other three input variables were fixed. We then varied the input variable between -20% to +20% of its initial value. The variation of each output variable was evaluated.

2.5. Evaluation of mite resistance to amitraz

In the three apiaries located in Aubières and Silhac in Auvergne-Rhône-Alpes, France, brood samples (from 10 hives per apiary) were collected on July 15th 2020 (before treatment). For the samples with sufficiently high levels of infestation, mature female mites were collected from the brood. Mite susceptibility to amitraz was analysed according to the protocol described by Almecija et al. (2020).

We placed 15 to 20 mites in contact with amitraz (PESTANAL®, 100% purity, Sigma Aldrich) in a Petri dish containing 0.4 µg/mL acaricide and incubated them for one hour ($30\pm1^{\circ}\text{C}$ and $60\pm10\%\text{HM}$) (four replicates). This concentration corresponds to the discriminating concentration capable of killing 90% of a susceptible population of mites (Almecija et al., 2020; Kamler et al., 2016; Maggi et al., 2008). At the end of the one-hour incubation period, the mites were transferred to uncontaminated Petri dishes together with nymphs, for feeding. Mite survival was assessed 24 h later. If the natural mite mortality is higher than 20%, the test is rejected. An evaluation of the mean survival of mites was performed on the four replicates. The populations of mites were classified according to their level of resistance (% survival following exposure to amitraz): susceptible (<24% survival), moderately resistant (between 25% and 61% survival) and highly resistant (>60% survival).

3. Results

3.1 Validation of the model

We compared the mean cumulative numbers of mite deaths in the field, for the 15 hives of Apiary C, with the cumulative number of mite deaths obtained with the model (Figure 3). The remaining mites did not differ significantly between the values observed in the field and the simulated values obtained with the model for the three apiaries: Apiary A (Student test, $p\text{-value}=0.18$, $\text{df}=9$, $n=10$), Apiary B (Student test, $p\text{-value}=0.78$, $\text{df}=10$, $n=11$) and Apiary C (Student test, $p=0.27$, $\text{df}=14$, $n=15$). For Apiary B and C, there were a significant difference in the slope of the cumulative mortality curve between the field and simulated values (Apiary B : Student test, $p=4.8\text{e-}3$, $\text{df}=10$, $n=11$ and Apiary C=Student test, $\text{df}=10$, $p=0.041$, $n=11$). The cumulative mortality curve slopes obtained with the model were systematically higher than those obtained in the field. By contrast, the slopes of the 70-day cumulative mortality curves did not differ significantly between the field and simulated data for Apiary A (Student test, $p=0.06$, $\text{df}=9$, $n=10$).

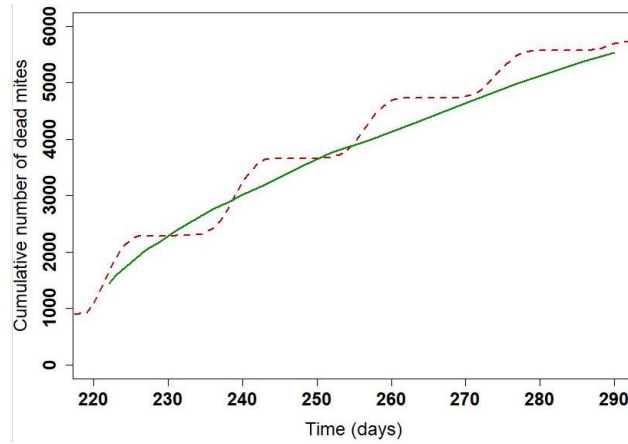


Figure 3: Representation of cumulative mite mortality for field data (solid green line) for Apiary C and the simulated data obtained with the model (dashed red line) ($kT=0.1388$ and $Pi=128$).

3.2 Analysis of the sensitivity of the treatment parameters

In our model without treatment, the natural mortality rate, k_{natural} , was fixed at 0.03. According to the sensitivity analysis, for a variation of k_{natural} of -10 to +10%, the population of phoretic mites after 100 days varies by a maximum of 59%. These findings indicate that the natural mortality rate has a strong influence. The sensitivity analysis made it possible to evaluate the influence of the input variables on the global efficacy of treatment (Fig. 4). Treatment period, pT , had the strongest influence on the global efficacy of treatment (Fig. 4).

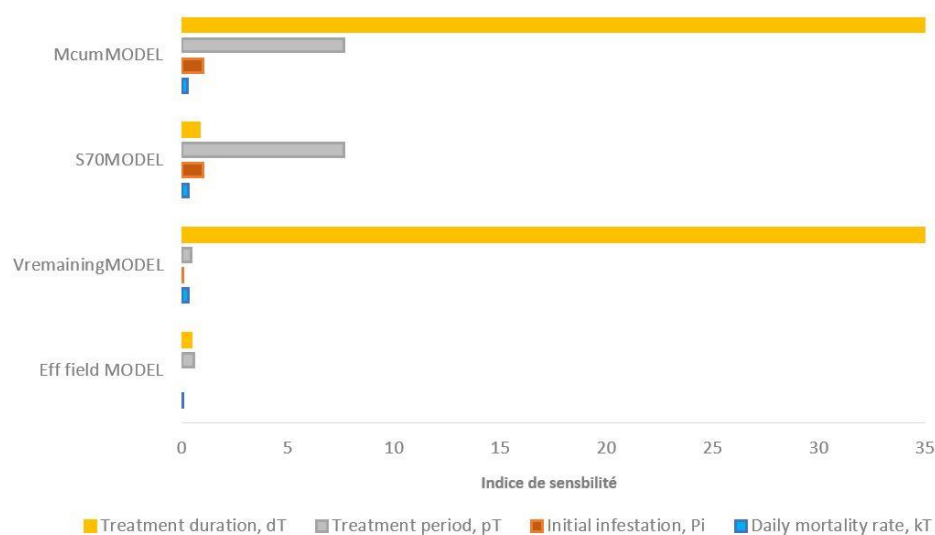


Figure 4: Coefficient of sensitivity after the variation of input parameters by -20% to +20%, with $kT=0.265$, $P_i=100$, $pT=220$, and $dT=10$. $Mcum_{MODEL}$ is the total number of mites that died during treatment. $S70_{MODEL}$ is the slope of the cumulative mite mortality curve for the treatment period. $Vremaining_{MODEL}$ is the cumulative number of mite deaths during the control treatment. $Eff_{fieldMODEL}$ is the modelled efficacy according to the protocol applied in the field.

Treatment duration, dT , had the strongest influence on the efficacy of Apivar® treatment. It had a particularly strong influence on the residual number of mites. The model showed that a 10-week Apivar® treatment was optimal for $kT=0.265$, $pT=220$ and $P_i=100$ (Fig. 5). Shortening treatment duration led to an increase in $Vremaining_{MODEL}$. Conversely, lengthening the duration of treatment resulted in a stabilisation of the residual number of mites (Fig. 5).

Treatment period, pT was the second most important parameter influencing on the global efficacy of treatment (Fig.4). Contrary to expectations, the model predicted that later treatments were more effective than earlier treatments (Fig. SM1).

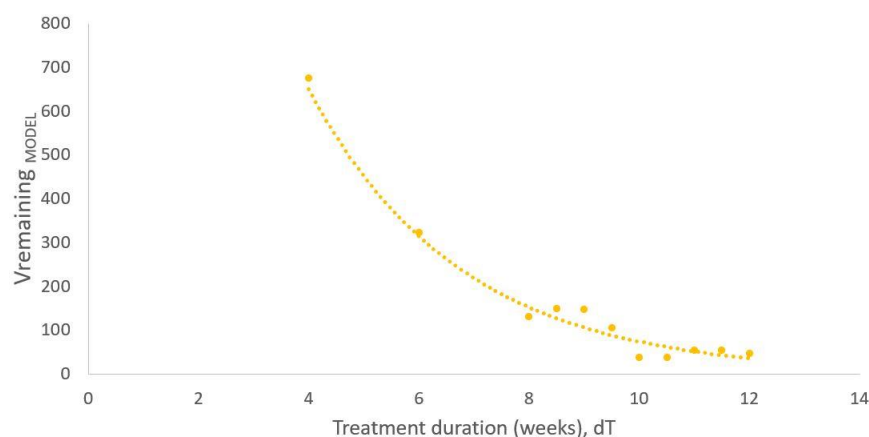


Figure 5: Residual number of mites as a function of treatment duration, dT for $kT=0.265$, $pT=220$ and $P_i=100$

The initial level of infestation, P_i , and the rate of mortality, kT , were identified as the parameters with the least influence on overall treatment efficacy. Nevertheless, the level of infestation of the colony, P_i , influenced the number of dead mites, the remaining mites and the slope of the cumulative mortality curve. By contrast, the initial level of infestation had no effect on the percent efficacy of the treatment, which was dependent solely on kT , dT and pT . The number of remaining mites increased linearly with the initial level of infestation ($y=0.438x+0.0243$). However, not all the relationships between input and output variables were linear, and the coefficient of elasticity may therefore vary according to the chosen point of origin. Daily mortality had a strong influence on treatment efficacy for $kT < 0.2$ (Fig. SM2).

3.3 Comparison of $Eff_{field\ MODEL}$ and $Eff_{control\ MODEL}$

The modelled field efficacy, $Eff_{field\ MODEL}$, was significantly different from the modelled control efficacy, $Eff_{control\ MODEL}$ (Wilcoxon test, p -value= 1.52×10^{-5} , $V=150$). The modelled field efficacy was systematically higher than the modelled control efficacy. Indeed, the evaluation of field efficacy tended to overestimate the real efficacy of the treatment. Beyond 80%, the values for field and control efficacy tended to be the same (Fig. 6). A treatment with a percent efficacy close to 30% in the field may, therefore, be considered ineffective (modelled control efficacy of 0%) (Fig. 6). In other words, in this situation, the observed dead mites died from natural causes and not due to the treatment.

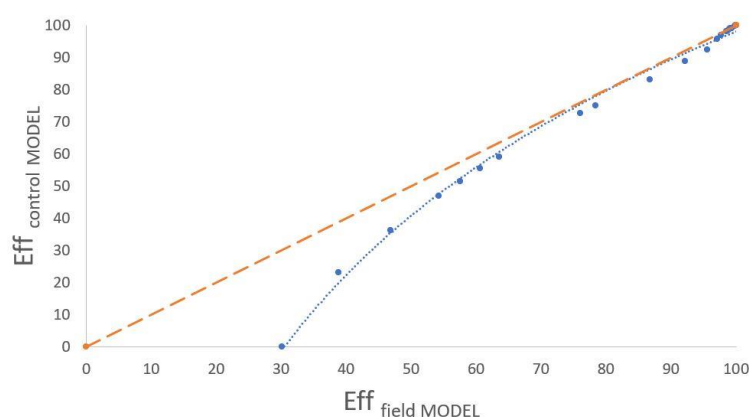


Figure 6: Relationship between the modelled control percent efficacy ($Eff_{control\ MODEL}$) and the modelled field percent efficacy ($Eff_{field\ MODEL}$). The orange dashed line indicates equality of the two efficacies, $Eff_{control\ MODEL}$ and $Eff_{field\ MODEL}$.

3.4 Stabilisation of the mite population

Percent efficacy is the evaluation parameter most widely used by beekeepers and veterinarians. With a long period during which egg laying ceases completely, a modelled field efficacy, $Eff_{field\ MODEL}$, of

98.8% (for $kT=0.265$, $dT=10$, $pT=220$ and $Pi=100$) is required for stabilisation of the mite population after a single 10-week treatment (Fig. 7a). A treatment with an efficacy of 95% does not stabilise the population, and a second treatment is therefore necessary (Fig. 7b).

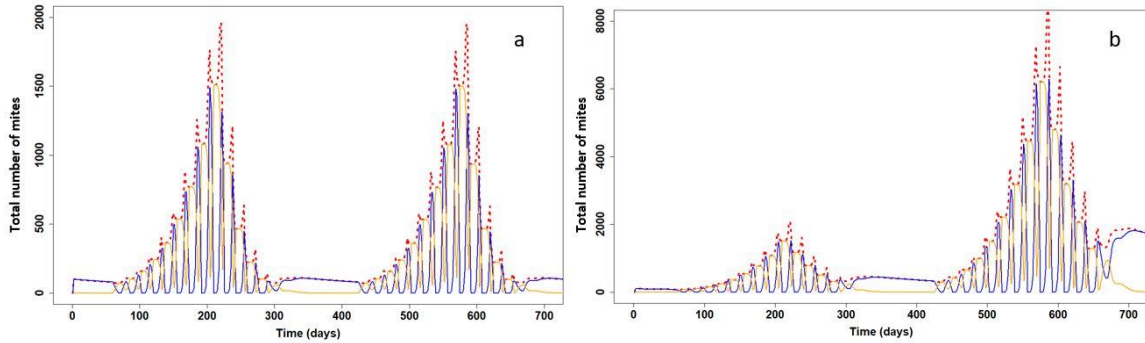


Figure 7: a) Stabilisation of the mite population according to the model with $kT=0.265$, $Pi=100$, $dT=10$, $pT=220$ and b) increase in the size of the mite population with $kT=0.18$, $Pi=100$, $dT=10$ and $pT=220$ (total population in red, population of phoretic mites in blue and population of mites in the brood in orange).

3.5 Number of mites dying during treatment.

The cumulative number of dead mites (M_{cum_MODEL}) during treatment varies with treatment efficacy (Eff_{field_MODEL}) (Fig. 8). For $Pi=100$, $pT=220$ and $dT=10$, the cumulative number of dead mites during treatment is small ($M_{cum_MODEL} < 3000$ mites) for both highly effective and ineffective treatments. The number of residual mites obtained with the control treatment decreases with the efficacy of the initial treatment. The more effective the initial treatment, the smaller the cumulative number of mite deaths during the initial and control treatments (Fig. 8). As treatment efficacy decreases (in the presence of resistance, for example), mite reproduction rates during the treatment period increase, leading to a

large increase in the mite population, and, thus, a larger number of remaining mites at the of treatment. Thus, the number of dead mites during the course of treatment is not sufficient in itself to.

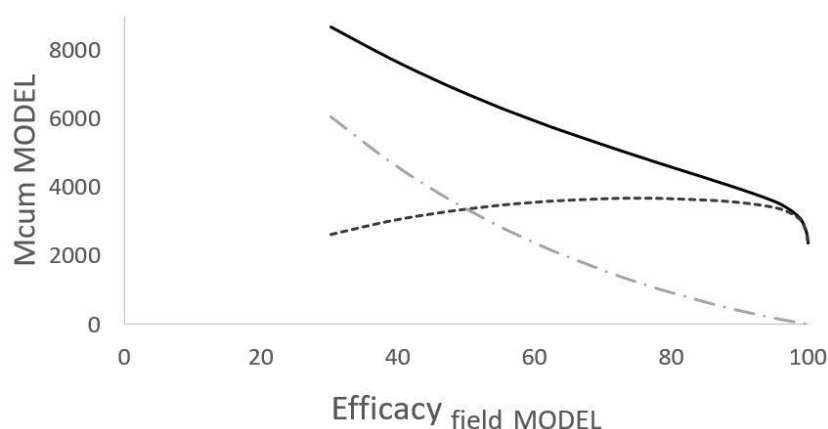


Figure 8: Cumulative number of dead mites during treatment (dashed curve), cumulative number of dead mites during the control treatment (residual mites; dotted-dashed curve) and the total cumulative number of dead mites during the initial and control treatments (solid curve) as a function of treatment efficacy, $Eff_{field\ MODEL}$ (for $P_i=100$, $pT=220$, $dT=10$)

3.6 Residual mites

The residual number of mites is the most variable output parameter and is dependent on all the input parameters (Fig.4). It provides an indication of the level of infestation in the following year. For a 10-week Apivar® treatment, remaining number of mites in the field depends on the initial infestation of the colony, daily mortality during the treatment period and the period of treatment. For initial infestations of 50, 100 and 150 mites, the residual number of mites differs significantly for the same treatment efficacy (Wilcoxon test, $p\text{-value}=5.39\text{e-}09$) (Fig. 9, Table 5). For a given efficacy, a doubling of the number of mites initially present results in twice as many residual mites (Fig. 9). According to Table 5, to obtain 50 residual mites in the colony, for a colony with $P_i=100$, an efficacy of 98.48% would be required, whereas an efficacy of only 97.11% would be required to obtain the same end result for a colony with $P_i=50$. A treatment of low efficacy would suffice for a bee colony with a low level of infestation before treatment.

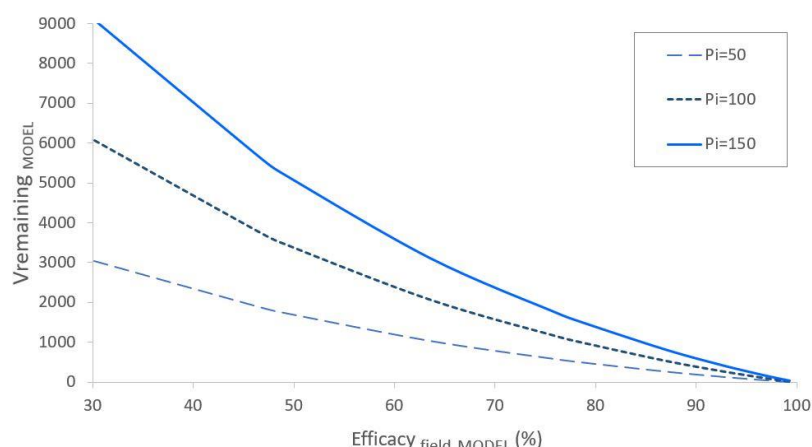


Figure 9: Residual number of mites, $V_{\text{remaining_MODEL}}$ as a function of modelled field efficacy, for three initial infestation rates: 150 mites (solid line), 100 mites (dotted line) and 50 mites (dashed line), for $dT=10$ and $pT=220$.

Table 5: Presentation of three different situations for obtaining 50 residual mites, for $pT=220$, $dT=10$.

P_i	kT	$Eff_{\text{field_MODEL}}$	$V_{\text{remaining_MODEL}}$
50	0.212	97.11%	50
100	0.25	98.48%	50
150	0.272	98.9%	50

3.7 Loss of treatment efficacy

Initial infestation rate has a larger effect on the number of remaining mites than daily mortality (Fig. 4). However, too great a loss of efficacy (simulated by a decrease in mortality rate) leads to a decrease in modelled field efficacy (Table 6) and an increase in the residual number of mites (Fig. 9 and Table 6). A decrease in kT of less than 20%, in our conditions ($dT=10$, $pT=220$, $P_i=100$) leads to a decrease in modelled field percent efficacy of less than 2% (Table 6). Nevertheless, for decreases in kT of more than 40%, the modelled field efficacy is 92%, with a residual number of 298 mites. Treatments resulting in a decrease in kT of more than 60% (which correspond to high level of resistance with the bioassay) inevitably lead to treatment failure at the end of the season, due to the persistence of too large a number of remaining mites ($V_{\text{remaining_MODEL}}$ greater than 1000) (Table 6).

Table 6: Influence of decreases in kT on the modelled field percent efficacy of the treatment and the residual number of mites (dT=10, pT=220, and Pi=100)

kT	Decrease in kT (%)	Modelled field efficacy (%)	Decrease in modelled field efficacy	Residual mites
0.265	0	98.77	0	38
0.212	20	97	1.77	97
0.159	40	92	6.77	298
0.106	60	78.4	20.37	1011
0.053	80	48.9	49.87	3453

3.8 Evaluation of the resistance of mites and the influence of treatment efficacy

The mites of the three apiaries displayed strong resistance to amitraz (>60%), with no significant difference between apiaries (Kruskal-Wallis test, $X^2=2.68$, $df=3$, $p\text{-value}=0.44$) (Table 7). The mean efficacy of Apivar® in the field, for the apiaries studied, was below 88% resulting in a large remaining number of mites (>500 mites per beehive after treatment). The percent efficacy of treatment did not differ significantly between the three apiaries (Kruskal-Wallis test, $\chi^2=10$, $df=10$, $p\text{-value}=0.441$). According to the data in Table 6, a decrease in mortality (kT) of more than 60% would give a modelled efficacy of 78%, a value close to that observed in the field for Apiary A ($\text{Eff}_{\text{FIELD}} = 82.91\%$) (Table 7). This strong resistance may be responsible for treatment failure. Five of the 36 hives studied suffered colony collapse, including three for which the mites were tested in the laboratory before treatment. The mites from these three hives displayed high levels of resistance to amitraz, at 64%, 90% and 98%. Laboratory analyses of amitraz resistance in mites can provide additional information about treatment efficacy. Similar letters indicate an absence of significant difference between apiaries.

Table 6 : Level of amitraz resistance evaluated before treatment (in the laboratory) for three apiaries (A, B and C) and the mean efficacy of Apivar® on the same hives, and the entire apiary

Apiary	Mean resistance to amitraz with bioassay (%) $\pm$ SE	Mean EffFIELD for the hives which mites were tested with bioassay $\pm$ SEM	Mean EffFIELD for the entire apiary (%) $\pm$ SEM
A	60.5 $\pm$ 9(n=5) ^a	82.91 $\pm$ 4(n=5) ^A	74.18 $\pm$ 4.83(n=12) ^A
B	64.0 $\pm$ 9(n=5) ^a	86.01 $\pm$ 3(n=3) (2 DC ¹) ^A	83.17 $\pm$ 2.6(n=11) ^A
C	71.5 $\pm$ 5(n=7) ^a	93.27 $\pm$ 2.23(n=6) (1DC) ^A	88.27 $\pm$ 2.33(n=15) ^A

¹ DC indicates the Dead Colonies during the trial

4. Discussion

Our model explains the action of Apivar® treatment for colonies with a long period in which no eggs are laid during the winter. This model has several limitations. Firstly, it does not take variations in the dynamics of the bee population during the year into account: variations due to the interruption of bee egg-laying during the winter, replacement of the queen, swarming, blocked nectar production (Kang et al., 2016; Sumpter and Martin, 2004; Traynor et al., 2020). All these variations imply modifications to the dynamics of the mite population and, thus, variations in treatment efficacy (Fries et al., 2003).

Secondly, the model does not take into account the effect of the mite on the bee population, particularly in terms of virus transmission and the impact on winter bees (Beaurepaire et al., 2020; Desai and Currie, 2016). Higher levels of bee colony infestation with mites are associated with higher virus levels in the colony (Martin, 2001). With our model, the results for the treatment period parameter, pT , indicate that later treatments are more effective, because brood size is smaller. However, winter honeybees are already contaminated by the viruses. The interpretation of the pT parameter is, therefore, incomplete with our model, which does not take into account the brood size or virus levels.

Efficacy monitoring in the field can be used to check treatment efficacy. Our model provides elements facilitating a more complete interpretation of the results obtained. In particular, Apivar® treatment with an efficacy of about 30% should be considered ineffective (Fig. 6). The objective of treatment is to stabilise the mite population from year to year.

For this purpose, in situations in which there is a long interruption of egg-laying during the winter, the efficacy of Apivar® must be at least 98.8% over the 10-week treatment period to stabilize the mite population. This percent efficacy is well above the 95% demanded by the French National Veterinary Drug Agency (the ANMV). Martin concluded that an efficacy of 99% was required to decrease infestation in the following year (Martin, 1998).

In field counts, the number of dead mites during Apivar® and control treatments is often associated with the initial level of infestation before treatment. The number of dead mites during treatment certainly depends on this initial level of infestation, P_i , but it also depends on the daily mortality rate, kT (Figs. 8 and 9). In addition, a low percent efficacy in the field is often explained by the presence of a large number of dead mites during counting, but we show here, with this model, that it is actually a low kT that results in a large number of dead mites (Fig. 8).

Similarly, the remaining number of mites depends on the initial level of infestation and the daily mortality rate. The counting of residual mites alone cannot, therefore, provide conclusive information about treatment efficacy (Fig. 9).

Efficacy in the field depends on many parameters: the amount of brood, respect for the recommended dose, the initial infection level and the presence of resistant mites. An evaluation of mite susceptibility in the laboratory can provide useful information about the likely efficacy of treatment (Table 8). The presence of mites resistant to amitraz modifies the impact of the treatment on the population, particularly in terms of daily mortality, kT . If we considered 60% of the mite population to be resistant to amitraz, this could decrease kT by 60% (Table 7). In this situation, Apivar® is about 20% less effective and the risk of treatment failure is high (Rinkevich, 2020). If a small proportion of the population is resistant (<20%), the percent efficacy decreases by only 1 to 2%. This decrease is unlikely to lead to treatment failure but may result in too high number remaining mites (Table 8). Resistance of 20 to 60% leads to a mean efficacy of 92%. For this reason, even though the recommended duration of Apivar® treatment is normally 10 weeks, it is not rare for treatment duration to be increased (oral communication). This increase in treatment duration can make it possible to decrease the remaining number of mites (Fig. 6), but it also increases the proportion of resistant mites in the population.

The beekeeper can also influence treatment efficacy, notably by 1) fixing the timing of the treatment period, 2) managing the initial level of infestation and 3) managing resistance. The optimal treatment period is as early as possible in the season (Beyer et al., 2018) and during interruptions in egg laying (no brood). In brood-free periods, all the mites become phoretic (on the bees) and treatment is therefore faster than in the presence of a brood. Increasing numbers of beekeepers are creating artificial breaks in egg laying to increase the efficacy of treatments based on oxalic acid, which are applied over a shorter period. In addition, by maintaining low levels of infestation, the beekeeper can limit treatment failure, even in the presence of low levels of resistance (<20%) (Tables 7 and 8) (Dooremalen et al., 2012). The level of mite infestation can be controlled by the beekeeper, through 1) adjustment of the treatment period (earlier treatment in cases of heavy infestation), 2) modification of treatment frequency (addition of a winter treatment) and 3) the use of complementary methods (Neyrou, 2021). At an individual scale, beekeepers can also control the levels of resistant mites in their colonies by applying temporal alternation strategies (alternation over several years), bitherapy (succession of treatments) or geographic alternation strategies (diversification of the acaricidal substances used within a given apiary) (Beaurepaire et al., 2017).

5. Conclusion

The impact of Apivar® treatment on the mite population can be modelled. The presence of amitraz resistance in the mite population leads to a decrease in treatment efficacy. Nevertheless, beekeepers can act in various ways to counteract low levels of resistance, through the control of infestation levels and the choice of treatment period. In addition, beekeepers can use several different strategies to keep the level of resistance low. Today, mite control strategies include both the management of infestation (through modulation of the treatment period and treatment frequency) and the management of acaricide resistance in mites.

Acknowledgements

We would like to thank all the beekeepers who participated in this study by providing colonies for the trial, and all the apiculture technicians of ADA AURA for sampling broods and counting mites for the monitoring of efficacy, and for performing analyses.

Conflict of Interest Declaration

This study was partly funded by VitaBeeHealth.

6. Supporting information

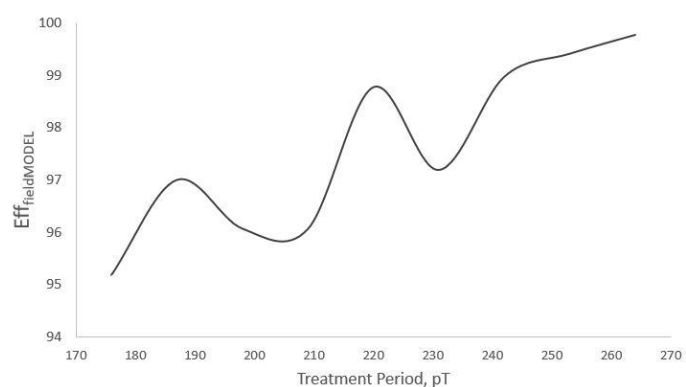


Figure SM1: Modelled field efficacy, $Eff_{fieldMODEL}$, as a function of the day of treatment initiation (pT)

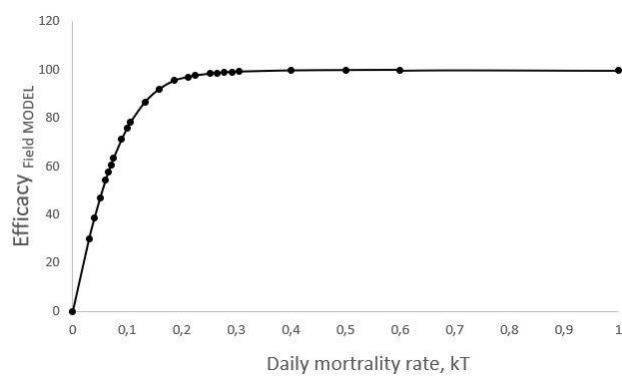


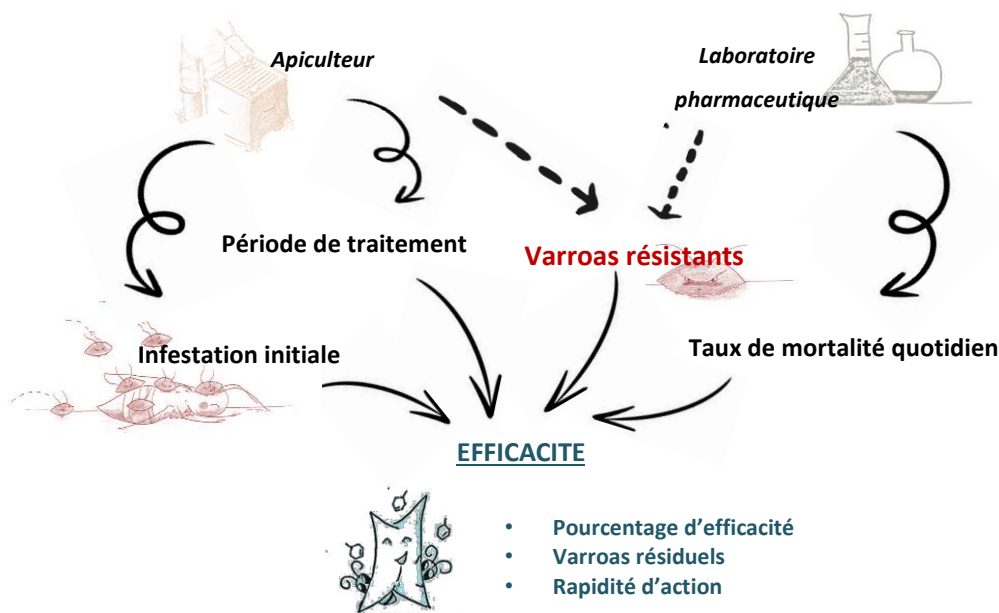
Figure SM2: Modelled field efficacy, $Eff_{fieldMODEL}$, as a function of daily mortality rate, kT

Conclusion Chapitre 3

1) Modéliser l'efficacité d'un traitement

Le modèle mathématique permet de comprendre l'action du traitement Apivar® sur la population de varroas. Le taux de mortalité quotidien est stable tout au long du traitement Apivar®. Des facteurs externes au traitement interviennent dans l'efficacité du traitement : le **niveau d'infestation initial de la colonie**, la **période de traitement (début de traitement)** et la **présence de varroas résistants**. Ces facteurs peuvent influencer l'efficacité globale du traitement.

En effet, l'efficacité d'un traitement est évaluée par plusieurs paramètres : (1) le pourcentage d'efficacité, (2) le nombre de varroas résiduels et (3) la rapidité du traitement (LT50 ou LT90). Le pourcentage d'efficacité dépend du **taux de mortalité quotidien** des varroas lié au traitement. Il est nécessaire d'associer le pourcentage d'efficacité au nombre de varroas résiduels pour s'assurer que le traitement a été suffisamment efficace. La rapidité du traitement est très peu prise en compte lors des suivis d'efficacité. Or, le nombre de varroas résiduels et la rapidité du traitement sont dépendants de l'**infestation initiale** de la colonie. C'est pourquoi un des rôles de l'apiculteur est de s'assurer que le niveau d'infestation ne dépasse pas un certain seuil d'infestation.



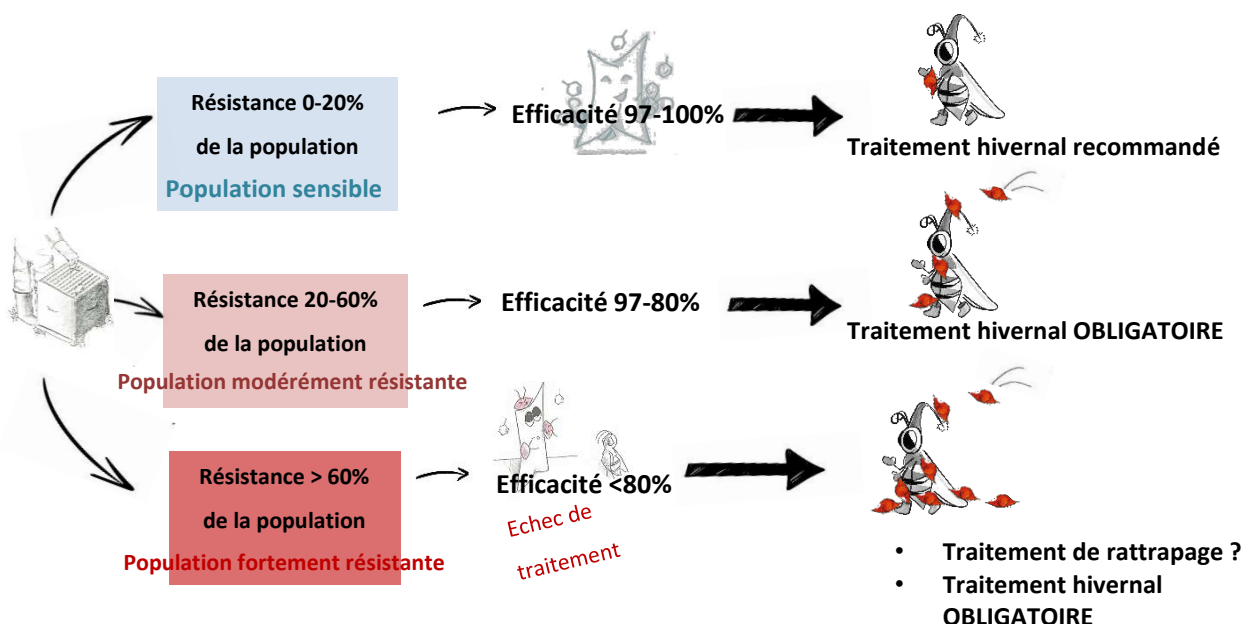
2) Influence de la présence de varroas résistants sur l'efficacité d'un traitement

La présence de varroas résistants dans une population entraîne des modifications de l'action du traitement Apivar®. L'efficacité du traitement sera d'environ 99% si la population ne présente pas de varroas résistants. Nous avons décrit 3 situations en fonction de la proportion de varroas résistants dans la population :

1) Une population de varroas avec moins de 20% de varroas résistants conserve une efficacité supérieure à 97%. Selon l'infestation en pré-traitement, le nombre de varroas résiduels sera plutôt faible (inférieur à 50 varroas).

2) Une résistance comprise entre 20-60% de la population entraîne une efficacité comprise entre 97% et 78%. Selon le niveau d'infestation et avec une efficacité inférieure à 95%, le nombre de varroas résiduels dans la colonie sera élevé pour l'hiver. L'effondrement de la colonie peut ne pas être observée dans l'hiver mais une baisse de production de miel et un effondrement de fin de saison peut être observé l'année N+1. Dans cette situation, un traitement hivernal est obligatoire pour réduire l'infestation.

3) Une proportion de varroas résistants supérieure à 40-60% entraîne une forte diminution de l'efficacité du traitement (de 92% à 78%). Selon l'infestation en pré-traitement, le nombre de varroas résiduels sera très important entraînant un échec de traitement. Si l'infestation en pré-traitement est trop importante, le risque d'effondrement de la colonie dans l'hiver ou à la sortie de l'hiver est grand.



« La nature n'enfreint jamais ses propres lois »

Léonard de Vinci

Chapitre 4 : Influence des caractéristiques de traitements à base d'amitraze sur l'efficacité

Avant-propos

Dans les chapitres précédents, nous avons pu mettre en évidence que le varroa a développé des résistances à l'amitraze et au tau-fluvalinate. Nous avons montré que l'efficacité d'un traitement dépend de plusieurs paramètres. Les paramètres externes au traitement regroupent les paramètres liés aux conditions environnementales : l'infestation initiale, la période de traitement et la présence de varroas résistants dans la population. Les paramètres internes au traitement comprennent le mode de libération de la substance acaricide, la quantité de substance active et la durée de traitement. Dans le chapitre 3, nous avons pu modéliser l'action du traitement Apivar® sur la population de varroas. Nous avons pu mettre en évidence qu'Apivar® libérait de manière constante l'amitraze tout au long du traitement (10 semaines) car il présente un taux de mortalité quotidien stable. D'après le modèle, pour stabiliser une population de varroas avec un seul traitement annuel, Apivar® doit présenter une efficacité d'environ 99%. Si l'efficacité est inférieure, alors un second traitement hivernal sera nécessaire pour stabiliser la population pour l'année N+1.

Il existe plusieurs traitements utilisés dans la lutte contre varroa à base d'amitraze. Bien que l'efficacité soit similaire entre ces traitements, ils ne présentent pas les mêmes caractéristiques pharmacocinétiques : excipient, vitesse de libération de la substance acaricide et durée de traitement autorisée.

L'objectif de ce chapitre est d'évaluer la différence d'action entre deux traitements ayant une galénique (formulation) différente. Notre hypothèse est que les caractéristiques pharmacocinétiques des traitements ont un impact sur l'efficacité du traitement.

A partir de suivis d'efficacité sur le terrain, nous chercherons à déterminer les différences de cinétique de chute observables sur le terrain entre deux traitements à base d'amitraze : Apivar® et Supatraz®. L'amitraze est imprégné dans le plastique des lanières Apivar® et sa libération est continue (Chap.3). Pour Supatraz®, l'amitraze est solubilisé dans une matrice huileuse et imprégné sur des lanières plastiques. L'hypothèse est que la libération de l'amitraze sera plus rapide avec la galénique de Supatraz®. L'utilisation d'un modèle nous permettra : 1) de simuler la libération de la substance acaricide dans la colonie et 2) de déterminer l'influence de la durée de traitement sur l'efficacité des deux produits.

Original Article

Influence of amitraz-based products characteristic to control varroa mite population.

G. Almecija ^{1,2 *}, B. Poirot¹, P. Mielgo³, M. Watkins³ & C. Suppo²

¹ Apinov, Scientific Beekeeping & Training Center, 10 rue Henri Bessemer, 17140 Lagord, France

² Institut de Recherche sur la Biologie de l’Insecte, UMR 7621, CNRS-Université de Tours, 37200 Tours, France

³ VitaBeeHealth, Vita House, London Street, Basingtoke RG 7PG, UK

* Corresponding author: G. Almecija, E-mail address: gabrielle.almecija@apinov.com, 10 rue Henri Bessemer, 17140, Lagord (France).

Author’s contribution:

Gabrielle Almecija has contributed to the field and model analysis. She has also written the manuscript.

Benjamin Poirot, Paulo Mielgo and Max Watkins contribute to the interpretation of the results and the writing of the manuscript.

Christelle Suppo contributed to the model analysis and the writing of the manuscript.

(Article in submission in Medical and Veterinary Entomology)

Abstract

Varroa destructor is an ectoparasitic mite of honeybee responsible for varroosis in *Apis mellifera*. The presence of the mite requires the use of acaricide treatments in most honeybee colonies. Amitraz is one of the most common acaricide substances used by beekeepers. Varroa mite developed resistance to amitraz conducting to loss of efficacy of amitraz-based treatments. Two products, Apivar® and Supatraz® were applied in the same apiary. Both treatments are amitraz-based but have a different formulation. The treatment efficacy was evaluated for 10 weeks for Apivar® and 8 weeks for Supatraz®. Thanks to field data, a dynamic model was used to simulate the action of Apivar® and Supatraz® on the mite population. We consider two parameters to compare the products: daily mortality rate, kT and treatment duration. In the field, Supatraz® presents a higher global efficacy than Apivar®. Moreover, Supatraz® kills mite faster and decreases 90% of the mite infestation in 28.4 days compared to 50.9 days for Apivar®. The model shows that both products Apivar® and Supatraz® controls the population in a constant way with a higher during the first week for Supatraz®. Supatraz requires a lower efficacy to stabilize the varroa mite population due to its faster release of active ingredient than Apivar, needing a shorter period to achieve the same result. These results show that the comparison of the efficacy of two products with different characteristics (duration of treatment and daily mortality rate) should be analyzed with caution. Product formulation could modify the treatment efficacy.

Keywords: *Apis mellifera*, resistance management, beekeeping, Apivar, Supatraz, modelling

1.Introduction

Varroa destructor is an ectoparasite mite of the honeybee (Anderson and Trueman, 2000b). It is responsible for varroosis in honeybee colonies *via* virus spread (Beaurepaire et al., 2020; K. S. Traynor et al., 2020). Today, beekeepers must integrate varroa management to limit colony collapses. The control methods are acaricides or zootechnical methods (Rosenkranz et al., 2010). Treatments should be sufficiently effective to significantly reduce varroa infestation from year to year. However, a result of the frequent use of synthetic acaricide is the development of resistance to the acaricide substance by varroa mites (Roth et al., 2020). Resistance to tau-fluvalinate, flumethrin, coumaphos and amitraz were detected in the laboratory (Almecija et al., 2020; Elzen et al., 2000; Kamler et al., 2016; Maggi et al., 2008; Milani, 1995; Trouiller, 1998) or in the field (Adjlane, 2017; Rinkevich, 2020; Trouiller, 1998). For the moment, the synthetic acaricides are the most prone to resistances. Currently, no resistance to acaricides used in organic beekeeping has been demonstrated (Roth et al., 2020). Resistance development can come from different mechanisms: protein resistance or molecular resistance. For resistance to tau-fluvalinate, protein changes have been demonstrated through increases in

detoxifying enzymes (Hillesheim et al., 1996). More recently, molecular resistance, such as target mutation, is also believed to be involved in the development of resistance to tau-fluvalinate (González-Cabrera et al., 2016; Millán-Leiva et al., 2021). The detection of amitraz resistance was demonstrated in the laboratory and in the field without the origin being (Almecija et al., 2020; Kamler et al., 2016; Maggi et al., 2008; Rinkevich, 2020). Metabolic resistance is the most discussed although a mutation-type resistance of the target is not ruled out. Several studies on other mites are working on these hypotheses (Baron et al., 2018; Chen et al., 2007; Sungirai et al., 2018).

Beekeepers must therefore put in place control strategies to limit the development of resistance and maintain high treatment efficacy (Roth et al., 2020). Among these strategies, we find alternating control (alternation of acaricide substance over several years). For amitraz, several pharmaceutical treatments are available all around the world (Rosenkranz et al. 2010). Each treatment has different characteristics that influence the varroa population and its resistance to the acaricide substance: duration of treatment, amount of acaricide and galenic formulation. Long-term treatments increase the risk of developing resistance (FAO, 2013). However, for varroa management, long-term treatments are most used due to varroa biology (brood breeding cycle) (Rosenkranz et al. 2010). In addition, the release of the active ingredient varies according to the formulation presentation. This variation in release could explain a different treatment action on the varroa population between treatments. The choice of products in addition to the choice of active ingredient may influence the development of resistance. From the model, we will try to assess whether different products with the same active ingredient have different interactions in varroa mite management. Two points will be studied: 1) Duration of treatment and 2) Rate of dead mites. Two products will be compared in the same environment, Apivar® and Supatraz®. Modelling the action of treatments may help explain the differences in action between these two products.

2. Materials and methods

2.1. Mathematic model

The natural mite population dynamics model is derived from the Calis model developed in 1999 (Calis et al., 1999). The action of Apivar® treatment was added according to the model developed by Almecija et al. 2021. The R software was used for simulations and statistical analysis. The natural population dynamics of varroa is defined by Equation 1 (Almecija et al. 2021). The number of phoretic mites are represented by $P(t)$. The variables $I(t)$ corresponds to the number of mites infesting worker brood and $E(t)$ corresponds to the number of mites emerging with young mature females. The number of individual who died from natural mortality is given by $M(t)$. Treatment effect on honeybee population

dynamics is represented by an additional daily mortality rate due to treatment. $MT(t)$ is the global number of deaths (died from natural mortality and from mortality induced by the treatment). The treatment starts on the 7th of August for all simulations.

Equation 1

$$\begin{cases} P(1) = P_i > 0 \\ P(t) = P(t-1) - I(t) + E(t) - M(t) \text{ for } t \geq 2 \end{cases}$$

with $M(t) = k \times P(t)$ with k the natural mortality

with $MT(t) = kT \times P(t)$ with $kT = \text{natural mortality} + \text{mortality during treatment}$

The action of the treatment depends on 3 parameters: duration of treatment, dT , daily mortality, kT and the level of initial infestations in the colony, P_i . The action of Apivar® treatment on the population can be simulated by a daily mortality rate, kT constant for the duration of treatment, kT_{APIVAR} (Almecija et al. 2021). The Apivar® treatment duration is 10 weeks (70 days) (as in MAID). The model had to be readjusted for the Supatraz® (amitraz) treatment which had different pharmacokinetic characteristics from Apivar®. Supatraz® is an 8-week treatment (56 days).

2.2. Efficacy determination

2.2.a. In the field

The efficacy monitoring methods is the standard European method. Efficacy monitoring was carried out in 2019 and 2020 on Apivar® and Supatraz® in an apiary of 30 beehives located in Nieul-sur-mer, France. Before treatment, mite infestation level was monitored to homogenize groups. In 2020, the efficacies of Apivar® and Supatraz® were followed respectively on 7 and 5 beehives. The colonies used were nucs, so only one strip per colony was used. The strips were introduced into the colonies on August 26 and July 8, respectively, for the year 2019 and 2020. The characteristics of each treatment are presented in Table 1.

Table 1: Characteristics of Apivar® and Supatraz®

	Apivar®	Supatraz®
Active substance	Amitraz	Amitraz
Amitraz quantity per strip (mg)	500	700
Weight per strip (g)	15g	12.52g
Treatment duration	10 weeks (70 days)	6 to 8 weeks (42-56 days)

During treatment, the number of dead mites which drop to the bottom of the beehive are counted with sticky board every three days ($V_{treatment}$).

At the end of the treatment a control treatment is applied (Apistan®, Tau-fluvalinate), killing the remaining mites ($V_{remaining}$). From this data, a percentage of field treatment efficacy, Eff_{FIELD} is evaluated according to equation 2.

Equation 2

$$Eff_{FIELD} = \frac{V_{treatment}}{V_{treatment} + V_{remaining}} \times 100$$

2.2.b. With the model

Our model replicates the protocol applied in the field to determine treatment efficacy (including control treatment). The model estimates the number of cumulative dead mites, $Mcum_{MODEL}(t)$ during treatment and control treatment (Equation 3). The treatment starts at day pT . The model simulates the efficacy of the treatment using the same protocol as in the field (Equation 4). The number of remaining mites according to the model, $V_{remaining_{MODEL}}$ is evaluated through a simulation of a control treatment (with a daily efficiency of 90%). $Eff_{field_{MODEL}}$ represents a simulation of the efficacy reproducing the protocol used in the field.

Equation 3

$$Mcum_{MODEL}(t) = \sum_{t=pT}^{pT+dT} M(t)$$

Equation 4

$$Eff_{field_{MODEL}} = \frac{Mcum_{MODEL} \times 100}{Mcum_{MODEL} + V_{remaining_{MODEL}}}$$

2.3 Validation of Supatraz® modelling

The Apivar® model was validated using data from efficacy monitoring in 2020 by the ADA AURA (Almecija et al. 2021). Apivar® presents a constant kT during treatment duration. The model had to be adjusted to match the action of the Supatraz® treatment. Supatraz® presents a kT_{SUPATRAZ} of 0.342 for the first week of treatment. After one week of treatment, kT_{SUPATRAZ} was fixed between 1 to 0.03.

The validation of the Supatraz modelling is based on efficacy monitoring conducted in 2019 and 2020 in Nieul-sur-mer (France). Two parameters were set : start of treatment (August 7) (pT) and duration of treatment (8 weeks) (dT). The initial infestation, P_i is adjusted according to the number of dead mites during treatment ($M_{\text{cum_MODEL}}$). The model is validated by comparing the slope of cumulative number of dead mites over the total duration of treatment between the field and the model. The slopes of cumulative dead mites during treatment are defined in the field as well as by the model. They are evaluated over the duration of treatment of 70 days for Apivar® and 56 days for Supatraz®.

2.4. Time to kill 90% of the mite population: LT90.

Lethal time of 90% (LT90) represents the time required to kill 90% of the total varroa population. This period is evaluated from data from the field. It is evaluated by the ECOTOX package and the simulation of a GLM model tracing varroa mortality during treatment. LT90s are evaluated for Apivar® and Supatraz® in 2019 and 2020.

3. Results

3. 1. Field efficacy

The percentage of field efficacy is not significantly different between both treatments (Mann-Whitney test, $W=19$, $p=0.3$ (2019) and $W=12$, $p=0.43$ (2020)). In 2019, the cumulative number of dead mites during treatment was not significantly different between the two treatments (Mann-Whitney test, $W=35$, $n=11$, $p=0.35$). The time required to kill 90% of the varroa population was significantly shorter for the Supatraz® treatment than for the Apivar® one in 2019 (Wilcoxon test, $W=79$, $p=7.e-4$) and in 2020 (Wilcoxon test, $W=35$, $p=2.5e-3$) (Table1). Supatraz® acts faster than Apivar® (Fig.1 and Fig.2). Residual varroa counts are significantly lower for Supatraz® treated colonies (Mann-Whitney test, $W=21$, $n=11$, $p=0.04$). The same observations are made for the year 2020 (Table2).

Table 2: Comparison of results obtained in the field in 2019 and 2020 between Apivar® and Supatraz® in Nieul-sur-Mer

	2019		2020	
	Apivar®	Supatraz®	Apivar®	Supatraz®
Number of beehives	8	12	7	5
Efficacy (%)±SE	95.44±1.19	97.36±0.61	91.35±2.83	94.62±1.45
Average of drop mites±SE	2222±438a	1636±324a	4324±1256a	1759±605b
Average of remaining mites±SE	91±41	40±14	203±41	57.4±8.71
LT90 (days)±SE	50.97±4.69	28.49±2.14	65.27±4.39	37.68±4.1

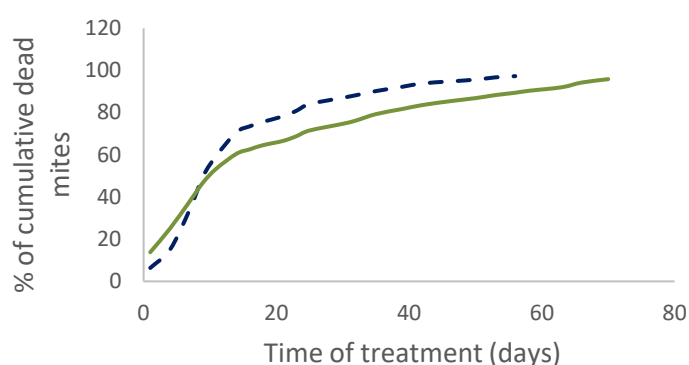


Figure 1: Percentage of cumulative dead mites during treatment for Apivar® (line) and Supatraz® (dotted line) in 2019.

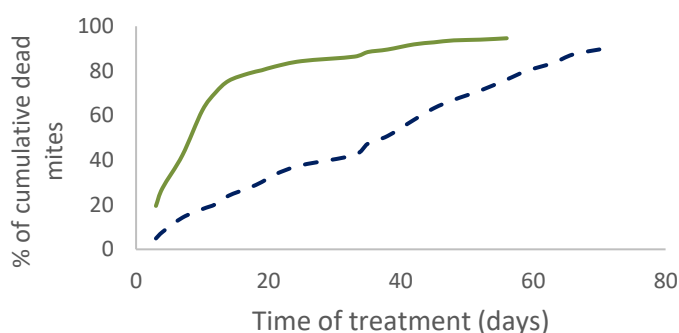


Figure 2: Percentage of cumulative dead mites during treatment for Apivar® (solid line) and Supatraz® (dotted line) in 2020.

3.2. Modelling efficacy

3.2.a Validation of Apivar® and Supatraz®

The model must represent the kinetics of mite drop during treatment to match reality. The action of Apivar® treatment was modelled in 2019 and 2020 on beehives followed by the ADA AURA (France)

and APINOV in Nieul-sur-mer (France). Maintaining the same parameter values, we represented the curve of the cumulative dead mites from the apiary in Nieul-sur-mer (Fig.3).

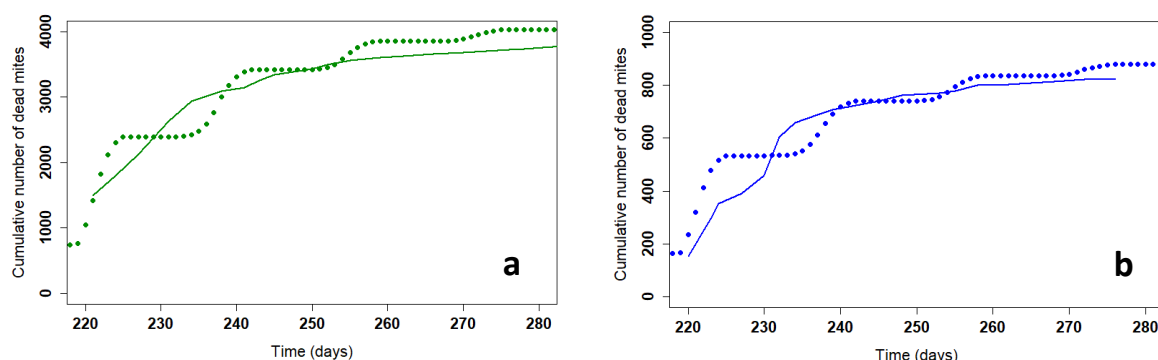


Figure 3 : Cumulative dead mites on the field (solid line) and with the model (dotted line) for Apivar (a) and Supatraz (b). Field data come from one beehive in Nieul-sur-Mer in 2019 trial.

The figure 3 shows the cumulative mite drop during treatment with Supatraz in the field and with the model. The cumulative dead mites from the model corresponds to mites count in the field. Also, the 56-days slope is not significantly different for field and model data (Wilcoxon test, $p=0.37$).

3.2.b Stabilization of the mite population with Supatraz® and Apivar®.

Table 3 presents the different parameters to stabilize the varroa mite population for both products. The daily mortality rate, starting kT is higher for Supatraz® than for Apivar®. According to the model, a percentage of 97.0% for Supatraz® is enough to stabilize the varroa population from year to year while Apivar® must have an efficacy of 98.77% (Chap.3). The model shows that the number of dead mites during treatment would be lower for Supatraz® and the number of residual varroa would be higher. The model, free of all environmental factors, shows a less of a difference in the cumulative dead mites between Apivar® and Supatraz® than the mortalities observed in the field (Fig.1, 2 and 4). In this condition, both treatment present identical results on mite population: efficacy, LT90, number of dead mites.

Table 3: Modelling values needed to stabilize the varroa population for Apivar® (10 weeks of treatment) and Supratraz® (8 weeks of treatment) ($P_i=50$).

	Apivar®	Supratraz®
Treatment duration	10	8
Start of treatment	220	220
P_i	50	50
kT_{APIVAR} and $kT_{SUPATRAZ}$	0.265	0.3
Percentage of efficacy (to stabilize population)	98.77	97.0
Slope of cumulative mite mortality curve (total treatment)	43	25.76
LT90	37	34
Number of cumulative dead mites	1534	1397
Varroas remaining	19	43
Maximum number of mites in the year	963	963

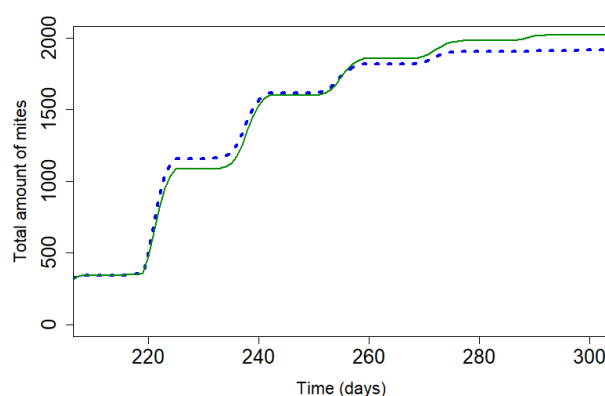


Figure 4: Cumulative mite mortality with the model for Apivar® (dotted line) and Supratraz® (solid line) ($P_i=50$).

3.3. Influence of decreasing efficacy on mite population

The figure 5 presents the mite population curves during treatments application Apivar® and Supratraz® for a theoretical efficacy equal to 95% for both treatments. Supratraz® has a faster rate of action on the varroa population than Apivar® treatment, allowing to reduce the reproduction rate of varroa early in treatment. The mite population decreases faster with Supratraz® than Apivar® and the number of remaining mites is lower with Supratraz®. For a same percentage of efficacy the products have different impact on mite population.

The table 4 presents the influence of both products on mite population depending on the percentage of efficacy. The LT90 is identical to values observed on the field (Table 2). For the same efficacy, the model shows that Supratraz® has fewer remaining mites, moreover the LT90s are shorter for Supratraz®.

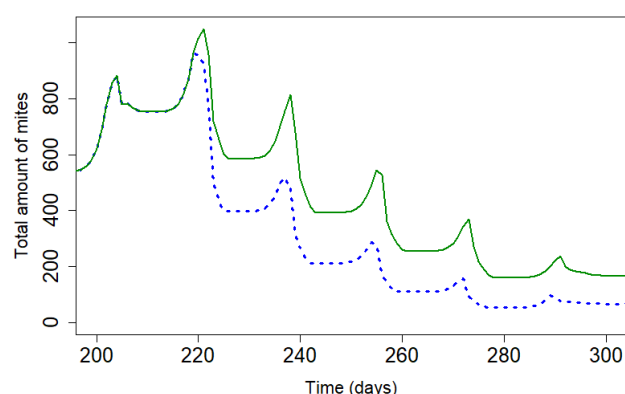


Figure 5: Mite population for Apivar® (solid line) and Supatraz® (dotted line) treatment for both 95% efficacy ($P_i=50$). ($kT_{\text{APIVAR}}=0.178$ and $kT_{\text{SUPATRAZ}}=0.24$)

Table 4: Number of cumulative dead mites and remaining mites with Apivar® and Supatraz® for different efficacies (with $P_i=50$)

Efficacy	Apivar®			Supatraz®		
	Dead mites	Remaining mites	LT90 (days)	Dead mites	Remaining mites	LT90 (days)
99%	1505	15	37	1363	13	33
95%	1704	88	57	1529	80	35
90%	1776	196	70	1653	183	38

4. Discussion

Products formulations may present variation in the efficacy to control mite infestation. Long term treatments can present higher efficacy than short treatment (Roth et al. 2020). However, in the field, Supatraz® has higher efficacy than Apivar®. The number of the cumulative dead mites was lower with Supatraz® than Apivar® describing a fast acting with Supatraz® (Almecija et al. 2021).

Each products have different characteristics that affect the impact on the varroa population. The amount of active ingredient but also formulation changes the amount or speed of active ingredient released. Without dissociating the origin of this variation, the modeling daily mortality rate of Apivar® and Supratraz® (kT_{APIVAR} and kT_{SUPATRAZ}) allows to analyze the performance of the products. This could be consistent with the Supatraz® formulation, due to the support matrix which contains oil (Fig.5). The product formulation plays an important role in action of the treatment. The same observation was evaluated with different based-thymol treatment (Gracia et al., 2017).

concentration and treatment duration for varroa mite.

The action model depends on several parameters. The active ingredient release is not well understood however the model can show how product influences the mite population reduction. The model is a mechanistic model of the action of different treatments on the varroa population in the same conditions. We cannot modelized the quantity of amitraz released in the colony per day but only the daily mortality of mites. The risk to develop resistance to amitraz may not be modelized depending on the treatment.

It should be noted that our model has the same limitations described in the model developed for Apivar® (Almecija et al., 2021) : a population dynamic of bees with a total and long winter break-up, and no reinfestation. Any changes in bee dynamics would alter these observations as they would affect varroa population dynamics (Lodesani et al., 2002). In addition, the virus quantity was not included in the model.

The population stabilization point between treatments shows that the comparison of efficacy between treatments is subtle. To stabilize the mite population, the model shows that Supatraz® require lower efficacy (Table 3). Moreover, in a theoretical same percentage of efficacy, Supatraz® presents fewer remaining mites and a shorter LT90 due to a faster action (Table 4). In the field, to achieve the LT90, Apivar® needed 50 days in 2019 and 65 days in 2020, while Supatraz® needed 28 and 37 days, respectively. Supatraz® will be useful to quickly reduce the infestation and the virus spread (Locke and Fries, 2011; Martin, 2001) probably due to higher amitraz concentration However, Apivar® kill fewer mites per day than Supatraz® but its longer treatment duration allows to the treatment to be efficient.

Resistance to amitraz has been described by several studies (Almecija et al., 2020; Kamler et al., 2016; Maggi et al., 2010). Depending on the treatment action, the risk of resistance development may vary as it was shown with other mites (Bianchi et al., 2003). The amitraz dose can modify the resistance management. In fact, resistance development of mites and insects depend on many parameters such as dose, pattern of application, timing and sequence of insecticide us (Brattsten et al., 1986). Sensitive mites do not need high doses of active ingredient however low doses can fix the resistance rapidly. A too long a treatment duration increases the risk of developing resistance. At the same time, a too high or too low concentration of active ingredient increases the risk of developing resistance (FAO, 2013). To prevent resistance, treatment duration has to be as short as possible and amitraz concentration adapted. At the moment, no information is available on resistance trigger threshold for amitraz

5.Conclusion

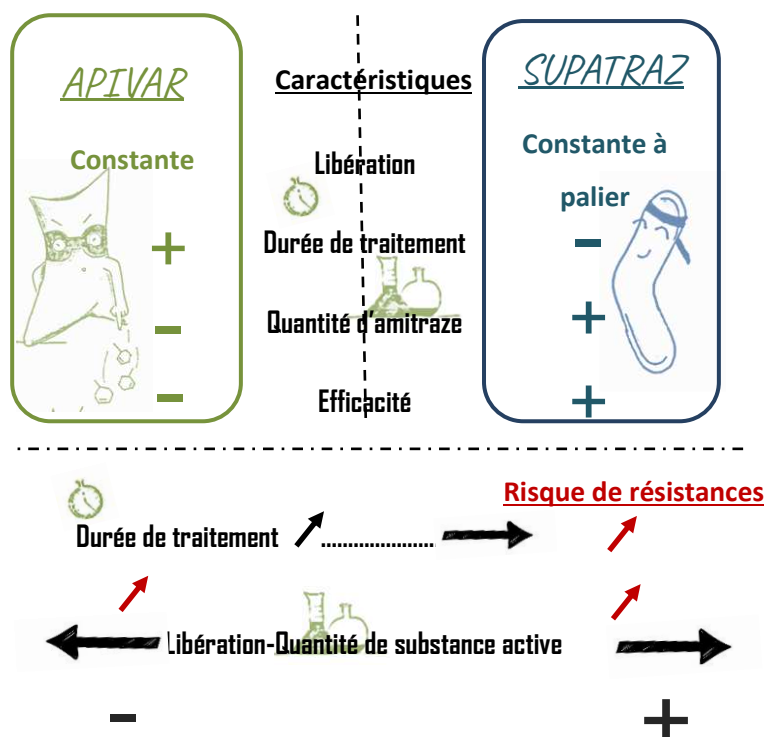
In the field, Supatraz® presents a higher efficacy and faster action on mite population than Apivar®. By comparing the action of Apivar® and Supatraz® treatments, we have shown that pharmacokinetic characteristics influence the efficacy of the treatment. The trade-off between treatment duration and quantity of active ingredient could allow the products to decrease the level of mite resistance in the population.

Conclusion Chapitre 4

Deux traitements avec la même substance active peuvent présenter une efficacité et une action différente sur une population de varroas dans un même environnement. Nous avons pu mettre en évidence deux critères majeurs qui permettent de comprendre l'effet du traitement sur la population :

- 1) **La libération et la quantité de la substance acaricide** : elle dépend de l'excipient utilisé par le laboratoire. Sur le terrain, dans le même environnement, Supatraz® présente une rapidité d'action supérieure à Apivar® et une LT90 plus courte. Avec le modèle, nous avons pu reproduire l'action du traitement sur la population de varroas : le plastique libérerait de manière continue l' amitraze pour les deux traitements mais la matrice huileuse de Supatraz® semble être responsable de cette action « flash » sur la population qui réduit l'infestation rapidement en début de traitement.
- 2) **Durée de traitement** : Plus un traitement sera long plus il sera efficace toutefois un traitement plus court peut présenter une meilleure efficacité qu'un traitement plus long grâce à un taux de mortalité quotidien plus élevé dès le début du traitement. Cela permet de réduire la durée de traitement et donc l'apparition de résistance potentielle.

L'efficacité d'Apivar® s'obtient par sa durée de traitement relativement longue comparée aux autres traitements anti-varroa. L'efficacité de Supatraz® serait due pas une libération d' amitraze quotidienne plus élevée. Dans le cadre de la lutte contre les résistances chez Varroa, trouver le compromis entre libération de substance active et durée de traitement pour obtenir une bonne efficacité tout en limitant l'apparition de résistance sera l'un des objectifs des laboratoires pharmaceutiques.



Conclusion Partie 2

La présence de varroas résistants dans la population peut réduire l'efficacité d'un traitement. Cette partie 2 a permis de mettre en évidence les paramètres impliqués dans l'efficacité d'un traitement et de quantifier l'effet d'une résistance sur l'efficacité du traitement.

- Le modèle a montré que les paramètres liés au traitement sont liés à la **libération de la substance active** et à la **durée de traitement**. Chacun de ces paramètres peut influencer l'efficacité et serait impliqué dans le risque de développement d'une résistance. Plus un traitement est court, plus il devra présenter une action rapide pour conserver une bonne efficacité. Les laboratoires pharmaceutiques devront trouver un compromis entre une durée de traitement optimale et une quantité de substance active optimale pour obtenir une bonne efficacité tout en limitant la pression de sélection sur les varroas résistants.
- Les paramètres liés à l'environnement et aux actions de l'apiculteur influencent également l'efficacité du traitement. Un traitement présente une meilleure efficacité hors couvain, la **période de traitement** est donc un paramètre clé pour s'assurer d'une bonne efficacité. Contrairement au pourcentage d'efficacité, le nombre de varroas résiduels dépend de **l'infestation initiale**. L'apiculteur doit donc maintenir un nombre de varroas faibles tout au long de l'année pour avoir un faible nombre de varroas résiduels en post-traitement pour ses abeilles d'hiver.

En fonction de l'efficacité du traitement, on retrouve 3 situations possibles pour l'apiculteur :

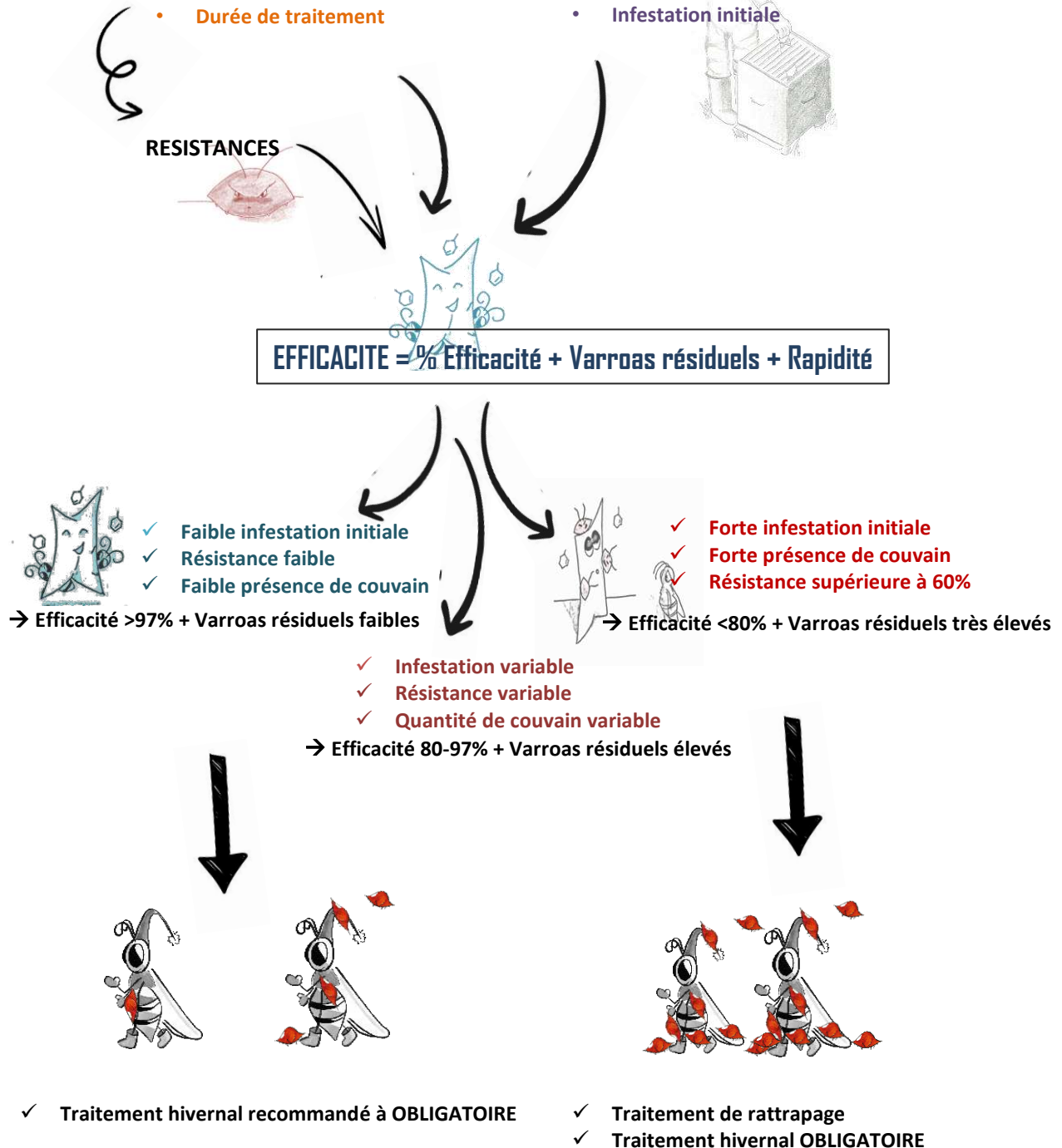
- 1) Si la population est très sensible et que l'infestation n'était pas trop élevée en pré-traitement, alors un seul traitement est suffisant pour contrôler la population de varroas d'année en année.
- 2) Dans la plupart des cas, les apiculteurs se trouvent dans la deuxième situation où l'efficacité du traitement est moyenne à cause d'une résistance modérée de la population de varroas alors que l'infestation en pré-traitement était trop élevée. Dans ce cas, l'apiculteur devra appliquer un traitement hivernal complémentaire qui réduira l'infestation en varroas pour l'année suivante.
- 3) La dernière situation se produit quand la proportion de varroas résistants à la substance active est supérieure à 60% et /ou à une forte infestation initiale. Le risque d'échec de traitement, dû à un nombre de varroas résiduels élevé, est alors grand. L'objectif pour tous les apiculteurs est d'éviter la situation 3.

Paramètres internes au traitement

- Libération de la substance active
- Quantité de substance active
- Durée de traitement

Paramètres externes au traitement

- Dynamique de couvain
- Période de traitement
- Infestation initiale



« Il n'y a pas de faits, seulement des interprétations »

Nietzsche

Discussion générale

Tout comme la plupart des acariciens, *Varroa destructor* a su développer des résistances aux différents acaricides. Sur l'ensemble des substances acaricides autorisées en France, des résistances ont été mises en évidence pour le tau-fluvalinate et l'amitraz à l'aide de tests de sensibilité phénotypiques (Chap.1 et 2). La présence de ces résistances ainsi que d'autres paramètres tels que l'infestation initiale, la rapidité de traitement ou la période de traitement peuvent entraîner une réduction de l'efficacité des traitements (Chap.3 et 4).

La mise en place de gestion des résistances du varroa aux acaricides devient indispensable pour conserver une bonne efficacité des traitements. Dans le milieu agricole, plusieurs stratégies de gestion de résistances des insectes sont déjà employées, elles sont appelées *Insect Resistance Management* (IRM). Nous ferons une présentation succincte de ces stratégies et de leur intégration à la lutte contre le varroa que nous appellerons *Varroa Resistance Management* (VRM). Dans le cadre de la VRM, nous développerons le rôle clé du test de sensibilité phénotypique dans l'analyse des gestions des résistances de Varroa.

En plus des résistances aux acaricides, l'apiculteur doit faire face à de nouvelles contraintes telles qu'une augmentation de la dynamique de ponte de la reine, la présence de pesticides, la réduction des ressources. Ces dernières modifient la gestion de l'infestation du varroa dans les colonies. Nous proposerons une stratégie intégrant à la fois la VRM et ces nouvelles contraintes pour l'apiculteur.

1. Insect Resistance Management (IRM) et Integrated Pest Management (IPM)

L'IPM est une gestion de lutte qui intègre 1) une optimisation des traitements pour en limiter la quantité et la fréquence au strict minimum pour des problématiques environnementales et sanitaires (Hackett and Bonsall, 2019; Lundin et al., 2021), 2) l'intégration de prédateurs naturels présents dans l'environnement, 3) le contrôle d'un seuil économique lors de l'application de pesticides et 4) l'intégration de plusieurs méthodes complémentaires de lutte (Ehler, 2006). Le principe de l'IPM est de mettre en place une gestion pour répondre aux problématiques locales et s'adapter à chaque situation. Pour des raisons environnementales et sanitaires, le traitement ne doit être appliqué que s'il est nécessaire (Onstad, 2013).

L'*Insect Resistance Management* (IRM) se développe en parallèle de l'*Integrated Pest Management* (IPM) (Brattsten et al., 1986). Son objectif est de mettre en place des stratégies visant à limiter le développement de résistances. Sa mise en place nécessite des connaissances sur la biologie de l'espèce cible, les mécanismes de résistances, et les caractéristiques de l'insecticide (FAO, 2013). Tout comme

dans l'IPM, la réduction de la fréquence des traitements est un des objectifs de l'IRM pour limiter la pression de sélection sur l'espèce cible et conserver une bonne efficacité des traitements. La diminution de la fréquence des traitements est un objectif commun entre l'IPM et l'IRM.

La meilleure stratégie de lutte est une combinaison de l'IRM et l'IPM sur le long terme (Hackett and Bonsall, 2019). En effet, la réduction de l'usage de pesticides réduira la pression sur les individus et donc le développement de résistances (Hoy, 1998). L'objectif principal des différentes stratégies de lutte dans l'IRM est de réduire le succès reproducteur des individus résistants dans la population (Roush, 1989). Il existe 4 stratégies de lutte utilisées en agriculture (Onstad, 2013). Chacune de ces stratégies présente des limites en fonction de l'espèce cible et du type de résistances développées. Le Tableau 20 décrit les conditions d'application de chacune de ces stratégies ainsi que leur limite d'utilisation. La Figure 44 synthétise les relations entre l'IPM et l'IRM.

Tableau 20: Description des différentes stratégies de lutte utilisées en agriculture dans la gestion des résistances des insectes/acariens.

<u>Stratégie</u>	<u>Description</u>	<u>Avantages/Limites</u>	<u>Références</u>
Zone refuge	• Absence de traitement sur certaines zones. • Réinfestation par des individus sensibles diminue la résistance dans les zones alentours	Maintien de zones infestées avec des individus sensibles (SS) Nécessite un deuxième traitement	(Brewer and Bonsall, 2021; Li et al., 2007; Roush, 1989)
Mélange de molécules	• Application simultanée de deux substances actives au même endroit • Pression de sélection simultanée	Efficace pour une faible fréquence de résistants Contrôle de compatibilité des molécules par un laboratoire Résistances croisées ¹	(Georghiou, 2012; Sudo et al., 2018; Tabashnik, 1989)
Mosaïque	Application simultanée de différentes substances actives à des endroits différents.	Associée à la stratégie zone refuge Collaboration entre agriculteurs Résistances croisées ¹	(Georghiou, 2012; Onstad, 2013; Roush, 1989)
Lutte alternée	Application en alternance de différentes substances actives au même endroit et à des moments différents	Résistance croisée ¹ Connaître la période de réversion ²	(Roush and Tabashnik, 2012; Roush, 1989; Sudo et al., 2018)

¹ Résistances croisées : elles représentent une limite pour chaque stratégie. Elles indiquent que les mécanismes de résistances sont similaires à deux substances actives. En présence de résistances croisées à certains pesticides, les stratégies ne sont plus efficaces.

² Période de réversion : elle correspond au temps nécessaire pour qu'une population perde une résistance à une substance active. Elle est souvent liée au coût physiologique lié à la résistance (Kliot and Ghanim, 2012). En l'absence de pression de sélection, l'individu résistant présente un succès reproducteur inférieur aux individus sensibles.

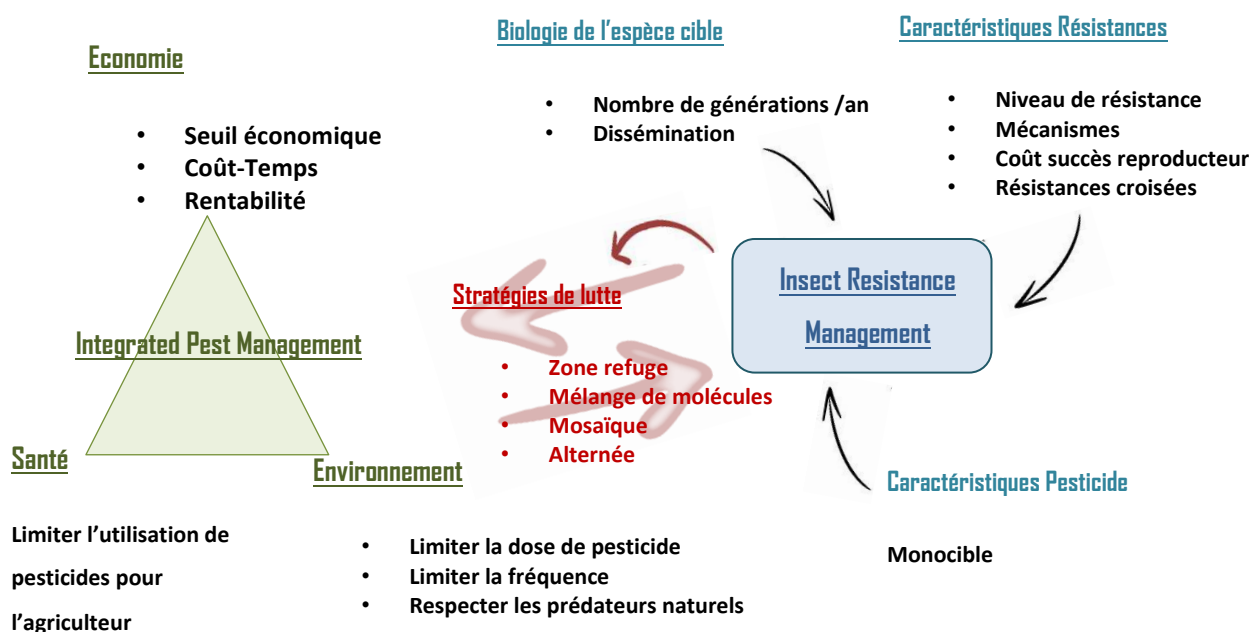


Figure 44 : Schématisation de la relation entre l'IPM et l'IRM et leurs objectifs. Les stratégies de lutte employées en IRM pour contrôler le développement de résistance sont reliées à l'objectif de l'IPM de réduire la quantité d'intrants dans l'environnement, et indirectement liées à l'objectif économique en fonction de la stratégie choisie. Les facteurs influençant le choix de l'IRM sont également listés en fonction de leur rapport à la molécule utilisée, à l'espèce cible ou aux caractéristiques de la résistance concernée.

2. La gestion des résistances chez *Varroa destructor*, *Varroa* Resistance Management (VRM)

Le développement de résistances de varroa aux acaricides implique une diminution de l'efficacité des traitements et la mise en place de stratégies de lutte adaptées. La mise en place de stratégies dépend de plusieurs paramètres comme la biologie, l'écologie de l'espèce cible et les caractéristiques chimiques de l'insecticide/acaricide. L'objectif de la mise en place d'une gestion des résistances de varroa aux acaricides (VRM) est de ne pas dériver vers une apiculture où les traitements seraient quasi-permanents.

2.1. Le test de sensibilité phénotypique : un outil pour la VRM

Les stratégies de lutte contre les résistances peuvent être mises en place en amont de la détection d'une résistance. Lors d'une résistance avérée, les informations apportées par le test permettent de valider la mise en place de stratégies. Ces outils sont utilisés dans de nombreux cas : lutte contre les moustiques (OMS, 2018) ou lutte contre les insectes et acariens ravageurs (R4P, IRAC, ANSES) (Ducornez et al., 2005). La détection d'une résistance peut avoir deux usages :

1. Usage en post-traitement : Implication de la présence de résistances à la suite d'un échec de traitement
2. Usage en pré-traitement : Anticiper une résistance et adapter le traitement

Détecter la présence de résistances chez *Varroa destructor* est un outil préalable à la mise en place de stratégies de gestion des résistances au tau-fluvalinate et à l' amitraze. Des études complémentaires comme des études moléculaires peuvent être réalisées sur les populations résistantes pour déterminer l'origine de la résistance (Campbell et al., 2016; González-Cabrera et al., 2018; Millán-Leiva et al., 2021). En fonction de l'origine de la résistance, différentes stratégies peuvent être proposées. Notamment, une résistance liée à la cible ou métabolique n'a pas les mêmes implications pour la stratégie de lutte (transmission de la résistance dans la population) (Jonsson and Hope, 2007).

2.1.a. Usage en post-traitement

L'usage en post-traitement du test de sensibilité du varroa à l' amitraze ou au tau-fluvalinate serait principalement utile dans le cas d'une **vérification de l'origine de l'échec de traitement**. L'origine d'un échec de traitement est multifactorielle. Nous avons montré dans les chapitres 3 et 4 que l'infestation initiale, la période de traitement et la présence de varroas résistants, ou encore la formulation du traitement influencent son efficacité. L'effet environnemental, « rucher », sur l'efficacité des traitements a également été mis en évidence (Gracia et al., 2017). La possibilité de réaliser un test de sensibilité permettrait donc d'une part d'écarter ou de confirmer la présence de varroas résistants dans la population à la suite d'un échec de traitement, et d'autre part d'apporter des informations utiles pour le choix du traitement l'année suivante (Figure 45).

Si la population de varroas en post-traitement n'est pas résistante à la substance acaricide utilisée lors du dernier traitement, d'autres hypothèses devront être posées sur l'origine de l'échec de traitement telles qu'une infestation initiale trop élevée, un traitement trop tardif, une mauvaise posologie ou bien encore une réinfestation (Peck and Seeley, 2019). Une proportion de varroas résistants compris entre 25-60% associée à ces paramètres pourrait également expliquer un échec de traitement. Au contraire, la détection d'une forte proportion de varroas résistants donne une information sur l'origine de l'échec de traitement, utile aux vétérinaires, dans le cas de déclenchement de pharmacovigilance.

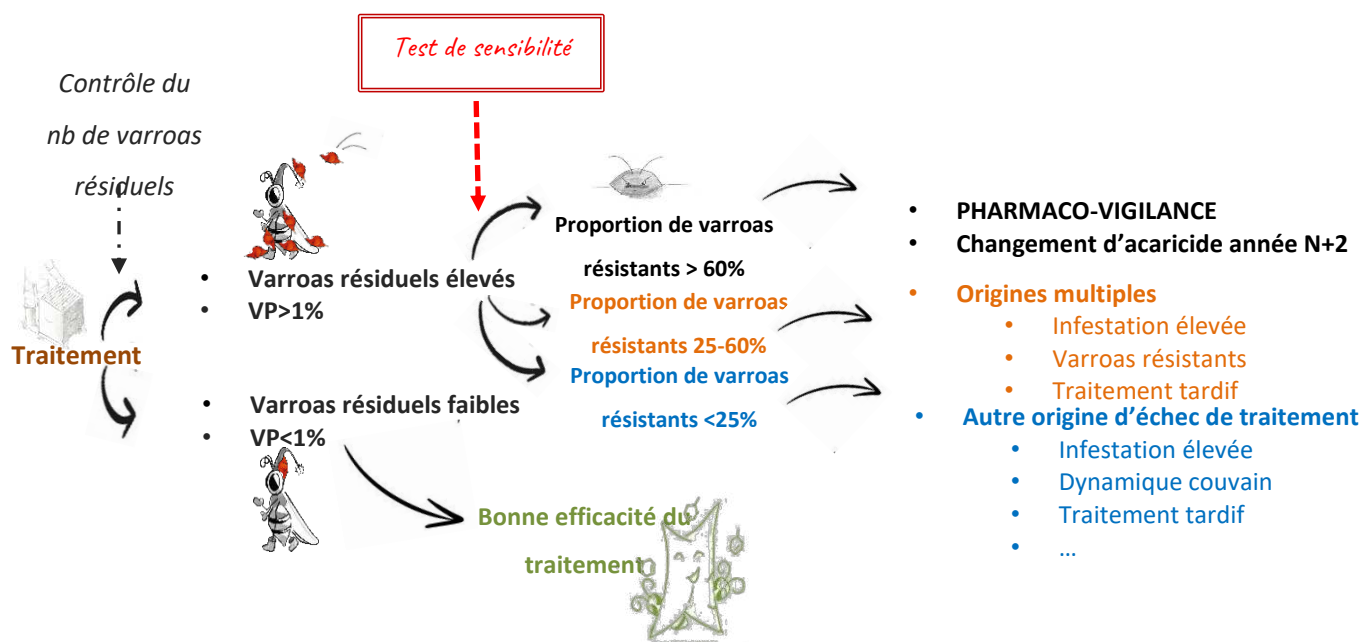


Figure 45: Schéma de l'utilisation d'un test de sensibilité phénotypique en post-traitement. Lors d'un contrôle réalisé en post-traitement, si le nombre de varroas résiduels est supérieur à 1%VP, plusieurs facteurs peuvent être responsables de cette infestation tels que : infestation initiale élevée, forte dynamique de couvain et varroas résistants.

2.1.b. Usage en pré-traitement : un outil d'aide à la décision

Dans la lutte contre le moustique, l'OMS a mis en place un test prédictif de résistances des moustiques pour faciliter le choix de la substance insecticide par les autorités et assurer une bonne efficacité du produit (OMS, 2018). Le test de sensibilité du varroa aux acaricides serait un avantage pour les vétérinaires, GDSA ou apiculteurs voulant optimiser le choix du traitement. Dans ce cas, Le test de sensibilité en pré-traitement est un **test prédictif de l'efficacité du traitement qui pourrait servir d'outil d'aide à la décision** (González-Cabrera et al., 2016) (Figure 46).

L'influence de la présence de varroas résistants devrait être évaluée pour l'ensemble des traitements avec AMM pour prédire l'efficacité de l'ensemble des traitements. L'utilisation du test de sensibilité en pré-traitement permet donc d'éliminer un facteur de risque d'échec de traitement (la proportion de varroas résistants) mais pas d'assurer avec certitude un nombre de varroas résiduels faible en post-traitement (Chap.3 et 4).

Sur le terrain, l'efficacité du traitement Apivar® sur des populations sensibles est élevée (supérieure à 96%) (Hernández-Rodríguez et al., 2021). Des suivis réalisés il y a plusieurs années par les ADA et la FNOSAD présentent des résultats similaires en France (Hernandez et al., 2014; Vandame, 2018). Cependant, les résultats des suivis d'efficacité réalisés par l'ADA AURA en 2020 ont mis en évidence une efficacité moyenne d'Apivar® de 78%. Nous avons montré par le modèle que ces réductions

d'efficacité peuvent s'expliquer par la présence de plus de 60% de varroas résistants dans la population. Or les varroas testés en pré-traitement présentaient une résistance supérieure à 60% à la CL90 (amitraze). Le test de sensibilité pourrait donc permettre de prédire *en partie* l'efficacité du traitement. Si la proportion de varroas résistants dans la population est faible, la VRM sera toujours recommandée avant que la proportion de varroas résistants augmente (Tabashnik, 1989). Dans le cas où la proportion de varroas résistants est supérieure à 60% et que le risque d'échec de traitement est grand, la mise en place d'une VRM devient obligatoire (Figure 46).

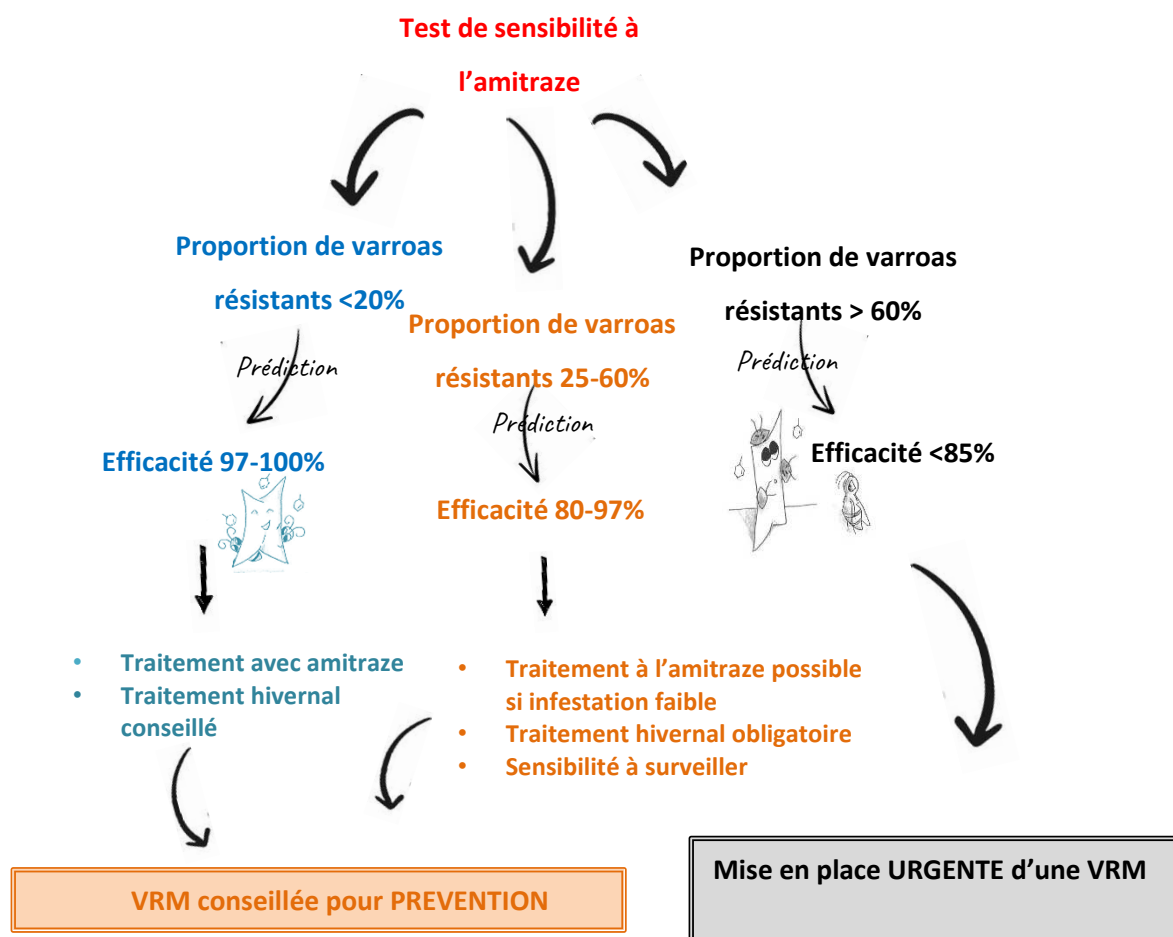


Figure 46: Schéma d'aide à la décision du traitement en fonction du résultat de test de sensibilité à l'amitraze. Le test de sensibilité représente le test de sensibilité phénotypique à la CL90. La proportion de varroas survivants à la CL90 indique la **proportion** de varroas résistants dans la population. La prédiction de l'efficacité est possible grâce au modèle développé dans le chapitre 3.

3. Les perspectives d'évolution pour la VRM

Les stratégies utilisées dans le monde agricole et citées précédemment pourraient apporter des perspectives de recherches pour une proposition de VRM (Figure 47). Certaines possibilités peuvent être envisagées par les laboratoires pharmaceutiques alors que d'autres peuvent être directement mises en place par l'apiculteur avec les moyens disponibles. La recherche d'une nouvelle substance

active acaricide ne sera pas évoquée car la VRM devra être mise en place même si un nouvel acaricide est disponible sur le marché apicole.

3.1. Perspectives pour les laboratoires pharmaceutiques

Nous avons mis en évidence dans les chapitres 3 et 4 que les caractéristiques pharmaco-cinétiques entraînent des actions de traitement différentes sur la population de varroas. Notamment, 1) la durée de traitement et 2) la libération de la substance active influence l'efficacité du traitement. Par ailleurs, parmi les stratégies précédemment citées, 3) le mélange des molécules est une possibilité à envisager par les laboratoires pharmaceutiques.

3.1.a. La durée de traitement

En France, plusieurs apiculteurs ont tendance à laisser les traitements tout l'hiver pour diminuer au maximum le nombre de varroas en début de saison (Kretzschmar et al., 2019). Or, plus un traitement est long plus il sera, certes, efficace mais plus il fixera une résistance dans la population (FAO, 2013). La durée de traitement doit être adaptée pour que le traitement soit suffisamment efficace tout en fixant le moins possible une résistance. L'utilisation de traitement de longue durée alors que la population présente déjà une forte proportion de varroas résistants ne fera qu'accentuer la résistance (Roush and McKenzie, 1987). Cette pratique de rallongement de traitement lorsque l'efficacité diminue est contre-indiquée dans le cadre de la VRM. De plus, nous avons montré qu'un traitement plus court pouvait présenter une efficacité supérieure à la fois sur le terrain et par le modèle (Chap.4). L'efficacité du traitement ne dépend donc pas que de la durée de traitement.

3.1.b. La libération et la quantité de substance acaricide

La libération de la substance active dépend de la galénique du traitement et de la quantité de substance active. Nous avons pu mettre en évidence que dans un même environnement deux traitements aux galéniques différentes (et ayant la même substance active) présentaient des efficacités différentes sur le terrain (Chap.4). D'après le modèle, cette différence d'efficacité pourrait s'expliquer par un taux de mortalité plus élevé en début de traitement diminuant ainsi rapidement le nombre de varroas prêts à se reproduire. A quantité de couvain égale, nous pouvons en déduire qu'un taux de mortalité quotidien plus élevé des varroas implique une quantité de substance acaricide plus élevée. Dans notre étude, Supatraz® libère probablement plus de substance active par jour qu'Apivar®. Ces mêmes observations ont été faites pour le cas de différents traitements au thymol (Apiguard®, ApilifeVar® et traitement hors AMM) (Gracia et al., 2017). Concernant le traitement contre d'autres acariens, l'influence de la galénique sur l'efficacité a également été mise en évidence (Bianchi et al., 2003).

Des études sur les acariens ont notamment mis en évidence qu'une trop forte dose d'acaricides a tendance à ne sélectionner que les individus à haut niveau de résistance (RR). De plus, sa persistance dans l'environnement continue à effectuer une pression de sélection sur les survivants (Li et al., 2005; Tabashnik and Croft, 1982). D'ailleurs, les populations de varroas prélevées chez les apiculteurs appliquant des traitements hors AMM (souvent plus concentrés en acaricide) présentaient une résistance plus forte à l'amtaze que des varroas traités avec des traitements avec AMM (Chap.2). Une augmentation de la dose d'acaricide n'est qu'une option à court terme pour conserver une bonne efficacité de traitement. En effet, à un certain ratio de résistance, l'augmentation de la concentration ne sera plus efficace (Li et al., 2005). Au contraire, pour qu'une résistance soit retardée en diminuant la dose de pesticides, il faut que l'efficacité du traitement soit au maximum de 70% pour laisser suffisamment d'individus sensibles dans la population (Roush and Tabashnik, 2012). Or, une telle efficacité n'est pas suffisante pour contrôler une infestation. La diminution de la dose fixe également les résistances en ne tuant que les individus les plus sensibles (Onstad, 2013). L'association entre la durée de traitement et la quantité de substance active influence donc le développement de résistance chez le varroa comme cela a été montré chez d'autres acariens (Bianchi et al., 2003). Des études mettant en évidence ces effets sur *Varroa destructor* permettraient de développer des traitements adaptés à une VRM.

3.1.c. Stratégie par mélange de molécules

Les laboratoires pharmaceutiques ont également la possibilité de développer la stratégie de lutte par mixage de substances actives. En France, mixer différentes substances actives a déjà été fait par un laboratoire mais uniquement sur les traitements à substances acaricides autorisées en apiculture biologique (acide oxalique et formique) : Varromed®. Mixer différentes substances actives ne peut être proposé que par l'intermédiaire des laboratoires pharmaceutiques qui auront préalablement effectué l'ensemble des tests pour valider le mélange de plusieurs substances et notamment l'absence de résistances croisées et d'interactions entre les molécules (Jonsson and Hope, 2007; Roth et al., 2020). Par exemple, le traitement Amipol T® (non-autorisé en France) propose un mélange de deux substances actives : thymol et amtaze.

L'utilisation de stratégie de mélange de substances est adaptée pour les cas où la fréquence des individus résistants est faible (Roush, 1989). Cette stratégie semble parfaitement adaptée pour l'apiculture biologique puisqu'aucune résistance à l'acide oxalique et à l'acide formique n'a été mise en évidence. Une étude préliminaire française a néanmoins mis en évidence une baisse de sensibilité de certaines populations de varroas au thymol (communication orale). Cette stratégie, appliquée avant l'apparition de résistances, peut limiter l'apparition de résistances dans la population.

3.2. Perspectives pour les apiculteurs : Mise en place de stratégies

3.2.a. Les stratégies par zone refuge et mosaïque

Avec les traitements disponibles sur le marché, les apiculteurs peuvent mettre en place une VRM à l'échelle de leur cheptel (Figure 47). La **stratégie de zone refuge** se fait naturellement par la présence d'essaims naturels (Le Conte et al., 2007; Locke, 2016) et de ruches non traitées en disséminant des individus sensibles. Comme les apiculteurs n'ont aucune contrainte de choix de traitement, la **lutte en mosaïque** est également involontairement déjà mise en place, si ce n'est que les apiculteurs ne traitent pas tous en même temps. L'hétérogénéité des traitements utilisés par les apiculteurs par zone géographique engendre une lutte en mosaïque. D'un rucher à un autre, les varroas ne subiront pas les mêmes pressions de sélection si la substance acaricide utilisée diffère. Or, nous avons montré que les populations de varroas françaises présentaient une hétérogénéité des sensibilités au tau-fluvalinate et à l'amitraz (Chap.2). La présence de populations de varroas résistants et de baisse d'efficacité des traitements témoigne de l'importance de la mise en place de stratégies de lutte supplémentaires à la gestion des résistances chez Varroa.

3.2.b. La lutte alternée

L'utilisation d'acaricide à base de tau-fluvalinate et d'amitraz peut être maintenue à condition de mettre en place une lutte alternée (incluant la possibilité d'utiliser d'autres substances acaricides) (Vandervalk et al., 2014). L'alternance entre amitraz et tau-fluvalinate est possible car aucune résistance croisée entre le tau-fluvalinate et l'amitraz n'a encore été observée (Chap.2) (Kamler et al., 2016; Maggi et al., 2008).

Lutte alternée inter-annuelle

D'une année à l'autre les varroas passent plusieurs générations sans contact avec l'acaricide et perdent la résistance, notamment pendant les périodes de multi-infestations (Beaurepaire et al., 2017). C'est d'ailleurs pour cette raison que plusieurs études ont montré un retour de sensibilité au tau-fluvalinate chez d'anciennes populations de varroas résistants après quelques années sans utilisation de tau-fluvalinate (Milani and Vedova, 2002; Millán-Leiva et al., 2021). De plus, la résistance au tau-fluvalinate (L925V) entraînerait un coût physiologique *via* une réduction du succès reproducteur (González-Cabrera et al., 2013). Les quelques populations que nous avons pu tester, issues d'apiculteurs appliquant la lutte alternée, montrent que les populations de varroas ne présentent pas plus de 60% de varroas résistants à l'amitraz (Chap.2). Ces populations présentent donc un risque d'échec de traitement plus faible (Chap.3). L'alternance étant réalisée avec du tau-fluvalinate, les populations de

varroas présentait une proportion de varroas plus résistants au tau-fluvalinate juste après un traitement à l'Apistan®. D'après les connaissances actuelles, nous pouvons supposer que la lutte alternée avec tau-fluvalinate et amitraze permet de limiter le risque de sélectionner des populations de varroas fortement résistantes à l'amitraze. Néanmoins, l'application du tau-fluvalinate ne doit pas être réalisée deux années de suite car les populations testées présentaient une résistance au tau-fluvalinate forte l'année suivante (Chap.2). Par ailleurs, nous n'avons pas pu modéliser l'influence du ratio de résistance sur l'efficacité du traitement, alors que celui-ci semble jouer un rôle non négligeable dans l'efficacité des traitements (Rinkevich, 2020). Les acaricides pour lesquels les ratios de résistance sont plus élevés comme le tau-fluvalinate ou le coumaphos pourraient avoir une influence sur la période de réversion, et notamment augmenter la durée de la période de réversion. Cette observation a été confirmée dans le cadre de la lutte d'autres acariens (Chevillon et al., 2007; Maciel et al., 2015).

Lutte alternée intra-annuelle : bithérapie

La lutte alternée intra-annuelle et successive peut être appelée la lutte par bithérapie. Cette lutte est utilisée en Italie avec un traitement au thymol, suivi d'un traitement à base d'amitraze ou de tau-fluvalinate. A l'origine, cette stratégie a été mise en place pour garantir une efficacité maximale des traitements. En effet, elle est efficace dans la gestion du varroa et présente une efficacité supérieure à 98% (pers.comm). Cependant, son efficacité pour réduire le risque d'apparition de résistances n'a pas encore pu être mise en évidence. Néanmoins, la mise en place de stratégies de lutte alternée en prévention permet d'éviter le développement d'une résistance forte (Tabashnik, 1989).

Limites de la lutte alternée

Comme pour toute stratégie, la lutte alternée présente des limites. En effet, certains articles décrivent la présence d'acariens (d'élevage) résistants après avoir mis en place une lutte alternée de plusieurs années (Chevillon et al., 2007). Selon l'origine de la résistance, la période de réversion peut être longue et si le cycle de lutte alternée n'est pas adapté, la stratégie ne sera pas suffisamment efficace (Maciel et al., 2015; Sungirai et al., 2018). Pour améliorer le conseil concernant la lutte alternée, les recherches à venir devraient porter sur la **période de réversion** de la résistance au tau-fluvalinate mais également à l'amitraze. Ainsi des cycles d'alternance pourraient être conseillés en fonction du niveau de résistance à la substance acaricide.

3.2.c. Tolérances et résistances des abeilles

La sélection d'abeilles tolérantes ou résistantes au varroa peut être également considérée comme un élément clé dans la mise en place de la VRM. En effet, cela permettrait de réduire fortement la fréquence des traitements puisque les abeilles maintiendraient une infestation basse (Delaplane et al.,

2005). La recherche d'abeilles tolérantes est également un objectif dans le cadre de l'IPM : en plus de réduire la quantité d'acaricides (impact sanitaire et sur l'environnemental), le coût lié aux traitements diminuerait. D'ailleurs, depuis plusieurs années déjà, le nombre d'études sur les abeilles tolérances/résistantes au varroa a fortement augmenté (Mondet et al., 2020). Un grand nombre de populations d'abeilles présentent des comportements de tolérances/résistances au varroa, notamment en réduisant le succès reproducteur des varroas (*Supprime Mite Reproduction*) (Le Conte et al., 2020; Mondet et al., 2020). Bien que ces comportements soient observables dans un grand nombre de colonies, la sélection de ces comportements reste encore complexe. En effet, ces derniers sont peu héréditaires (Guichard et al., 2020) d'autant que le varroa développe à son tour une adaptation génétique face à la résistance de son hôte en augmentant sa probabilité de reproduction (Beaurepaire et al., 2019; Moro et al., 2021). Toutefois, la présence de ces abeilles résistantes est un élément à prendre en compte dans la VRM.

3.2.d. Méthodes complémentaires aux acaricides

De plus, l'utilisation de méthodes zootechniques complémentaires comme le retrait de couvain de mâles, la formation d'essaim ou l'application de traitements thermiques (voir Chap.1) est à développer dans le cadre de la VRM ou de l'IPM. Bien souvent, l'utilisation de ces méthodes doit être associée à un traitement acaricide pour être suffisamment efficace sur l'année. Toutefois, elles permettent la réduction de l'infestation à court terme, sans usage d'acaricide (Roth et al., 2020; Wilkinson and Smith, 2002). L'utilisation de méthodes réduisant l'infestation sans usage d'acaricides est vivement conseillée dans la lutte contre les résistances car cela permet de diminuer la pression de sélection (Rodriguez-Vivas et al., 2018).

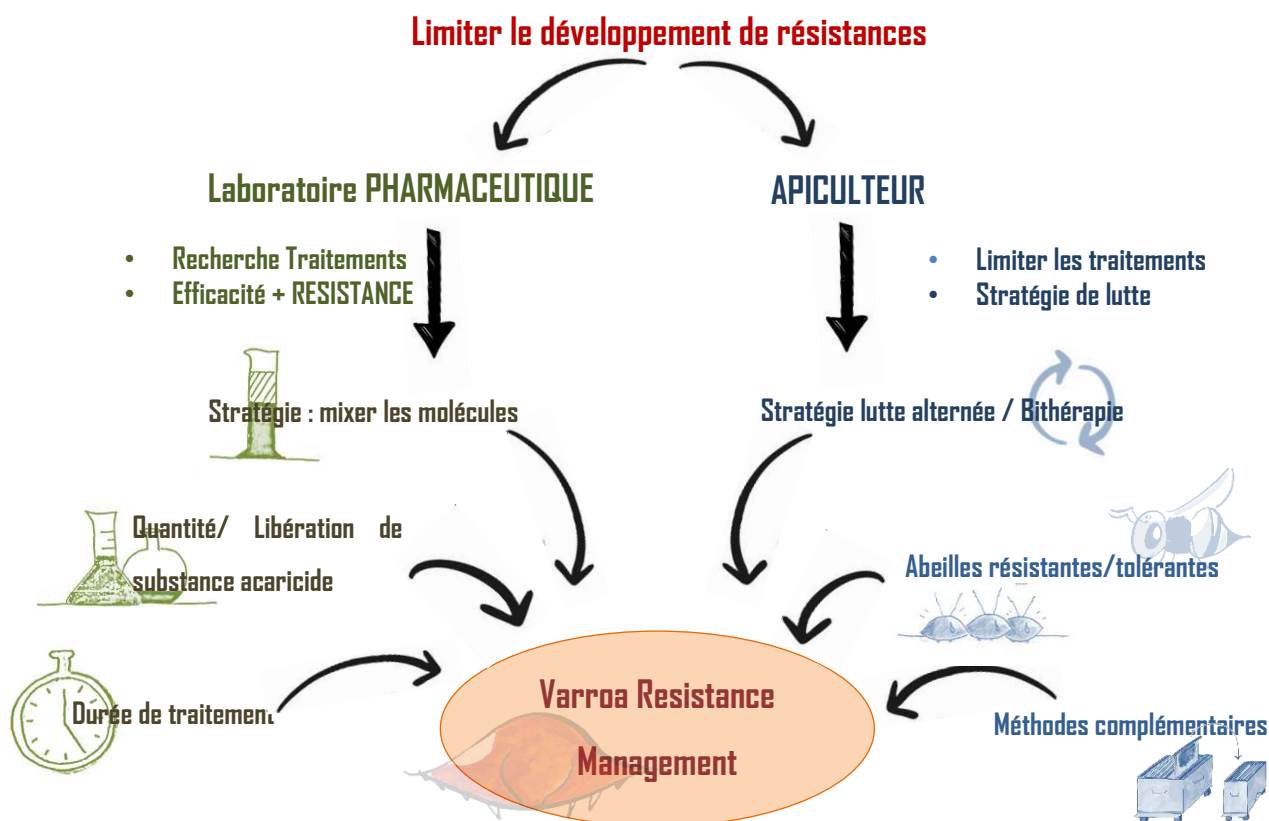


Figure 47: Facteurs influençant la gestion des résistances chez Varroa (VRM) et perspectives de recherche pour les laboratoires pharmaceutiques et les apiculteurs. Les laboratoires peuvent développer des recherches concernant l'influence de la durée et de la libération de la substance acaricide sur la résistance des varroas. Ils peuvent également développer de nouveaux traitements mélangeant certaines substances acaricides à condition de tester la synergie entre les molécules et l'absence de résistances croisées. Les apiculteurs ne peuvent utiliser que des traitements autorisés et mettre en place des stratégies telles que la lutte alternée. La sélection d'abeilles résistantes au varroa et l'utilisation de méthodes de lutte complémentaires pourraient être une piste de recherche pour limiter la fréquence d'utilisation des acaricides.

4. Stratégie d'avenir dans la gestion du varroa

La gestion du varroa devient de plus en plus complexe avec l'apparition de nouvelles contraintes telles que la modification du climat ou encore la présence de pesticides dans l'environnement et la quantité des ressources alimentaires ont des conséquences sur la dynamique des abeilles. Une stratégie de lutte pour la gestion du varroa implique en réalité l'intégration de nombreux paramètres tels que la santé des abeilles, le contrôle des ressources, la gestion de l'infestation et des résistances aux acaricides.

4.1. Les nouvelles contraintes impliquées dans la lutte contre le varroa

En plus de la présence de varroas résistants aux acaricides, la modification du climat et la présence de xénobiotiques dans l'environnement modifient l'apiculture moderne (Le Conte and Navajas, 2008; Dolezal et al., 2019; Pasquale et al., 2013) (Figure 48). Ces facteurs ont une influence sur la dynamique de ponte et l'immunité des abeilles.

La **dynamique de ponte des abeilles** dépend de son environnement, du climat et des ressources (Chen et al., 2007; Dechatre et al., 2021; Khoury et al., 2013; Roth et al., 2020; Russell et al., 2013). La diminution des ressources (Durant, 2019) et le réchauffement des hivers dans certaines régions d'Europe (Bindi and Olesen, 2010) entraînent des modifications des dynamiques de ponte de la reine. Notamment, en hiver, la période hors couvain se raccourcit et est même absente dans le sud de la France (Pers. communication) comme dans d'autres régions du monde (Switanek et al., 2017). Cela a des implications sur la dynamique de population du varroa mais également sur la complexification de l'application d'un traitement hivernal efficace (Conférence et GDSA AURA, 2021). Les apiculteurs doivent donc faire face à une augmentation de la période de présence de couvain et donc d'une augmentation de l'infestation de la colonie.

En parallèle, l'immunité des abeilles diminue par 1) la **présence de pathogènes (virus)** dans la colonie (Beaurepaire et al., 2020), 2) la **diminution des ressources alimentaires (quantité et qualité)** (DeGrandi-Hoffman and Chen, 2015; Pasquale et al., 2013) et 3) la présence de **xénobiotiques** dans l'environnement (Cochard et al., 2021; Magal et al., 2019; Wu et al., 2011).

La gestion du varroa évolue au fur et à mesure des nouvelles contraintes environnementales subies par les abeilles (Dolezal et al., 2019). En climat tempéré, le seuil d'infestation économique à ne pas dépasser a été fixé actuellement à 3 varroas phorétiques (VP) pour cent abeilles (3%VP) en été (avant traitement) (Dechatre et al., 2021; Kulhanek et al., 2021).

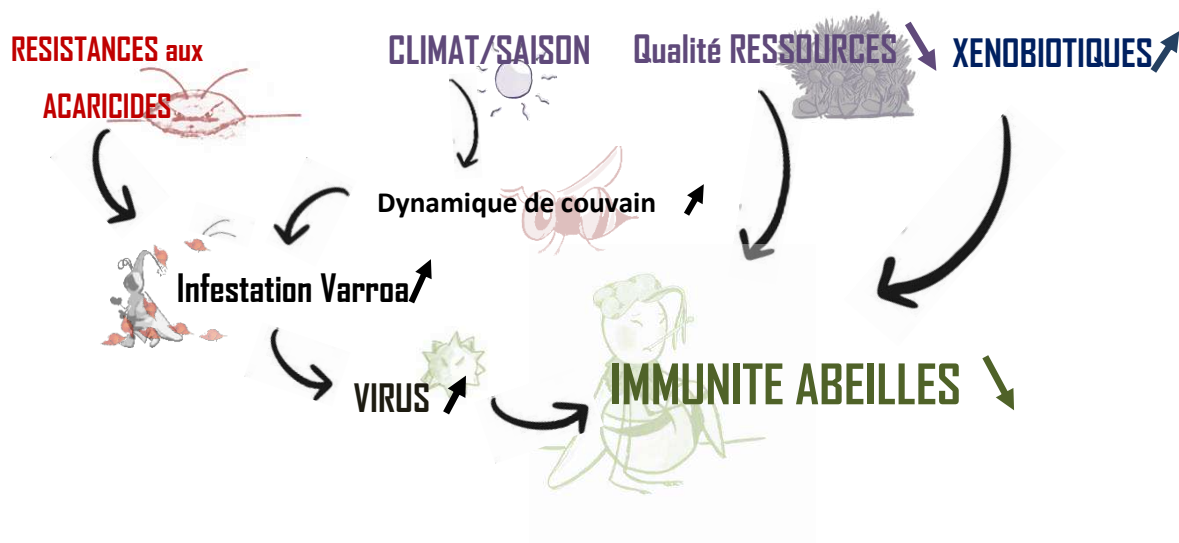


Figure 48: Facteurs influençant l'immunité des abeilles : la résistance aux acaricides, le climat, la quantité et la qualité des ressources alimentaires des abeilles et la présence de xénobiotiques dans l'environnement. Tous ces facteurs influencent directement ou indirectement l'immunité des abeilles et les rend moins tolérantes aux varroas.

4.2. Quelle stratégie d'avenir dans la lutte contre varroa ?

La gestion des résistances chez Varroa permet d'éliminer un des facteurs de risque d'échec de traitement. Pourtant, la mise en place d'une VRM ne suffira probablement pas à assurer une bonne efficacité globale du traitement. Plusieurs études ont présenté de nouvelles pratiques de gestion de cheptel basées sur l'IPM (Kulhanek et al., 2021). Elles proposent une gestion du varroa à l'échelle de la ruche. Cette gestion implique un **suivi individuel** des colonies. L'objectif est ainsi d'appliquer un traitement uniquement quand il est nécessaire. Plusieurs études ont montré que le seuil d'infestation ne devait pas dépasser 3 varroas phorétiques pour 100 abeilles (3%VP) (Dechatre et al., 2021; Kulhanek et al., 2021). Au-delà de ce seuil, la quantité de virus augmente et la colonie risque de déclencher la varroose. L'apiculteur doit s'assurer que ce seuil n'est donc pas dépassé en été. En début de saison, le seuil à ne pas dépasser a été fixé par les ADA et l'ITSAP à moins de 1% de varroas phorétiques pour que la colonie puisse effectuer une saison apicole jusqu'au traitement estival de fin de saison (Cahier technique, 2019). Le minimum serait donc de contrôler l'infestation en post-traitement afin de s'assurer d'une bonne efficacité globale du traitement (Frontero, 2020). Si le nombre de varroas résiduels est trop élevé, l'apiculteur ne pourra pas conclure sur l'origine de l'échec de traitement mais pourra effectuer un traitement de rattrapage / traitement hivernal en fonction de l'infestation. Un test de sensibilité pourra être réalisé pour écarter/confirmer la présence de varroas résistants dans la population (voir § 2.1 Le test de sensibilité phénotypique : un outil pour la VRM). L'apiculteur peut également réaliser des suivis d'infestation en début de saison pour s'assurer que ses colonies pourront faire la saison et attendre le traitement de fin de saison (<1%VP). Si l'infestation est supérieure à 1%VP,

alors l'apiculteur peut produire des essaims et les traiter ou réaliser un circuit de transhumance plus court pour traiter avant que l'infestation ne soit supérieure à 3%VP (Frontero, 2020). L'efficacité des traitements augmente lorsque la colonie est hors couvain (Delaplane et al., 2005). Ainsi, l'apiculteur peut utiliser des périodes naturelles comme un blocage de ponte en miellée ou un remérage (changement de reine) pour augmenter l'efficacité de ses traitements.

Tous ces suivis d'infestation demandent du temps à l'apiculteur. Ce temps doit être estimé pour pouvoir évaluer les bénéfices obtenus. Par exemple, une étude a mis en évidence que les colonies infestées à environ 5%VP sur la miellée de lavande produisaient 25% de miel de moins qu'une colonie avec moins de 1%VP (Mondet et al., 2016). Ou encore, une étude a mis en évidence le gain pour les apiculteurs lors du passage d'une stratégie de gestion intensive à individuelle (Kulhanek et al., 2021). Dans le cadre de la mise en place d'une IPM, ce rapport coût/bénéfices doit être rentable mais il est souvent peu évalué car multifactoriel (Davis, 1996). Pourtant, il rassurerait l'apiculteur sur le choix de la stratégie à employer.

Grâce à la mise en place de la VRM et du contrôle des infestations, 1) la proportion de varroas résistants en pré-traitement devrait être inférieure à 60% et 2) le niveau d'infestation devrait être inférieur à 3%VP avant le traitement estival. Ces deux conditions atteintes permettent d'augurer une bonne efficacité globale de traitement : pourcentage d'efficacité >98%, varroas résiduels faibles et une rapidité d'action du traitement (Figure 49).

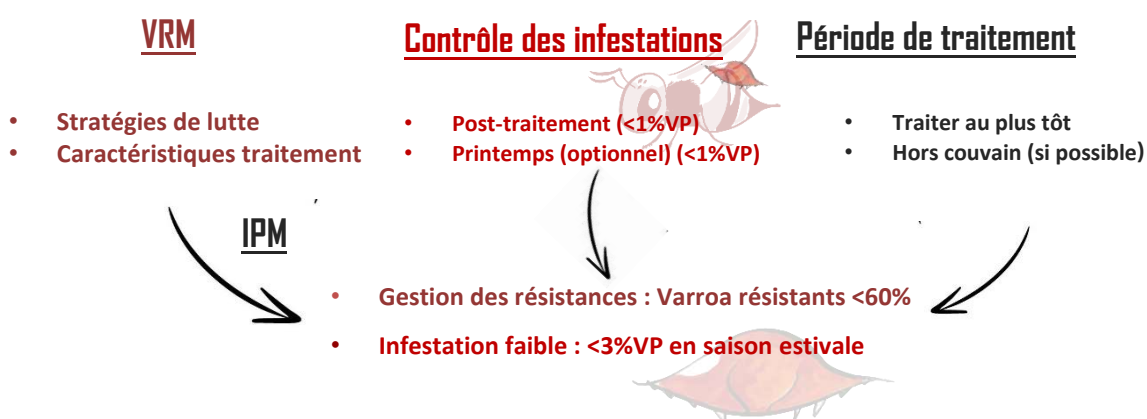


Figure 49: Schéma intégrant l'ensemble des paramètres impliqués dans la gestion du varroa par l'apiculteur. Le contrôle des infestations permet de pallier la présence d'une faible proportion de varroas résistants. C'est pourquoi un seuil d'infestation maintenu inférieur à 3% avant le traitement estival devrait assurer à l'apiculteur une meilleure efficacité de traitement (varroas résiduels plus faibles). La période de traitement est également un facteur clé car elle est directement liée au niveau d'infestation de la colonie.

Conclusion

Résultats de recherches : Ce travail de thèse a permis de mettre en évidence la présence de varroas résistants au tau-fluvalinate et à l'amitrazé en France à partir de tests de sensibilité phénotypique. Ce test pourrait être utilisé en routine et servir d'outil à la décision dans le choix du traitement pour les vétérinaires et les apiculteurs. La diversité des moyens de lutte employés par les apiculteurs entraîne une hétérogénéité dans les sensibilités/résistances des varroas. La modélisation de l'action du traitement Apivar® sur une population de varroas a permis de mettre en évidence les différents paramètres impliqués dans l'efficacité du traitement : infestation initiale, période de traitement, et proportion de varroas résistants. De même l'efficacité globale d'un traitement doit tenir compte du 1) pourcentage d'efficacité, 2) du nombre de varroas résiduels et 3) de la rapidité d'action du traitement. Pour le traitement Apivar®, une proportion de varroas résistants supérieure à 60% entraîne une efficacité de traitement inférieure à 85%. L'influence de la proportion de varroas résistants sur l'efficacité du traitement peut varier en fonction du traitement, notamment en fonction de sa durée, de sa quantité de substance acaricide et de sa rapidité de libération. Ces découvertes impliquent de mettre en place des stratégies de lutte adaptées pour limiter le développement des varroas résistants dans la population : *Varroa Resistance Management* (VRM).

Perspectives de recherches : La présence de varroas résistants dans une population semble influencer l'efficacité des traitements. Il serait intéressant d'évaluer l'influence de la proportion de varroas résistants sur les différents traitements existants : Apitraz® et Apistan®. Néanmoins, de nombreux éléments sont manquants pour valider le choix de la stratégie pour limiter le développement de résistance. Des recherches sur les caractéristiques des traitements pourraient être réalisées par les laboratoires pharmaceutiques pour trouver un compromis entre 1) quantité et libération de substance acaricide et 2) durée de traitement. Ils pourraient également faire des analyses pour la mise en place de stratégies de mixage des molécules. Concernant les organismes d'apiculture et les apiculteurs, des recherches peuvent être développées avec les traitements déjà existants. Bien que la lutte alternée inter-annuelle puisse éviter une forte proportion de varroas résistants à l'amitrazé dans la population, son efficacité n'a pas encore été démontrée en apiculture d'après nos connaissances. L'optimisation de l'alternance des cycles doit encore être établie. La lutte alternée en bithérapie pourrait également présenter un intérêt dans la VRM.

« Au fond de l'inconnu pour trouver du nouveau »

Baudelaire

Références

- Abdi, H., 2010. Coefficient of Variation. *Encycl. Res. Des.*
- Abrol, D.P., Shankar, U., Nitin, K.S., Gowda, G.B., 2016. Honeybees and Beekeeping: The Global Scenario, in: Chakravarthy, A.K., Sridhara, S. (Eds.), *Arthropod Diversity and Conservation in the Tropics and Sub-Tropics*. Springer Singapore, Singapore, pp. 345–372. https://doi.org/10.1007/978-981-10-1518-2_22
- Adam, F., 1980. A la recherche des meilleures races d'abeilles, *Le Courrier du Livre*. ed.
- Adjlane, N., 2017. EVALUATION OF THE RESISTANCE OF THE MITE *Varroa destructor* TO THE AMITRAZ IN COLONIES OF HONEY BEES (*Apis mellifera*) IN ALGERIA. *Uludağ Arıcılık Derg.* 17, 1–6. <https://doi.org/10.31467/uluaricilik.373716>
- Adjlane, N., Doumandji, S.-E., Haddad, N., 2012. Situation de l'apiculture en Algérie : facteurs menaçant la survie des colonies d'abeilles locales *Apis mellifera* intermissa. *Cah. Agric.* 21, 235–241 (1). <https://doi.org/10.1684/agr.2012.0566>
- Alissandrakis, E., Ilias, A., Tsagkarakou, A., 2017. Pyrethroid target site resistance in Greek populations of the honey bee parasite *Varroa destructor* (Acari: Varroidae). *J. Apic. Res.* 56, 625–630. <https://doi.org/10.1080/00218839.2017.1368822>
- Almecija, G., Poirot, B., Cochard, P., Suppo, C., 2020. Inventory of *Varroa destructor* susceptibility to amitraz and tau-fluvalinate in France. *Exp. Appl. Acarol.* 82, 1–16. <https://doi.org/10.1007/s10493-020-00535-w>
- Almecija, G., Poirot, B., Ventelon, M., Suppo, C., 2021. Modelling the impact of Apivar® treatment on a *Varroa* mite population and the influence of resistance. *Pest Manag. Sci.* ps.6698. <https://doi.org/10.1002/ps.6698>
- Alverson, J., 2003. Effects of mycotoxins, kojic acid and oxalic acid, on biological fitness of *Lygus hesperus* (Heteroptera: Miridae). *J. Invertebr. Pathol.* 83, 60–62. [https://doi.org/10.1016/S0022-2011\(03\)00040-5](https://doi.org/10.1016/S0022-2011(03)00040-5)
- Amdam, G.V., Hartfelder, K., Norberg, K., Hagen, A., Omholt, S.W., 2004. Altered Physiology in Worker Honey Bees (Hymenoptera: Apidae) Infested with the Mite *Varroa destructor* (Acari: Varroidae): A Factor in Colony Loss During Overwintering? *J. Econ. Entomol.* 97, 741–747. <https://doi.org/10.1093/jee/97.3.741>
- Anderson, D.L., Trueman, J.W.H., 2000. *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) is more than one species. *Exp. Appl. Acarol.* 24, 165–189. <https://doi.org/10.1023/A:1006456720416>
- Annoscia, D., Del Piccolo, F., Covre, F., Nazzi, F., 2015. Mite infestation during development alters the in-hive behaviour of adult honeybees. *Apidologie* 46, 306–314. <https://doi.org/10.1007/s13592-014-0323-0>
- Annoscia, D., Del Piccolo, F., Nazzi, F., 2012. How does the mite *Varroa destructor* kill the honeybee *Apis mellifera*? Alteration of cuticular hydrocarbons and water loss in infested honeybees. *J. Insect Physiol.* 58, 1548–1555. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2012.09.008>
- Ayup, M.M., Gärtner, P., Agosto-Rivera, J.L., Marendy, P., de Souza, P., Galindo-Cardona, A., 2021. Analysis of Honeybee Drone Activity during the Mating Season in Northwestern Argentina. *Insects* 12, 566. <https://doi.org/10.3390/insects12060566>
- Bahreini, R., Nasr, M., Docherty, C., Feindel, D., Muirhead, S., Herdt, O. de, 2021. New bioassay cage methodology for in vitro studies on *Varroa destructor* and *Apis mellifera*. *PLOS ONE* 16, e0250594. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0250594>
- Barnosky, A.D., Matzke, N., Tomiya, S., Wogan, G.O.U., Swartz, B., Quental, T.B., Marshall, C., McGuire, J.L., Lindsey, E.L., Maguire, K.C., Mersey, B., Ferrer, E.A., 2011. Has the Earth's sixth mass extinction already arrived? *Nature* 471, 51–57. <https://doi.org/10.1038/nature09678>
- Baron, S., Barrero, R.A., Black, M., Bellgard, M.I., van Dalen, E.M.S., Fourie, J., Maritz-Olivier, C., 2018. Differentially expressed genes in response to amitraz treatment suggests a proposed model of resistance to amitraz in *R. decoloratus* ticks. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.*, Includes

- articles from the scientific meeting: “Anthelmintics: From Discovery to Resistance III”, pp. 494-628 8, 361–371. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2018.06.005>
- Baron, S., Merwe, N.A. van der, Madder, M., Maritz-Olivier, C., 2015. SNP Analysis Infers that Recombination Is Involved in the Evolution of Amitraz Resistance in *Rhipicephalus microplus*. PLOS ONE 10, e0131341. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131341>
- Baude, M., Kunin, W.E., Boatman, N.D., Conyers, S., Davies, N., Gillespie, M.A.K., Morton, R.D., Smart, S.M., Memmott, J., 2016. Historical nectar assessment reveals the fall and rise of floral resources in Britain. *Nature* 530, 85–88. <https://doi.org/10.1038/nature16532>
- Beaurepaire, A., Piot, N., Doublet, V., Antunez, K., Campbell, E., Chantawannakul, P., Chejanovsky, N., Gajda, A., Heerman, M., Panziera, D., Smagghe, G., Yañez, O., de Miranda, J.R., Dalmon, A., 2020. Diversity and Global Distribution of Viruses of the Western Honey Bee, *Apis mellifera*. *Insects* 11, 239. <https://doi.org/10.3390/insects11040239>
- Beaurepaire, A.L., Krieger, K.J., Moritz, R.F.A., 2017. Seasonal cycle of inbreeding and recombination of the parasitic mite *Varroa destructor* in honeybee colonies and its implications for the selection of acaricide resistance. *Infect. Genet. Evol.* 50, 49–54. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.02.011>
- Beaurepaire, A.L., Moro, A., Mondet, F., Le Conte, Y., Neumann, P., Locke, B., 2019. Population genetics of ectoparasitic mites suggest arms race with honeybee hosts. *Sci. Rep.* 9, 11355. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47801-5>
- Beyer, M., Junk, J., Eickermann, M., Clermont, A., Kraus, F., Georges, C., Reichart, A., Hoffmann, L., 2018. Winter honey bee colony losses, *Varroa destructor* control strategies, and the role of weather conditions: Results from a survey among beekeepers. *Res. Vet. Sci.* 118, 52–60. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2018.01.012>
- Bianchi, M.W., Barré, N., Messad, S., 2003. Factors related to cattle infestation level and resistance to acaricides in *Boophilus microplus* tick populations in New Caledonia. *Vet. Parasitol.* 112, 75–89. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(02\)00415-6](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(02)00415-6)
- Biesmeijer, J.C., Roberts, S.P.M., Reemer, M., Ohlemüller, R., Edwards, M., Peeters, T., Schaffers, A.P., Potts, S.G., Kleukers, R., Thomas, C.D., Settele, J., Kunin, W.E., 2006. Parallel Declines in Pollinators and Insect-Pollinated Plants in Britain and the Netherlands. *Science* 313, 351–354. <https://doi.org/10.1126/science.1127863>
- Bindi, M., Olesen, J.E., 2010. ORIGINAL ARTICLE The responses of agriculture in Europe to climate change.
- Blacqui re, T., Boot, W., Calis, J., Moro, A., Neumann, P., Panziera, D., 2019. Darwinian black box selection for resistance to settled invasive *Varroa destructor* parasites in honey bees. *Biol. Invasions* 21, 2519–2528. <https://doi.org/10.1007/s10530-019-02001-0>
- Bloch, G., Francoy, T.M., Wachtel, I., Panitz-Cohen, N., Fuchs, S., Mazar, A., 2010. Industrial apiculture in the Jordan valley during Biblical times with Anatolian honeybees. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 11240–11244. <https://doi.org/10.1073/pnas.1003265107>
- Boecking, O., Genersch, E., 2008. Varroosis – the Ongoing Crisis in Bee Keeping. *J. F r Verbraucherschutz Leb.* 3, 221–228. <https://doi.org/10.1007/s00003-008-0331-y>
- Bonafos, R., Guillet, B., Colin, M.E., Kreiter, S., 2018. Monitoring de la sensibilité/résistance de *Varroa destructor* Anderson et Trueman aux acaricides, in: 9. Conférence Internationale Sur Les Ravageurs En Agriculture, 9. Conférence Internationale Sur Les Ravageurs En Agriculture AFPP. Association Française de Protection des Plantes (AFPP). FRA., Montpellier, France, p. 10 p.
- Boot, W.J., Calis, J.N.M., Beetsma, J., 1993. Invasion of *Varroa jacobsoni* into honey bee brood cells: a matter of chance or choice? *J. Apic. Res.* 32, 167–174. <https://doi.org/10.1080/00218839.1993.11101302>
- Boot, W.J., Calis, J.N.M., Beetsma, J., 1992. Differential periods of *Varroa* mite invasion into worker and drone cells of honey bees. *Exp. Appl. Acarol.* 16, 295–301. <https://doi.org/10.1007/BF01218571>
- Boot, W.J., Calis, J.N.M., Beetsma, J., Hai, D.M., Lan, N.K., Toan, T.V., Trung, L.Q., Minh, N.H., 1999. Natural selection of *Varroa jacobsoni* explains the different reproductive strategies in colonies

- of *Apis cerana* and *Apis mellifera*. *Exp. Appl. Acarol.* 23, 133–144. <https://doi.org/10.1023/A:1006050527004>
- Boot, W. J., Schoenmaker, J., Calis, J.N.M., Beetsma, J., 1995. Invasion of *Varroa jacobsoni* into drone brood cells of the honey bee, *Apis mellifera*. *Apidologie* 26, 109–118. <https://doi.org/10.1051/apido:19950204>
- Bowen-Walker, P.L., Martin, S.J., Gunn, A., 1999. The Transmission of Deformed Wing Virus between Honeybees (*Apis mellifera*L.) by the Ectoparasitic Mite *Varroa jacobsoni* Oud. *J. Invertebr. Pathol.* 73, 101–106.
- Bowen-Walker, P.L., Martin, S.J., Gunn, A., 1997. Preferential distribution of the parasitic mite, *Varroa jacobsoni* Oud. on overwintering honeybee (*Apis mellifera* L.) workers and changes in the level of parasitism. *Parasitology* 114, 151–157. <https://doi.org/10.1017/S0031182096008323>
- Brattsten, L.B., Holyoke, C.W., Leeper, J.R., Raffa, K.F., 1986. Insecticide Resistance: Challenge to Pest Management and Basic Research. *Science* 231, 1255–1260. <https://doi.org/10.1126/science.231.4743.1255>
- Breeze, T.D., Vaissière, B.E., Bommarco, R., Petanidou, T., Seraphides, N., Kozák, L., Scheper, J., Biesmeijer, J.C., Kleijn, D., Gylstenkærne, S., Moretti, M., Holzschuh, A., Steffan-Dewenter, I., Stout, J.C., Pärtel, M., Zobel, M., Potts, S.G., 2014. Agricultural Policies Exacerbate Honeybee Pollination Service Supply-Demand Mismatches Across Europe. *PLOS ONE* 9, e82996. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082996>
- Brewer, T.R., Bonsall, M.B., 2021. Combining refuges with transgenic insect releases for the management of an insect pest with non-recessive resistance to Bt crops in agricultural landscapes. *J. Theor. Biol.* 509, 110514. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2020.110514>
- Brosi, B.J., Delaplane, K.S., Boots, M., de Roode, J.C., 2017. Ecological and evolutionary approaches to managing honeybee disease. *Nat. Ecol. Evol.* 1, 1250–1262. <https://doi.org/10.1038/s41559-017-0246-z>
- Büchler, R., Berg, S., Le Conte, Y., 2010. Breeding for resistance to *Varroa destructor* in Europe. *Apidologie* 41, 393–408. <https://doi.org/10.1051/apido/2010011>
- Butler Colin Gasking, Callow Robert Kenneth, Johnston Norah C., 1962. The isolation and synthesis of queen substance, 9-oxodec-trans-2-enoic acid, a honeybee pheromone. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 155, 417–432. <https://doi.org/10.1098/rspb.1962.0009>
- Cahier technique, 2019. Cahier Technique Apicole: Améliorer la gestion de *Varroa* pour sa propre exploitation. Résultats d'expérimentation ADA-ITSAP-INRA-Apiculteurs.
- Calderone, N.W., 2005. Evaluation of Drone Brood Removal for Management of *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) in Colonies of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) in the Northeastern United States. *J. Econ. Entomol.* 98, 6.
- Calderone, N.W., Lin, S., 2001. Behavioural responses of *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) to extracts of larvae, cocoons and brood food of worker and drone honey bees, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Physiol. Entomol.* 26, 341–350. <https://doi.org/10.1046/j.0307-6962.2001.00254.x>
- Calis, J.N.M., Fries, I., Ryrle, S.C., 1999. Population modelling of *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie* 30, 111–124. <https://doi.org/10.1051/apido:19990203>
- ÇALIŞKAN, M., 2000. The metabolism of oxalic acid. *Turk. J. Zool.* 24, 103–106.
- Campbell, E.M., McIntosh, C.H., Bowman, A.S., 2016. A Toolbox for Quantitative Gene Expression in *Varroa destructor*: RNA Degradation in Field Samples and Systematic Analysis of Reference Gene Stability. *PLOS ONE* 11, e0155640. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155640>
- Cardinal, S., Danforth, B.N., 2011. The Antiquity and Evolutionary History of Social Behavior in Bees. *PLoS ONE* 6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021086>
- Ceballos, G., Ehrlich, P.R., 2010. The Sixth Extinction Crisis Loss of Animal Populations and Species 8, 1821–1831.
- Céline, R., 2018. Médicaments avec l'indication varroose : connaître la réglementation. *Dépêche Vét.*

- Cervo, R., Bruschini, C., Cappa, F., Meconcelli, S., Pieraccini, G., Pradella, D., Turillazzi, S., 2014. High Varroa mite abundance influences chemical profiles of worker bees and mite–host preferences. *J. Exp. Biol.* 217, 2998–3001. <https://doi.org/10.1242/jeb.099978>
- Charrière, J.-D., Imdorf, A., Bachofen, B., Tschan, A., 2003. The removal of capped drone brood: an effective means of reducing the infestation of varroa in honey bee colonies. *Bee World* 84, 117–124. <https://doi.org/10.1080/0005772X.2003.11099587>
- Chen, A.C., He, H., Davey, R.B., 2007. Mutations in a putative octopamine receptor gene in amitraz-resistant cattle ticks. *Vet. Parasitol.* 148, 379–383. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.06.026>
- Chevillon, C., Ducornez, S., de Meeûs, T., Koffi, B.B., Huguette Gaïa, Delathière, J.-M., Barré, N., 2007. Accumulation of acaricide resistance mechanisms in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) populations from New Caledonia Island. *Vet. Parasitol.* 147, 276–288. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.05.003>
- Cloyd, R.A., 2019. Effects of Pesticides and Adjuvants on the Honey Bee, *Apis mellifera*: An Updated Bibliographic Review. *Mod. Beekeep.* <https://doi.org/10.5772/intechopen.89082>
- Cochard, P., Laurie, M., Veyrand, B., Le Bizec, B., Poirot, B., Marchand, P., 2021. PAH7 concentration reflects anthropization: A study using environmental biomonitoring with honeybees. *Sci. Total Environ.* 751, 141831. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141831>
- Colin, M.E., Faucon, I.P., Heinrich, A., Ferry, R., Giauffret, A., 1983. Study on the first French focus of varroaosis of the bee. *Académie Vét. Fr.*
- Conte, Y.L., Ellis, M., Ritter, W., 2010. Varroa mites and honey bee health: can Varroa explain part of the colony losses? *Apidologie* 41, 353–363. <https://doi.org/10.1051/apido/2010017>
- Conte, Y.L., Navajas, M., 2008. Climate change: impact on honey bee populations and diseases 27, 499–510.
- Conte, Y.L., Vaublanc, G. de, Crauser, D., Jeanne, F., Rousselle, J.-C., Bécard, J.-M., 2007. Honey bee colonies that have survived Varroa destructor. *Apidologie* 38, 566–572. <https://doi.org/10.1051/apido:2007040>
- Corley, S.W., Jonsson, N.N., Piper, E.K., Cutullé, C., Stear, M.J., Seddon, J.M., 2013. Mutation in the *RmβAOR* gene is associated with amitraz resistance in the cattle tick *Rhipicephalus microplus*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 16772–16777. <https://doi.org/10.1073/pnas.1309072110>
- Crailsheim, K., 1992. The flow of jelly within a honeybee colony. *J. Comp. Physiol. B* 162, 681–689. <https://doi.org/10.1007/BF00301617>
- Crane, E., 1999. *The World History of Beekeeping and Honey Hunting*. Routledge.
- Crane, E., 1992. The world's beekeeping-past and present. *Hive Honey Bee Dadant Sons Hamilt.* 1–22.
- Crane, E.E., 2013. *The World History of Beekeeping and Honey Hunting*. Routledge.
- Dainat, B., Evans, J.D., Chen, Y.P., Gauthier, L., Neumann, P., 2012. Dead or Alive: Deformed Wing Virus and Varroa destructor Reduce the Life Span of Winter Honeybees. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 981–987. <https://doi.org/10.1128/AEM.06537-11>
- Dam, M.H.V., Trautwein, M., Spicer, G.S., Esposito, L., 2019. Advancing mite phylogenomics: Designing ultraconserved elements for Acari phylogeny. *Mol. Ecol. Resour.* 19, 465–475. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12962>
- Davis, R., 1996. A review and Extension of Economic Pest Control Model Incorporating Multi-Pest Species and Insect Resistance (No. 164525), *Animal Health Economics, Animal Health Economics*. University of Queensland, School of Economics.
- Dechatre, H., Michel, L., Soubeyrand, S., Maisonnasse, A., Moreau, P., Poquet, Y., Pioz, M., Vidau, C., Basso, B., Mondet, F., Kretzschmar, A., 2021. To Treat or Not to Treat Bees? Handy VarLoad: A Predictive Model for Varroa destructor Load. *Pathogens* 10, 678. <https://doi.org/10.3390/pathogens10060678>
- Decourtye, A., 2018. *Les abeilles, des ouvrières agricoles à protéger*, Editions France Agricole. ed.
- DeGrandi-Hoffman, G., Ahumada, F., Curry, R., Probasco, G., Schantz, L., 2014. Population growth of Varroa destructor (Acari: Varroidae) in commercial honey bee colonies treated with beta plant acids. *Exp. Appl. Acarol.* 64, 171–186. <https://doi.org/10.1007/s10493-014-9821-z>

- DeGrandi-Hoffman, G., Ahumada, F., Probasco, G., Schantz, L., 2012. The effects of beta acids from hops (*Humulus lupulus*) on mortality of *Varroa destructor* (Acari: Varroidae). *Exp. Appl. Acarol.* 58, 407–421. <https://doi.org/10.1007/s10493-012-9593-2>
- DeGrandi-Hoffman, G., Chen, Y., 2015. Nutrition, immunity and viral infections in honey bees. *Curr. Opin. Insect Sci., Social Insects * Vectors and Medical and Veterinary Entomology* 10, 170–176. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2015.05.007>
- Del Piccolo, F., Nazzi, F., Vedova, G.D., Milani, N., 2010. Selection of *Apis mellifera* workers by the parasitic mite *Varroa destructor* using host cuticular hydrocarbons - ProQuest. *Parasitology* 137, 967–973. <https://doi.org/10.1017/S0031182009991867>
- Delamarche, G., 2018. L'intérêt économique pour les exploitations apicoles de l'élimination du couvain de mâles comme lutte complémentaire contre le varroa. *La Santé Abeille* n°284.
- Delaplane, K., Berry, J., Skinner, J., PARKMAN, J., HOOD, W., 2005. Integrated pest management against *Varroa destructor* reduces colony mite levels and delays treatment threshold. *J. Apic. Res.* 44. <https://doi.org/10.1080/00218839.2005.11101171>
- Desai, S.D., Currie, R.W., 2016. Effects of Wintering Environment and Parasite–Pathogen Interactions on Honey Bee Colony Loss in North Temperate Regions. *PLOS ONE* 11, e0159615. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159615>
- Desquilbet, L., 2012. Guide pratique de validation statistique de méthodes de mesure : répétabilité, reproductibilité, et concordance.
- Di Prisco, G., Annoscia, D., Margiotta, M., Ferrara, R., Varricchio, P., Zanni, V., Caprio, E., Nazzi, F., Pennacchio, F., 2016. A mutualistic symbiosis between a parasitic mite and a pathogenic virus undermines honey bee immunity and health. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113, 3203–3208.
- Dietemann, V., Beaufort, A., Page, P., Yañez, O., Buawangpong, N., Chantawannakul, P., Neumann, P., 2019. Population genetics of ectoparasitic mites *Varroa* spp. in Eastern and Western honey bees. *Parasitology* 1–11. <https://doi.org/10.1017/S003118201900091X>
- Dietemann, V., Nazzi, F., Martin, S.J., Anderson, D.L., Locke, B., Delaplane, K.S., Wauquiez, Q., Tannahill, C., Frey, E., Ziegelmann, B., Rosenkranz, P., Ellis, J.D., 2013. Standard methods for varroa research. *J. Apic. Res.* 52, 1–54. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.52.1.09>
- Dietemann, V., Pflugfelder, J., Anderson, D., Charrière, J.-D., Chejanovsky, N., Dainat, B., Miranda, J. de, Delaplane, K., Dillier, F.-X., Fuch, S., Gallmann, P., Gauthier, L., Imdorf, A., Koeniger, N., Kralj, J., Meikle, W., Pettis, J., Rosenkranz, P., Sammataro, D., Smith, D., Yañez, O., Neumann, P., 2012. *Varroa destructor*: research avenues towards sustainable control. *J. Apic. Res.* 51, 125–132. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.51.1.15>
- Dmitryjuk, M., Żółtowska, K., Frączek, R., Lipiński, Z., 2014. Esterases of *Varroa destructor* (Acari: Varroidae), parasitic mite of the honeybee. *Exp. Appl. Acarol.* 62, 499–510. <https://doi.org/10.1007/s10493-013-9754-y>
- Dolezal, A.G., Carrillo-Tripp, J., Judd, T.M., Allen Miller, W., Bonning, B.C., Toth, A.L., 2019. Interacting stressors matter: diet quality and virus infection in honeybee health. *R. Soc. Open Sci.* 6, 181803. <https://doi.org/10.1098/rsos.181803>
- Dong, K., Du, Y., Rinkevich, F., Nomura, Y., Xu, P., Wang, L., Silver, K., Zhorov, B.S., 2014. Molecular biology of insect sodium channels and pyrethroid resistance. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 50, 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2014.03.012>
- Donzé, G., Guerin, P.M., 1994. Behavioral attributes and parental care of *Varroa* mites parasitizing honeybee brood. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 34, 305–319. <https://doi.org/10.1007/BF00197001>
- Dooremalen, C. van, Gerritsen, L., Cornelissen, B., Steen, J.J.M. van der, Langevelde, F. van, Blacquière, T., 2012a. Winter Survival of Individual Honey Bees and Honey Bee Colonies Depends on Level of *Varroa destructor* Infestation. *PLOS ONE* 7, e36285. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036285>
- Ducornez, S., Barré, N., Miller, R.J., Garine-Wichatitsky, M. de, 2005. Diagnosis of amitraz resistance in *Boophilus microplus* in New Caledonia with the modified Larval Packet Test. *Vet. Parasitol.* 130, 285–292. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.04.018>

- Durant, J.L., 2019. Where have all the flowers gone? Honey bee declines and exclusions from floral resources. *J. Rural Stud.* 65, 161–171. <https://doi.org/10.1016/j.jrurstud.2018.10.007>
- Dutta, S., Godara, R., Katoch, R., Yadav, A., Katoch, M., Singh, N., 2017. Detection of amitraz and malathion resistance in field populations of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) in Jammu region of India. *Exp. Appl. Acarol.* 71.
- Dynes, T.L., De Roode, J.C., Lyons, J.I., Berry, J.A., Delaplane, K.S., Brosi, B.J., 2017. Fine scale population genetic structure of *Varroa destructor*, an ectoparasitic mite of the honey bee (*Apis mellifera*). *Apidologie* 48, 93–101. <https://doi.org/10.1007/s13592-016-0453-7>
- Ehler, L.E., 2006. Integrated pest management (IPM): definition, historical development and implementation, and the other IPM. *Pest Manag. Sci.* 62, 787–789. <https://doi.org/10.1002/ps.1247>
- Ellis, E.C., Goldewijk, K.K., Siebert, S., Lightman, D., Ramankutty, N., 2010. Anthropogenic transformation of the biomes, 1700 to 2000. *Glob. Ecol. Biogeogr.* 19, 589–606. <https://doi.org/10.1111/j.1466-8238.2010.00540.x>
- Ellis, J.D., Evans, J.D., Pettis, J., 2010. Colony losses, managed colony population decline, and Colony Collapse Disorder in the United States. *J. Apic. Res.* 49, 134–136. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.49.1.30>
- Elzen, P., Westervelt, D., 2004. A scientific note on reversion of fluvalinate resistance to a degree of susceptibility in *Varroa destructor*. *Apidologie* 35, 519–520. <https://doi.org/10.1051/apido:2004036>
- Elzen, P.J., Baxter, J.R., Spivak, M., Wilson, W.T., 2000. Control of *Varroa jacobsoni* Oud. resistant to fluvalinate and amitraz using coumaphos. *Apidologie* 31, 437–441. <https://doi.org/10.1051/apido:2000134>
- Elzen, P. J., Baxter, J.R., Spivak, M., Wilson, W.T., 1999a. Amitraz resistance in varroa: new discovery in North America. *Am. Bee J.* 139, 362–362.
- Elzen, Patti J., Eischen, F.A., Baxter, J.R., Elzen, G.W., Wilson, W.T., 1999b. Detection of resistance in US *Varroa jacobsoni* Oud. (Mesostigmata: Varroidae) to the acaricide fluvalinate. *Apidologie* 30, 13–17. <https://doi.org/10.1051/apido:19990102>
- Elzen, P.J., Eischen, F.A., Baxter, J.B., Pettis, J., Elzen, G.W., Wilson, W.T., 1998. Fluvalinate resistance in *Varroa jacobsoni* from several geographic locations. *Am. Bee J. USA.*
- Elzen, P.J., Westervelt, D., 2002. Detection of coumaphos resistance in *Varroa destructor* in Florida. *Am. Bee J.* 142, 291–292.
- Enan, E.E., 2005. Molecular response of *Drosophila melanogaster* tyramine receptor cascade to plant essential oils. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 35, 309–321. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2004.12.007>
- Engel, M.S., 1999. The taxonomy of recent and fossil honey bees (Hymenoptera: Apidae; Apis).
- Engel, M.S., 1998. Fossil honey bees and evolution in the genus *Apis* (Hymenoptera: Apidae). *Apidologie* 29, 265–281.
- Evans, J.D., Cook, S.C., 2018. Genetics and physiology of *Varroa* mites. *Curr. Opin. Insect Sci., Ecology*
- Parasites/Parasitoids/Biological control 26, 130–135. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2018.02.005>
- FAO, 2013. Code international de conduite pour la distribution et l'utilisation des pesticides. Directives pour la prévention et la gestion de la résistance aux pesticides.
- Farjamfar, M., Saboori, A., Gonzalez-Cabrera, J., Hernández Rodríguez, C.S., 2018. Genetic variability and pyrethroid susceptibility of the parasitic honey bee mite *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) in Iran. *Exp. Appl. Acarol.* 76. <https://doi.org/10.1007/s10493-018-0296-1>
- Faucon, J.-P., Chauzat, M.-P., 2008. Varroosis and others honey bee diseases : major causes for colony mortality in France.
- Faucon, J.P., Drajnudel, P., Fléché, C., 1995. Mise en évidence d'une diminution de l'efficacité de l'Apistan® utilisé contre la varroose de l'abeille (*Apis mellifera* L.). *Apidologie* 26, 291–295. <https://doi.org/10.1051/apido:19950403>

- ffrench-Constant, R.H., Bass, C., 2017. Does resistance really carry a fitness cost? *Curr. Opin. Insect Sci.*, Pests and resistance, *Behavioural ecology* 21, 39–46. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2017.04.011>
- Floris, I., Cabras, P., Garau, V.L., Minelli, E.V., Satta, A., Troullier, J., 2001. Persistence and Effectiveness of Pyrethroids in Plastic Strips Against *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) and Mite Resistance in a Mediterranean Area. *J. Econ. Entomol.* 94, 806–810. <https://doi.org/10.1603/0022-0493-94.4.806>
- Forfert, N., Natsopoulou, M.E., Frey, E., Rosenkranz, P., Paxton, R.J., Moritz, R.F.A., 2015. Parasites and Pathogens of the Honeybee (*Apis mellifera*) and Their Influence on Inter-Colonial Transmission. *PLOS ONE* 10, e0140337. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140337>
- Frey, E., Odemer, R., Blum, T., Rosenkranz, P., 2013. Activation and interruption of the reproduction of *Varroa destructor* is triggered by host signals (*Apis mellifera*). *J. Invertebr. Pathol.* 113, 56–62. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2013.01.007>
- Frey, E., Rosenkranz, P., 2014. Autumn Invasion Rates of *Varroa destructor* (Mesostigmata: Varroidae) Into Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Colonies and the Resulting Increase in Mite Populations. *J. Econ. Entomol.* 107, 508–515. <https://doi.org/10.1603/EC13381>
- Fries, I., Camazine, S., 2001. Implications of horizontal and vertical pathogen transmission for honey bee epidemiology. *Apidologie* 32, 199–214. <https://doi.org/10.1051/apido:2001122>
- Fries, I., Camazine, S., Sneyd, J., 1994. Population dynamics of *Varroa Jacobsoni*: a model and a review. *Bee World*.
- Fries, I., Hansen, H., Imdorf, A., Rosenkranz, P., 2003. Swarming in honey bees (*Apis mellifera*) and *Varroa destructor* population development in Sweden. *Apidologie* 34, 389–397. <https://doi.org/10.1051/apido:2003032>
- Fries, I., Imdorf, A., Rosenkranz, P., 2006. Survival of mite infested (*Varroa destructor*) honey bee (*Apis mellifera*) colonies in a Nordic climate. *Apidologie* 37, 564–570. <https://doi.org/10.1051/apido:2006031>
- Fries, I., Rosenkranz, P., 1996. Number of reproductive cycles of *Varroa jacobsoni* in honey-bee (*Apis mellifera*) colonies. *Exp. Appl. Acarol.* 20, 103–112. <https://doi.org/10.1007/BF00051156>
- Frontero, L., 2020. Rapport ADANA.
- Fuchs, S., 1992. Choice in *Varroa jacobsoni* Oud. between honey bee drone or workerbrood cells for reproduction. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 31, 429–435. <https://doi.org/10.1007/BF00170610>
- Fuchs, S., 1990. Preference for drone brood cells by *Varroa jacobsoni* Oud in colonies of *Apis mellifera carnica*. *Apidologie* 21, 193–199. <https://doi.org/10.1051/apido:19900304>
- Fuchs, S., Langenbach, K., 1989. Multiple infestation of *Apis mellifera* L. brood cells and reproduction in *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie* 20, 257–266.
- Gallai, N., Salles, J.-M., Settele, J., Vaissière, B.E., 2009. Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecol. Econ.* 68, 810–821. <https://doi.org/10.1016/j.ecolecon.2008.06.014>
- Gary, N.E., 1962. Chemical Mating Attractants in the Queen Honey Bee. *Science* 136, 773–774. <https://doi.org/10.1126/science.136.3518.773>
- Gempe, T., Hasselmann, M., Schiøtt, M., Hause, G., Otte, M., Beye, M., 2009. Sex Determination in Honeybees: Two Separate Mechanisms Induce and Maintain the Female Pathway. *PLOS Biol.* 7, e1000222. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000222>
- Genersch, E., 2010. Honey bee pathology: current threats to honey bees and beekeeping. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87, 87–97. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2573-8>
- Georgiou, G.P., 2012. Pest Resistance to Pesticides. Springer Science & Business Media.
- Gholamzadeh, M., Ghadamyari, M., Salehi, L., Hoseininaveh, V., 2012. Effects of amitraz, buprofezin and propargite on some fitness parameters of the parasitoid *Encarsia formosa* (Hym.: Aphelinidae), using life table and IOBC methods. *J Entomol Soc Iran* 31, 1–14.
- Gisder, S., Aumeier, P., Genersch, E., 2009. Deformed wing virus: replication and viral load in mites (*Varroa destructor*). *J. Gen. Virol.* 90, 463–467. <https://doi.org/10.1099/vir.0.005579-0>

- González-Cabrera, J., Bumann, H., Rodríguez-Vargas, S., Kennedy, P.J., Krieger, K., Altreuther, G., Hertel, A., Hertlein, G., Nauen, R., Williamson, M.S., 2018a. A single mutation is driving resistance to pyrethroids in European populations of the parasitic mite, *Varroa destructor*. *J. Pest Sci.* 91, 1137–1144. <https://doi.org/10.1007/s10340-018-0968-y>
- González-Cabrera, J., Davies, T.G.E., Field, L.M., Kennedy, P.J., Williamson, M.S., 2013. An Amino Acid Substitution (L925V) Associated with Resistance to Pyrethroids in *Varroa destructor*. *PLOS ONE* 8, e82941. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082941>
- González-Cabrera, J., Rodríguez-Vargas, S., Davies, T.G.E., Field, L.M., Schmehl, D., Ellis, J.D., Krieger, K., Williamson, M.S., 2016a. Novel Mutations in the Voltage-Gated Sodium Channel of Pyrethroid-Resistant *Varroa destructor* Populations from the Southeastern USA. *PLOS ONE* 11, e0155332. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155332>
- Goodrich, B.K., 2019. Do more bees imply higher fees? Honey bee colony strength as a determinant of almond pollination fees. *Food Policy* 83, 150–160. <https://doi.org/10.1016/j.foodpol.2018.12.008>
- Goulson, D., Nicholls, E., Botías, C., Rotheray, E.L., 2015. Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science* 347, 1255957. <https://doi.org/10.1126/science.1255957>
- Grab, H., Branstetter, M.G., Amon, N., Urban-Mead, K.R., Park, M.G., Gibbs, J., Blitzer, E.J., Poveda, K., Loeb, G., Danforth, B.N., 2019. Agriculturally dominated landscapes reduce bee phylogenetic diversity and pollination services. *Science* 363, 282–284. <https://doi.org/10.1126/science.aat6016>
- Gracia, M.J., Moreno, C., Ferrer, M., Sanz, A., Peribáñez, M.Á., Estrada, R., 2017. Field efficacy of acaricides against *Varroa destructor*. *PLOS ONE* 12, e0171633. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171633>
- Gracia-Salinas, M.J., Ferrer-Dufol, M., Latorre-Castro, E., Monero-Manera, C., Castillo-Hernández, J.A., Lucientes-Curd, J., Peribáñez-López, M.A., 2006. Detection of fluvalinate resistance in *Varroa destructor* in Spanish apiaries. *J. Apic. Res.* 45, 101–105. <https://doi.org/10.1080/00218839.2006.11101326>
- Greatti, M., Milani, N., Nazzi, F., 1992. Reinfestation of an acaricide-treated apiary by *Varroa jacobsoni* Oud. *Exp. Appl. Acarol.* 16, 279–286. <https://doi.org/10.1007/BF01218569>
- Gregorc, A., Alburaki, M., Sampson, B., Knight, P.R., Adamczyk, J., 2018. Toxicity of Selected Acaricides to Honey Bees (*Apis mellifera*) and *Varroa* (*Varroa destructor* Anderson and Trueman) and Their Use in Controlling *Varroa* within Honey Bee Colonies. *Insects* 9. <https://doi.org/10.3390/insects9020055>
- Guichard, M., Dietemann, V., Neuditschko, M., Dainat, B., 2020. Three Decades of Selecting Honey Bees that Survive Infestations by the Parasitic Mite *Varroa destructor*: Outcomes, Limitations and Strategy. <https://doi.org/10.20944/preprints202003.0044.v1>
- Hackett, S.C., Bonsall, M.B., 2019. Insect pest control, approximate dynamic programming, and the management of the evolution of resistance. *Ecol. Appl.* 29, e01851. <https://doi.org/10.1002/eap.1851>
- Hallmann, C.A., Sorg, M., Jongejans, E., Siepel, H., Hofland, N., Schwan, H., Stenmans, W., Müller, A., Sumser, H., Hörrén, T., Goulson, D., Kroon, H. de, 2017. More than 75 percent decline over 27 years in total flying insect biomass in protected areas. *PLOS ONE* 12, e0185809. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185809>
- Haubruge, E., Nguyen, B.K., Widart, J., Thomé, J.-P., Depauw, E., 2006. Le dépérissement de l'abeille domestique, *Apis mellifera* L., 1758 (Hymenoptera : Apidae) : faits et causes probables 19.
- He, X.J., Zhang, X.C., Jiang, W.J., Barron, A.B., Zhang, J.H., Zeng, Z.J., 2016. Starving honey bee (*Apis mellifera*) larvae signal pheromonally to worker bees. *Sci. Rep.* 6, 22359. <https://doi.org/10.1038/srep22359>
- Henry, M., Becher, M.A., Osborne, J.L., Kennedy, P.J., Aupinel, P., Bretagnolle, V., Brun, F., Grimm, V., Horn, J., Requier, F., 2017. Predictive systems models can help elucidate bee declines driven

- by multiple combined stressors. *Apidologie* 48, 328–339. <https://doi.org/10.1007/s13592-016-0476-0>
- Henry, M., Beguin, M., Requier, F., Rollin, O., Odoux, J.-F., Aupinel, P., Aptel, J., Tchamitchian, S., Decourtye, A., 2012. A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. *Science* 336, 348–350.
- Hernandez, J., Jourdan, P., Maisonnasse, A., 2014. Essais ADAP1 2014 autour d'Apivar : suivi de l'efficacité et comparaison avec Apistan.
- Hernández-Rodríguez, C.S., Marín, Ó., Calatayud, F., Mahiques, M.J., Mompó, A., Segura, I., Simó, E., González-Cabrera, J., 2021. Large-Scale Monitoring of Resistance to Coumaphos, Amitraz, and Pyrethroids in *Varroa destructor*. *Insects* 12, 27. <https://doi.org/10.3390/insects12010027>
- Higes, M., Meana, A., Bartolomé, C., Botías, C., Martín-Hernández, R., 2013. *Nosema ceranae* (Microsporidia), a controversial 21st century honey bee pathogen. *Environ. Microbiol. Rep.* 5, 17–29. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12024>
- Higginson, D.M., Morin, S., Nyboer, M.E., Biggs, R.W., Tabashnik, B.E., Carrière, Y., 2005. Evolutionary Trade-Offs of Insect Resistance to *Bacillus Thuringiensis* Crops: Fitness Cost Affecting Paternity. *Evolution* 59, 915–920. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2005.tb01765.x>
- Hillesheim, E., Ritter, W., Bassand, D., 1996. First data on resistance mechanisms of *Varroa jacobsoni* (OUD.) against tau-fluvalinate. *Exp. Appl. Acarol.* 20, 283–296. <https://doi.org/10.1007/BF00052878>
- Hoy, M.A., 1998. Myths, models and mitigation of resistance to pesticides. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 353, 1787–1795.
- Ifantidis, M.D., 1988. Some aspects of the process of *Varroa jacobsoni* mite entrance into honey bee (*Apis mellifera*) brood cells. *Apidologie* 19, 387–396.
- Ilias, A., Vontas, J., Tsagkarakou, A., 2014. Global distribution and origin of target site insecticide resistance mutations in *Tetranychus urticae*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 48, 17–28. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2014.02.006>
- IPBES, Scholes, R., Montanarella, L., Brainich, N., Barger, A., Brink, T., Cantele, M., Erasmus, B., Fisher, J., Gardner, T., et al, 2018. The Assessment report on Land degradation and Restoration. Summary for policymakers.
- Johnson, B.R., 2010. Division of labor in honeybees: form, function, and proximate mechanisms. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 64, 305–316. <https://doi.org/10.1007/s00265-009-0874-7>
- Johnson, R.M., Dahlgren, L., Siegfried, B.D., Ellis, M.D., 2013. Acaricide, Fungicide and Drug Interactions in Honey Bees (*Apis mellifera*). *PLOS ONE* 8, e54092. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054092>
- Johnson, R.M., Huang, Z.Y., Berenbaum, M.R., 2010. Role of detoxification in *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) tolerance of the miticide tau-fluvalinate. *Int. J. Acarol.* 36, 1–6. <https://doi.org/10.1080/01647950903468273>
- Johnson, R.M., Mao, W., Pollock, H.S., Niu, G., Schuler, M.A., Berenbaum, M.R., 2012. Ecologically Appropriate Xenobiotics Induce Cytochrome P450s in *Apis mellifera*. *PLOS ONE* 7, e31051. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031051>
- Johnson, R.M., Wen, Z., Schuler, M.A., Berenbaum, M.R., 2006. Mediation of Pyrethroid Insecticide Toxicity to Honey Bees (Hymenoptera: Apidae) by Cytochrome P450 Monooxygenases. *J. Econ. Entomol.* 99, 1046–1050. <https://doi.org/10.1093/jee/99.4.1046>
- Johnson, S.D., Steiner, K.E., 2000. Generalization versus specialization in plant pollination systems. *Trends Ecol. Evol.* 15, 140–143.
- Jonsson, N.N., Hope, M., 2007. Progress in the epidemiology and diagnosis of amitraz resistance in the cattle tick *Boophilus microplus*. *Vet. Parasitol.* 146, 193–198. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.03.006>
- Kamakura, M., 2011. Royalactin induces queen differentiation in honeybees. *Nature* 473, 478.
- Kamler, M., Nesvorna, M., Stara, J., Erban, T., Hubert, J., 2016. Comparison of tau-fluvalinate, acrinathrin, and amitraz effects on susceptible and resistant populations of *Varroa destructor* in a vial test. *Exp. Appl. Acarol.* 69, 1–9. <https://doi.org/10.1007/s10493-016-0023-8>

- Kanbar, G., Engels, W., 2003. Ultrastructure and bacterial infection of wounds in honey bee (*Apis mellifera*) pupae punctured by Varroa mites. *Parasitol. Res.* 90, 349–354. <https://doi.org/10.1007/s00436-003-0827-4>
- Kang, Y., Blanco, K., Davis, T., Wang, Y., DeGrandi-Hoffman, G., 2016. Disease dynamics of honeybees with Varroa destructor as parasite and virus vector. *Math. Biosci.* 275, 71–92. <https://doi.org/10.1016/j.mbs.2016.02.012>
- Kanga, L.H.B., Adamczyk, J., Marshall, K., Cox, R., 2010. Monitoring for Resistance to Organophosphorus and Pyrethroid Insecticides in Varroa Mite Populations. *J. Econ. Entomol.* 103, 1797–1802. <https://doi.org/10.1603/EC10064>
- Kather, R., Drijfhout, F.P., Shemilt, S., Martin, S.J., 2015. Evidence for Passive Chemical Camouflage in the Parasitic Mite Varroa destructor. *J. Chem. Ecol.* 41, 178–186. <https://doi.org/10.1007/s10886-015-0548-z>
- Khoury, D.S., Barron, A.B., Myerscough, M.R., 2013. Modelling Food and Population Dynamics in Honey Bee Colonies. *PLOS ONE* 8, e59084. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059084>
- Kirkland, B.H., Eisa, A., Keyhani, N.O., 2005. Oxalic Acid as a Fungal Acaracidal Virulence Factor. *J. Med. Entomol.* 42, 346–351. <https://doi.org/10.1093/jmedent/42.3.346>
- Klafke, G., Webster, A., Dall Agnol, B., Pradel, E., Silva, J., de La Canal, L.H., Becker, M., Osório, M.F., Mansson, M., Barreto, R., Scheffer, R., Souza, U.A., Corassini, V.B., dos Santos, J., Reck, J., Martins, J.R., 2017. Multiple resistance to acaricides in field populations of Rhipicephalus microplus from Rio Grande do Sul state, Southern Brazil. *Ticks Tick-Borne Dis.* 8, 73–80. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.09.019>
- Klein, A.-M., Vaissière, B.E., Cane, J.H., Steffan-Dewenter, I., Cunningham, S.A., Kremen, C., Tscharntke, T., 2007. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 274, 303–313. <https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3721>
- Kliot, A., Ghanim, M., 2012. Fitness costs associated with insecticide resistance. *Pest Manag. Sci.* 68, 1431–1437. <https://doi.org/10.1002/ps.3395>
- Kolmes, S.A., Dennehy, T.J., Frisicano, L., 1990. Behavioral aspects of dicofol resistance in the twospotted spider mite Tetranychus urticae. *Entomol. Exp. Appl.* 57, 259–269. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.1990.tb01438.x>
- Korta, E., Bakkali, A., Berrueta, L.A., Gallo, B., Vicente, F., Bogdanov, S., 2003. Determination of amitraz and other acaricide residues in beeswax. *Anal. Chim. Acta* 475, 97–103. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(02\)01221-7](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(02)01221-7)
- Kretzschmar, A., Maisonnasse, A., Dussaubat, C., Cousin, M., Vidau, C., 2016. Performances des colonies vues par les observatoires de ruchers. *Innov. Agron.* 53, 81–93. <https://doi.org/10.15454/1.5137716161972214E12>
- Kretzschmar, A., Seuillet, T., Frontero, L., Maisonnasse, A., 2019. ViVa, Vivre avec Varroa.
- Kuenen, L.P.S., Calderone, N.W., 1997. Transfers of Varroa mites from newly emerged bees: Preferences for age- and function-specific adult bees (Hymenoptera: Apidae). *J. Insect Behav.* 10, 213–228. <https://doi.org/10.1007/BF02765554>
- Kulhanek, K., Steinhauer, N., Wilkes, J., Wilson, M., Spivak, M., Sagili, R.R., Tarpy, D.R., McDermott, E., Garavito, A., Rennich, K., vanEngelsdorp, D., 2021. Survey-derived best management practices for backyard beekeepers improve colony health and reduce mortality. *PLOS ONE* 16, e0245490. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0245490>
- Kwon, D.H., Kang, T.-J., Kim, Y.H., Lee, S.H., 2015. Phenotypic- and Genotypic-Resistance Detection for Adaptive Resistance Management in Tetranychus urticae Koch. *PLOS ONE* 10, e0139934. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139934>
- Labrie, G., Gagnon, A.-É., Vanasse, A., Latraverse, A., Tremblay, G., 2020. Impacts of neonicotinoid seed treatments on soil-dwelling pest populations and agronomic parameters in corn and soybean in Quebec (Canada). *PLOS ONE* 15, e0229136. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0229136>
- Le Conte, Y., Arnold, G., 1987. Influence de l'âge des abeilles (*Apis mellifica* L.) et de la chaleur sur le comportement de Varroa jacobsoni Oud. *Apidologie* 18, 305–320.

- Le Conte, Y., Arnold, G., Desenfant, P., 1990. Influence of Brood Temperature and Hygrometry Variations on the Development of the Honey Bee Ectoparasite *Varroa jacobsoni* (Mesostigmata: Varroidae). *Environ. Entomol.* 19, 1780–1785. <https://doi.org/10.1093/ee/19.6.1780>
- Le Conte, Y., Meixner, M., Brandt, A., Carreck, N., Costa, C., Mondet, F., Ralph, B., 2020. Geographical Distribution and Selection of European Honey Bees Resistant to *Varroa destructor*. *Insects* 11, 873. <https://doi.org/10.3390/insects11120873>
- Ledoux, M.N., Winston, M.L., Higo, H., Keeling, C.I., Slessor, K.N., LeConte, Y., 2001. Queen and pheromonal factors influencing comb construction by simulated honey bee (*Apis mellifera* L.) swarms. *Insectes Sociaux* 48, 14–20. <https://doi.org/10.1007/PL00001738>
- Li, A.Y., Chen, A.C., Miller, R.J., Davey, R.B., George, J.E., 2007. Acaricide resistance and synergism between permethrin and amitraz against susceptible and resistant strains of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Pest Manag. Sci.* 63, 882–889. <https://doi.org/10.1002/ps.1417>
- Li, A.Y., Davey, R.B., Miller, R.J., George, J.E., 2005. Mode of Inheritance of Amitraz Resistance in a Brazilian Strain of the Southern Cattle Tick, *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae)*. *Exp. Appl. Acarol.* 37, 183. <https://doi.org/10.1007/s10493-005-3260-9>
- Li, A.Y., Davey, R.B., Miller, R.J., George, J.E., 2004. Detection and Characterization of Amitraz Resistance in the Southern Cattle Tick, *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *J. Med. Entomol.* 41, 193–200. <https://doi.org/10.1603/0022-2585-41.2.193>
- Li, A.Y., Davey, R.B., Miller, R.J., George, J.E., 2003. Resistance to Coumaphos and Diazinon in *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) and Evidence for the Involvement of an Oxidative Detoxification Mechanism. *J. Med. Entomol.* 40, 482–490. <https://doi.org/10.1603/0022-2585-40.4.482>
- Lipinski, Z., Szubstarski, J., Szubstarska, D., 2007. Detection of the high risk pyrethroid resistant *Varroa destructor* mites in apiaries of the Warmia-Mazury province in Poland. *Wiad. Parazytol.* 53.
- Liu, N., Zhu, F., Xu, Q., Pridgeon, W.J., Gao, X., 2006. Behavioral change, physiological modification, and metabolic detoxification: mechanisms of insecticide resistance. *Kun Chong Xue Bao Acta Entomol. Sin.* 49, 671–679.
- Locke, B., 2016. Natural *Varroa* mite-surviving *Apis mellifera* honeybee populations. *Apidologie* 47, 467–482. <https://doi.org/10.1007/s13592-015-0412-8>
- Locke, B., Forsgren, E., Fries, I., Miranda, J.R. de, 2012. Acaricide Treatment Affects Viral Dynamics in *Varroa destructor*-Infested Honey Bee Colonies via both Host Physiology and Mite Control. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 227–235. <https://doi.org/10.1128/AEM.06094-11>
- Locke, B., Fries, I., 2011. Characteristics of honey bee colonies (*Apis mellifera*) in Sweden surviving *Varroa destructor* infestation. *Apidologie* 42, 533–542. <https://doi.org/10.1007/s13592-011-0029-5>
- Lockwood, J.A., Sparks, T.C., Story, R.N., 1984. Evolution of Insect Resistance to Insecticides: A Reevaluation of the Roles of Physiology and Behavior. *Bull. Entomol. Soc. Am.* 30, 41–51. <https://doi.org/10.1093/besa/30.4.41>
- Lodesani, M., Crailsheim, K., Moritz, R.F.A., 2002. Effect of some characters on the population growth of mite *Varroa jacobsoni* in *Apis mellifera* L colonies and results of a bi-directional selection. *J. Appl. Entomol.* 126, 130–137. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0418.2002.00615.x>
- Loope, K.J., Baty, J.W., Lester, P.J., Wilson Rankin, E.E., 2019. Pathogen shifts in a honeybee predator following the arrival of the *Varroa* mite. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 286, 20182499. <https://doi.org/10.1098/rspb.2018.2499>
- Losey, J.E., Vaughan, M., 2006. The Economic Value of Ecological Services Provided by Insects. *BioScience* 56, 311–323. [https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2006\)56\[311:TEVOES\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2006)56[311:TEVOES]2.0.CO;2)
- Loucif-ayad, W., Aribi, N., Smagghe, G., Soltani, N., 2010. Comparative effectiveness of some acaricides used to control *Varroa destructor* (Mesostigmata: Varroidae) in Algeria : research article. *Afr. Entomol.* 18, 259–266.
- Lundin, O., Rundlöf, M., Jonsson, M., Bommarco, R., Williams, N.M., 2021. Integrated pest and pollinator management – expanding the concept. *Front. Ecol. Environ.* 19, 283–291. <https://doi.org/10.1002/fee.2325>

- Maciel, W.G., Lopes, W.D.Z., Cruz, B.C., Gomes, L.V.C., Teixeira, W.F.P., Buzzulini, C., Bichuette, M.A., Campos, G.P., Felippelli, G., Soares, V.E., de Oliveira, G.P., da Costa, A.J., 2015. Ten years later: Evaluation of the effectiveness of 12.5% amitraz against a field population of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* using field studies, artificial infestation (Stall tests) and adult immersion tests. *Vet. Parasitol.* 214, 233–241. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.10.024>
- Mackowiak, C., 2009. Le déclin de l'abeille domestique, *Apis mellifera* en France (other). UHP - Université Henri Poincaré.
- Magal, P., Webb, G.F., Wu, Y., 2019. An Environmental Model of Honey Bee Colony Collapse Due to Pesticide Contamination. *Bull. Math. Biol.* 81, 4908–4931. <https://doi.org/10.1007/s11538-019-00662-5>
- Maggi, M.D., Ruffinengo, S.R., Damiani, N., Sardella, N.H., Eguaras, M.J., 2009. First detection of *Varroa destructor* resistance to coumaphos in Argentina. *Exp. Appl. Acarol.* 47, 317–320. <https://doi.org/10.1007/s10493-008-9216-0>
- Maggi, M.D., Ruffinengo, S.R., Gende, L.B., Eguaras, M.J., Sardella, N.H., 2008. LC50 baseline levels of amitraz, coumaphos, fluvalinate and flumethrin in populations of *Varroa destructor* from Buenos Aires Province, Argentina. *J. Apic. Res.* 47, 292–295. <https://doi.org/10.1080/00218839.2008.11101477>
- Maggi, M.D., Ruffinengo, S.R., Mendoza, Y., Ojeda, P., Ramallo, G., Floris, I., Eguaras, M.J., 2011. Susceptibility of *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) to synthetic acaricides in Uruguay: *Varroa mites'* potential to develop acaricide resistance. *Parasitol. Res.* 108, 815–821. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-2122-5>
- Maggi, M.D., Ruffinengo, S.R., Negri, P., Eguaras, M.J., 2010a. Resistance phenomena to amitraz from populations of the ectoparasitic mite *Varroa destructor* of Argentina. *Parasitol. Res.* 107, 1189–1192. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-1986-8>
- Maisonnasse, A., 2010. Communication chimique et régulations sociales dans la colonie d'abeilles (*Apis mellifera* L.) (PhD Thesis). Université d'Avignon.
- Martin, C., Salvy, M., Provost, E., Bagnères, A.-G., Roux, M., Crauser, D., Clement, J.-L., Le Conte, Y., 2001. 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.* 31, 365–379. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(00\)00130-2](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(00)00130-2)
- Martin, S., 1998. A population model for the ectoparasitic mite *Varroa jacobsoni* in honey bee (*Apis mellifera*) colonies. *Ecol. Model.* 109, 267–281. [https://doi.org/10.1016/S0304-3800\(98\)00059-3](https://doi.org/10.1016/S0304-3800(98)00059-3)
- Martin, S.J., 2004. Acaricide (pyrethroid) resistance in *Varroa destructor*. *Bee World* 85, 67–69. <https://doi.org/10.1080/0005772X.2004.11099632>
- Martin, S.J., 2001. The role of *Varroa* and viral pathogens in the collapse of honeybee colonies: a modelling approach. *J. Appl. Ecol.* 38, 1082–1093. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2664.2001.00662.x>
- Martin, S.J., 1994. Ontogenesis of the mite *Varroa jacobsoni* Oud. in worker brood of the honeybee *Apis mellifera* L. under natural conditions. *Exp. Appl. Acarol.* 18, 87–100. <https://doi.org/10.1007/BF00055033>
- Martin, S.J., Highfield, A.C., Brettell, L., Villalobos, E.M., Budge, G.E., Powell, M., Nikaido, S., Schroeder, D.C., 2012. Global Honey Bee Viral Landscape Altered by a Parasitic Mite. *Science* 336, 1304–1306. <https://doi.org/10.1126/science.1220941>
- Mathieu, L., Faucon, J.-P., 2000. Changes in the response time for *Varroa jacobsoni* exposed to amitraz. *J. Apic. Res.* 39, 155–158. <https://doi.org/10.1080/00218839.2000.11101036>
- Mattila, H.R., Seeley, T.D., 2007. Genetic Diversity in Honey Bee Colonies Enhances Productivity and Fitness. *Science* 317, 362–364. <https://doi.org/10.1126/science.1143046>
- McMenamin, A.J., Genersch, E., 2015. Honey bee colony losses and associated viruses. *Curr. Opin. Insect Sci., Ecology * Parasites/Parasitoids/Biological control* 8, 121–129. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2015.01.015>

- Melo-Santos, M.A.V., Varjal-Melo, J.J.M., Araújo, A.P., Gomes, T.C.S., Paiva, M.H.S., Regis, L.N., Furtado, A.F., Magalhaes, T., Macoris, M.L.G., Andrighetti, M.T.M., Ayres, C.F.J., 2010. Resistance to the organophosphate temephos: Mechanisms, evolution and reversion in an *Aedes aegypti* laboratory strain from Brazil. *Acta Trop.* 113, 180–189. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.10.015>
- Milaire, H.G., 1982. Résistance des organismes vivants aux substances chimiques. *Off. Pour Insectes Pour Leur Environ.*, 44 16, 3–6.
- Milani, N., 1995. The resistance of *Varroa jacobsoni* Oud to pyrethroids: a laboratory assay. *Apidologie* 26, 415–429. <https://doi.org/10.1051/apido:19950507>
- Milani, N., Vedova, G.D., 2002. Decline in the proportion of mites resistant to fluvalinate in a population of *Varroa destructor* not treated with pyrethroids. *Apidologie* 33, 417–422. <https://doi.org/10.1051/apido:2002028>
- Millán-Leiva, A., Marín, Ó., De la Rúa, P., Muñoz, I., Tsagkarakou, A., Eversol, H., Christmon, K., vanEngelsdorp, D., González-Cabrera, J., 2021. Mutations associated with pyrethroid resistance in the honey bee parasite *Varroa destructor* evolved as a series of parallel and sequential events. *J. Pest Sci.* <https://doi.org/10.1007/s10340-020-01321-8>
- Mitton, G.A., Quintana, S., Mendoza, Y., Eguaras, M., Maggi, M.D., Ruffinengo, S.R., 2021. L925V mutation in voltage-gated sodium channel of *Varroa destructor* populations from Argentina and Uruguay, with different degree of susceptibility to pyrethroids. *Int. J. Acarol.* 0, 1–7. <https://doi.org/10.1080/01647954.2021.1914158>
- Mitton, G.A., Szawarski, N., Ramos, F., Fuselli, S., Arcerito, F.R.M., Eguaras, M.J., Ruffinengo, S.R., Maggi, M.D., 2018. *Varroa destructor*: when reversion to coumaphos resistance does not happen. *J. Apic. Res.* 57, 536–540. <https://doi.org/10.1080/00218839.2018.1475038>
- Mondet, F., Maisonnasse, A., Kretzschmar, A., ALAUX, C., Vallon, J., Basso, B., DANGLEANT, A., Le Conte, Y., 2016a. *Varroa* : son impact, les méthodes d'évaluation de l'infestation et les moyens de lutte. *Innov. Agron.* 53, 63–80.
- Mondet, F., Miranda, J.R. de, Kretzschmar, A., Conte, Y.L., Mercer, A.R., 2014a. On the Front Line: Quantitative Virus Dynamics in Honeybee (*Apis mellifera* L.) Colonies along a New Expansion Front of the Parasite *Varroa destructor*. *PLOS Pathog.* 10, e1004323. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004323>
- Mondet, F., Parejo, M., Meixner, M.D., Costa, C., Kryger, P., Andonov, S., Servin, B., Basso, B., Bieńkowska, M., Bigio, G., Căuia, E., Cebotari, V., Dahle, B., Dražić, M.M., Hatjina, F., Kovačić, M., Kretavicius, J., Lima, A.S., Panasiuk, B., Pinto, M.A., Uzunov, A., Wilde, J., Büchler, R., 2020. Evaluation of Suppressed Mite Reproduction (SMR) Reveals Potential for *Varroa* Resistance in European Honey Bees (*Apis mellifera* L.). *Insects* 11, 595. <https://doi.org/10.3390/insects11090595>
- Monteiro, H.R., Lemos, M.F.L., Novais, S.C., Soares, A.M.V.M., Pestana, J.L.T., 2019. Amitraz toxicity to the midge *Chironomus riparius*: Life-history and biochemical responses. *Chemosphere* 221, 324–332. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.01.018>
- Moro, A., Blacquièrre, T., Panziera, D., Dietemann, V., Neumann, P., 2021. Host-Parasite Co-Evolution in Real-Time: Changes in Honey Bee Resistance Mechanisms and Mite Reproductive Strategies. *Insects* 12, 120. <https://doi.org/10.3390/insects12020120>
- Morse, R.A., Calderone, N.W., 2000. The value of honey bees as pollinators of US crops in 2000. *Bee Cult.* 128, 1–15.
- Morse, R.A., Strang, G.E., Nowakowski, J., 1967. Fall Death Rates of Drone Honey Bees. *J. Econ. Entomol.* 60, 1198–1202. <https://doi.org/10.1093/jee/60.5.1198>
- Mozes-Koch, R., Slabezki, Y., Efrat, H., Kalev, H., Kamer, Y., Yakobson, B.A., Dag, A., 2000. First detection in Israel of fluvalinate resistance in the varroa mite using bioassay and biochemical methods. *Exp. Appl. Acarol.* 24, 35–43. <https://doi.org/10.1023/A:1006379114942>
- Nanetti, A., 1999. Oxalic acid for mite control—results and review. FAIR CT97-3686 9.

- Nanetti, A., Bartolomei, P., Bellato, S., De Salvio, M., Gattavecchia, E., Ghini, S., 2003. Pharmacodynamics of oxalic acid in the honey bee colony, in: 38th Apimondia International Congress, Apimondia, Ljubljana (Slovenia).
- Nazzi, F., Le Conte, Y., 2016. Ecology of *Varroa destructor*, the Major Ectoparasite of the Western Honey Bee, *Apis mellifera*. *Annu. Rev. Entomol.* 61, 417–432. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-010715-023731>
- Nel, A., Martinez-Delclòs, X., Arillo, A., Peñalver, E., 1999. A review of the Eurasian fossil species of the bee *Apis*. *Palaeontology* 42, 243–285.
- Neumann, Carreck, P., Norman L., 2010. Honey bee colony losses. *J. Apic. Res.* 49, 1–6.
- Neyrou, J., 2021. Lutte contre *Varroa* : Etat des lieux et évolution de vos pratiques.
- Nicholls, P., 1975. Formate as an inhibitor of cytochrome c oxidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 67, 610–616.
- Nieto, A., ROBERTS, S., KEMP, J., RASMONT, P., KUHLMANN, M., GARCÍA, C.M., BIESMEIJER, J., BOGUSCHP, D.H., DE LA RÚA, P., DE MEULEMEESTER, T., 2014. European Red List of bees. Publication Office of the European Union, Luxembourg.
- Nkya, T.E., Akhouayri, I., Kisinza, W., David, J.-P., 2013. Impact of environment on mosquito response to pyrethroid insecticides: Facts, evidences and prospects. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 43, 407–416. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2012.10.006>
- Nolan, M.P., 2016. Impacts of inter-colony distance, mite host choice, and colony polyandry on the host/parasite relationship between *Apis mellifera* and *Varroa destructor*.
- Norain Sajid, Z., Aziz, M.A., Bodlah, I., Rana, R.M., Ghramh, H.A., Khan, K.A., 2019. Efficacy assessment of soft and hard acaricides against *Varroa destructor* mite infesting honey bee (*Apis mellifera*) colonies, through sugar roll method. *Saudi J. Biol. Sci.* <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.04.017>
- Oldroyd, B.P., 2012. Domestication of honey bees was associated with expansion of genetic diversity. *Mol. Ecol.* 21, 4409–4411. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05641.x>
- Oldroyd, B.P., 1999. Coevolution while you wait: *Varroa jacobsoni*, a new parasite of western honeybees. *Trends Ecol. Evol.* 14, 312–315. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(99\)001613-4](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(99)001613-4)
- OMS, 2018. Procédures pour tester la résistance aux insecticides chez les moustiques vecteurs du paludisme, Seconde édition. *Org. Mond. Santé* 55.
- O’Neal, S.T., Anderson, T.D., Wu-Smart, J.Y., 2018. Interactions between pesticides and pathogen susceptibility in honey bees. *Curr. Opin. Insect Sci., Ecology • Parasites/Parasitoids/Biological control* 26, 57–62. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2018.01.006>
- Onstad, D.W., 2013. *Insect Resistance Management: Biology, Economics, and Prediction*. Academic Press.
- Onstad, D.W., Spencer, J.L., Guse, C.A., Levine, E., Isard, S.A., 2001. Modeling evolution of behavioral resistance by an insect to crop rotation. *Entomol. Exp. Appl.* 100, 195–201. <https://doi.org/10.1046/j.1570-7458.2001.00864.x>
- Owen, R., 2017. Role of Human Action in the Spread of Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Pathogens. *J. Econ. Entomol.* 110, 797–801. <https://doi.org/10.1093/jee/tox075>
- Panini, M., Reguzzi, M.C., Chiesa, O., Cominelli, F., Lupi, D., Mazzoni, E., 2019. Pyrethroid resistance in Italian populations of the mite *Varroa destructor*: a focus on the Lombardy region 7.
- Parnas, M., Peters, M., Dadon, D., Lev, S., Vertkin, I., Slutsky, I., Minke, B., 2009. Carvacrol is a novel inhibitor of *Drosophila* TRPL and mammalian TRPM7 channels. *Cell Calcium* 45, 300–309. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2008.11.009>
- Pasquale, G.D., Salignon, M., Conte, Y.L., Belzunces, L.P., Decourtye, A., Kretzschmar, A., Suchail, S., Brunet, J.-L., Alaux, C., 2013. Influence of Pollen Nutrition on Honey Bee Health: Do Pollen Quality and Diversity Matter? *PLOS ONE* 8, e72016. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072016>
- Peck, D.T., Seeley, T.D., 2019. 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* 14, e0218392. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218392>

- Peck, D.T., Smith, M.L., Seeley, T.D., 2016. Varroa destructor Mites Can Nimbly Climb from Flowers onto Foraging Honey Bees. PLOS ONE 11, e0167798. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167798>
- Penman, D.R., Chapman, R.B., Bowie, M.H., 1988. Selection for Behavioral Resistance in Twospotted Spider Mite (Acari: Tetranychidae) to Flucythrinate. J. Econ. Entomol. 81, 40–44. <https://doi.org/10.1093/jee/81.1.40>
- Peterson, G., Rapaka, S., Koski, N., Kearney, M., Ortblad, K., Tadlock, L., 2017. A robust sebum, oil, and particulate pollution model for assessing cleansing efficacy of human skin. Int. J. Cosmet. Sci. 39, 351–354.
- Pettis, J.S., 2004. A scientific note on *Varroa destructor* resistance to coumaphos in the United States. Apidologie 35, 91–92. <https://doi.org/10.1051/apido:2003060>
- Pfeiffer, K.J., Crailsheim, K., 1998. Drifting of honeybees. Insectes Sociaux 45, 151–167. <https://doi.org/10.1007/s000400050076>
- Plapp, F.W., Vinson, S.B., 1977. Comparative Toxicities of Some Insecticides to the Tobacco Budworm 1 and Its Ichneumonid Parasite, *Campoletis sonorensis* 23. Environ. Entomol. 6, 381–384. <https://doi.org/10.1093/ee/6.3.381>
- Pohorecka, K., Bober, A., Skubida, M., Zdanska, D., 2011. Epizootic status of apiaries with massive losses of bee colonies (2008-2009). J Apic Sci 55, 137–150.
- Posada-Florez, F., Sonenshine, D.E., Egekwu, N.I., Rice, C., Lupitskyy, R., Cook, S.C., 2019. Insights into the metabolism and behaviour of Varroa destructor mites from analysis of their waste excretions. Parasitology 146, 527–532. <https://doi.org/10.1017/S0031182018001762>
- Potts, S.G., Imperatriz-Fonseca, V., Ngo, H.T., Biesmijer, J.C., Breeze, T.D., Dicks, L.V., Garibaldi, L.A., Hill, R., Settele, J., Vanbergen, A.J., 2016. Rapport d'évaluation sur les pollinisateurs, la pollinisation et la production alimentaire. Résumé à l'intention des décideurs.
- Potts, S.G., Roberts, S.P.M., Dean, R., Marris, G., Brown, M.A., Jones, R., Neumann, P., Settele, J., 2010. Declines of managed honey bees and beekeepers in Europe. J. Apic. Res. 49, 15–22. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.49.1.02>
- Prasad, R., Shivay, Y.S., 2017. Oxalic Acid/Oxalates in Plants: From Self-Defence to Phytoremediation. Curr. Sci. 112, 1665. <https://doi.org/10.18520/cs/v112/i08/1665-1667>
- Priestley, C.M., Williamson, E.M., Wafford, K.A., Sattelle, D.B., 2003. Thymol, a constituent of thyme essential oil, is a positive allosteric modulator of human GABAA receptors and a homo-oligomeric GABA receptor from *Drosophila melanogaster*. Br. J. Pharmacol. 140, 1363–1372. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705542>
- Prisco, G.D., Zhang, X., Pennacchio, F., Caprio, E., Li, J., Evans, J.D., DeGrandi-Hoffman, G., Hamilton, M., Chen, Y.P., 2011. Dynamics of Persistent and Acute Deformed Wing Virus Infections in Honey Bees, *Apis mellifera*. Viruses 3, 2425–2441. <https://doi.org/10.3390/v3122425>
- Rademacher, E., Harz, M., 2006a. Oxalic acid for the control of varroosis in honey bee colonies – a review. Apidologie 37, 98–120. <https://doi.org/10.1051/apido:2005063>
- Rademacher, E., Harz, M., Schneider, S., 2017. Effects of oxalic acid on *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). Insects 8, 84.
- Ramsey, S., Gulbranson, C.J., Mowery, J., Ochoa, R., vanEngelsdorp, D., Baughan, G., 2018. A Multi-Microscopy Approach to Discover the Feeding Site and Host Tissue Consumed by Varroa destructor on Host Honey Bees. Microsc. Microanal. 24, 1258–1259. <https://doi.org/10.1017/S1431927618006773>
- Ramsey, S.D., Ochoa, R., Baughan, G., Gulbranson, C., Mowery, J.D., Cohen, A., Lim, D., Joklik, J., Cicero, J.M., Ellis, J.D., Hawthorne, D., vanEngelsdorp, D., 2019. Varroa destructor feeds primarily on honey bee fat body tissue and not hemolymph. Proc. Natl. Acad. Sci. 116, 1792–1801. <https://doi.org/10.1073/pnas.1818371116>
- Ransome, H.M., 2004. The Sacred Bee in Ancient Times and Folklore. Courier Corporation.
- Ranson, H., N'Guessan, R., Lines, J., Moiroux, N., Nkuni, Z., Corbel, V., 2011. Pyrethroid resistance in African anopheline mosquitoes: what are the implications for malaria control? Trends Parasitol. 27, 91–98. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2010.08.004>

- Rath, W., 1999. Co-adaptation of *Apis cerana* Fabr. and *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie* 30, 97–110. <https://doi.org/10.1051/apido:19990202>
- Remnant, E.J., Mather, N., Gillard, T.L., Yagound, B., Beekman, M., 2019. Direct transmission by injection affects competition among RNA viruses in honeybees. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 286, 20182452. <https://doi.org/10.1098/rspb.2018.2452>
- Richards, K.W., Kevan, P.G., 2002. ASPECTS OF BEE BIODIVERSITY, CROP POLLINATION, AND CONSERVATION IN CANADA 20.
- Rinkevich, F.D., 2020. Detection of amitraz resistance and reduced treatment efficacy in the Varroa Mite, *Varroa destructor*, within commercial beekeeping operations. *PLOS ONE* 15, e0227264. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227264>
- Ritter, W., Leclercq, E., Koch, W., 1984. Observations des populations d'abeilles et de varroa dans les colonies a differents niveaux d'infestation. *Apidologie* 15, 389–400.
- Riva, C., 2017. Application de la démarche de drug-design pour la conception de nouveaux médicaments vétérinaires contre le parasite *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) (PhD Thesis). Normandie.
- Roberts, J.M.K., Anderson, D.L., Tay, W.T., 2015. Multiple host shifts by the emerging honeybee parasite, *Varroa jacobsoni*. *Mol. Ecol.* 24, 2379–2391.
- Rodríguez-Dehaibes, S.R., Otero-Colina, G., Sedas, V.P., Jiménez, J.A.V., 2005. Resistance to amitraz and flumethrin in *Varroa destructor* populations from Veracruz, Mexico. *J. Apic. Res.* 44, 124–125. <https://doi.org/10.1080/00218839.2005.11101162>
- Rodriguez-Vivas, R.I., Jonsson, N.N., Bhushan, C., 2018. Strategies for the control of *Rhipicephalus microplus* ticks in a world of conventional acaricide and macrocyclic lactone resistance. *Parasitol. Res.* 117, 3–29. <https://doi.org/10.1007/s00436-017-5677-6>
- Rollin, O., 2018. Chapitre 2: Les abeilles au pluriel, in: *Les Abeilles Des Ouvrières Agricoles à Protéger*.
- Rollin, O., Bretagnolle, V., Fortel, L., Guilbaud, L., Henry, M., 2015. Habitat, spatial and temporal drivers of diversity patterns in a wild bee assemblage. *Biodivers. Conserv.* 24, 1195–1214. <https://doi.org/10.1007/s10531-014-0852-x>
- Rosenkranz, P., Aumeier, P., Ziegelmann, B., 2010. Biology and control of *Varroa destructor*. *J. Invertebr. Pathol.* 103, S96–S119. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.07.016>
- Rosenkranz, P., Garrido, C., 2004. Volatiles of the honey bee larva initiate oogenesis in the parasitic mite *Varroa destructor*. *CHEMOECOLOGY* 14, 193–197. <https://doi.org/10.1007/s00049-004-0278-0>
- Roth, M.A., Wilson, J.M., Tignor, K.R., Gross, A.D., 2020. Biology and Management of *Varroa destructor* (Mesostigmata: Varroidae) in *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) Colonies. *J. Integr. Pest Manag.* 11. <https://doi.org/10.1093/jipm/pmz036>
- Roush, R., Tabashnik, B.E., 2012. *Pesticide Resistance in Arthropods*. Springer Science & Business Media.
- Roush, R.T., 1989. Designing resistance management programs: How can you choose? *Pestic. Sci.* 26, 423–441. <https://doi.org/10.1002/ps.2780260409>
- Roush, R.T., McKenzie, J.A., 1987a. Ecological Genetics of Insecticide and Acaricide Resistance. *Ann Rev Entomol* 32, 22.
- Ruaux, N., 2013. Les résistances aux insecticides, antiparasitaires, antibiotiques...
- Rundlöf, M., Andersson, G.K.S., Bommarco, R., Fries, I., Hederström, V., Herbertsson, L., Jonsson, O., Klatt, B.K., Pedersen, T.R., Yourstone, J., Smith, H.G., 2015. Seed coating with a neonicotinoid insecticide negatively affects wild bees. *Nature* 521, 77–80. <https://doi.org/10.1038/nature14420>
- Russell, S., Barron, A.B., Harris, D., 2013. Dynamic modelling of honey bee (*Apis mellifera*) colony growth and failure. *Ecol. Model.* 265, 158–169. <https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2013.06.005>
- Ryabov, E.V., Childers, A.K., Chen, Y., Madella, S., Nessa, A., vanEngelsdorp, D., Evans, J.D., 2017. Recent spread of *Varroa destructor* virus-1, a honey bee pathogen, in the United States. *Sci. Rep.* 7, 17447. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17802-3>

- Sáez, A., Aizen, M.A., Medici, S., Viel, M., Villalobos, E., Negri, P., 2020. Bees increase crop yield in an alleged pollinator-independent almond variety. *Sci. Rep.* 10, 3177. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59995-0>
- Sammataro, D., Untalan, P., Guerrero, F., Finley, J., 2005. The resistance of varroa mites (Acari: Varroidae) to acaricides and the presence of esterase. *Int. J. Acarol.* 31, 67–74. <https://doi.org/10.1080/01647950508684419>
- Sanchez-Bayo, F., Goka, K., 2014. Pesticide Residues and Bees – A Risk Assessment. *PLoS ONE* 9, e94482. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094482>
- Sánchez-Bayo, F., Wyckhuys, K.A.G., 2019. Worldwide decline of the entomofauna: A review of its drivers. *Biol. Conserv.* 232, 8–27. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2019.01.020>
- Santiago, G.P., Otero-Colina, G., Sánchez, D.M., Guzmán, M.E.R., Vandame, R., 2000. Comparing Effects of Three Acaricides on *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) and *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) Using Two Application Techniques. *Fla. Entomol.* 83, 468–476. <https://doi.org/10.2307/3496722>
- Santos, C.F. dos, Otesbelgue, A., Blochtein, B., 2018. The dilemma of agricultural pollination in Brazil: Beekeeping growth and insecticide use. *PLOS ONE* 13, e0200286. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200286>
- Seeley, T.D., 2007. Honey bees of the Arnot Forest: a population of feral colonies persisting with *Varroa destructor* in the northeastern United States. *Apidologie* 38, 19–29. <https://doi.org/10.1051/apido:2006055>
- Shen, M., Yang, X., Cox-Foster, D., Cui, L., 2005. The role of varroa mites in infections of Kashmir bee virus (KBV) and deformed wing virus (DWV) in honey bees. *Virology* 342, 141–149. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2005.07.012>
- Sial, A.A., Brunner, J.F., 2012. Selection for resistance, reversion towards susceptibility and synergism of chlorantraniliprole and spinetoram in obliquebanded leafroller, *Choristoneura rosaceana* (Lepidoptera: Tortricidae). *Pest Manag. Sci.* 68, 462–468. <https://doi.org/10.1002/ps.2294>
- Slessor, K.N., Winston, M.L., Le Conte, Y., 2005. Pheromone Communication in the Honeybee (*Apis mellifera* L.). *J. Chem. Ecol.* 31, 2731–2745. <https://doi.org/10.1007/s10886-005-7623-9>
- Snodgrass, R.E., 1956. *Anatomy of the Honey Bee*. Cornell University Press.
- Soderlund, D.M., Bloomquist, J.R., 1989. Neurotoxic Actions of Pyrethroid Insecticides. *Annu. Rev. Entomol.* 34, 77–96. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.34.010189.000453>
- Song, C., Scharf, M.E., 2008. Formic acid: A neurologically active, hydrolyzed metabolite of insecticidal formate esters. *Pestic. Biochem. Physiol.* 92, 77–82. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2008.06.005>
- Sparks, T.C., Nauen, R., 2015a. IRAC: Mode of action classification and insecticide resistance management. *Pestic. Biochem. Physiol., Insecticide and Acaricide Modes of Action and their Role in Resistance and its Management* 121, 122–128. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2014.11.014>
- Sponsler, D.B., Grozinger, C.M., Hitaj, C., Rundlöf, M., Botías, C., Code, A., Lonsdorf, E.V., Melathopoulos, A.P., Smith, D.J., Suryanarayanan, S., Thogmartin, W.E., Williams, N.M., Zhang, M., Douglas, M.R., 2019. Pesticides and pollinators: A socioecological synthesis. *Sci. Total Environ.* 662, 1012–1027. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.01.016>
- Spreafico, M., Eördegh, F.R., Bernardinelli, I., Colombo, M., 2001. First detection of strains of *Varroa destructor* resistant to coumaphos. Results of laboratory tests and field trials. *Apidologie* 32, 49–55. <https://doi.org/10.1051/apido:2001110>
- Stara, J., Pekar, S., Nesvorna, M., Erban, T., Vinsova, H., Kopecky, J., Dorskocil, I., Kamler, M., Hubert, J., 2019. Detection of tau-fluvalinate resistance in the mite *Varroa destructor* based on the comparison of vial test and PCR–RFLP of *kdr* mutation in sodium channel gene. *Exp. Appl. Acarol.* 77, 161–171. <https://doi.org/10.1007/s10493-019-00353-9>
- Sudo, M., Takahashi, D., Andow, D.A., Suzuki, Y., Yamanaka, T., 2018. Optimal management strategy of insecticide resistance under various insect life histories: Heterogeneous timing of selection and interpatch dispersal. *Evol. Appl.* 11, 271–283. <https://doi.org/10.1111/eva.12550>

- Sumpter, D.J., Martin, S.J., 2004. The dynamics of virus epidemics in Varroa-infested honey bee colonies. *J. Anim. Ecol.* 73, 51–63.
- Sungirai, M., Baron, S., Moyo, D.Z., De Clercq, P., Maritz-Olivier, C., Madder, M., 2018. Genotyping acaricide resistance profiles of Rhipicephalus microplus tick populations from communal land areas of Zimbabwe. *Ticks Tick-Borne Dis.* 9, 2–9. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2017.10.017>
- Switanek, M., Crailsheim, K., Truhetz, H., Brodschneider, R., 2017. Modelling seasonal effects of temperature and precipitation on honey bee winter mortality in a temperate climate. *Sci. Total Environ.* 579, 1581–1587. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.11.178>
- Tabashnik, B.E., 1989. Managing Resistance with Multiple Pesticide Tactics: Theory, Evidence, and Recommendations. *J. Econ. Entomol.* 82, 1263–1269. <https://doi.org/10.1093/jee/82.5.1263>
- Tabashnik, B.E., Croft, B.A., 1982. Managing Pesticide Resistance in Crop-Arthropod Complexes: Interactions Between Biological and Operational Factors 1. *Environ. Entomol.* 11, 1137–1144. <https://doi.org/10.1093/ee/11.6.1137>
- Tang, S., Chen, L., 2004. Modelling and analysis of integrated pest management strategy. *Discrete Contin. Dyn. Syst. - B* 4, 759. <https://doi.org/10.3934/dcdsb.2004.4.759>
- Tarpy, D.R., 2003. Genetic diversity within honeybee colonies prevents severe infections and promotes colony growth. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 270, 99–103. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2199>
- Tavoillot, P.-H., Tavoillot, F., 2015. L' Abeille (et le) Philosophe: Étonnant voyage dans la ruche des sages. Odile Jacob.
- Techer, M.A., Rane, R.V., Grau, M.L., Roberts, J.M.K., Sullivan, S.T., Liachko, I., Childers, A.K., Evans, J.D., Mikheyev, A.S., 2019. Divergent evolutionary trajectories following speciation in two ectoparasitic honey bee mites. *Commun. Biol.* 2, 1–16. <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0606-0>
- Tentcheva, D., Gauthier, L., Zappulla, N., Dainat, B., Cousserans, F., Colin, M.E., Bergoin, M., 2004. Prevalence and Seasonal Variations of Six Bee Viruses in Apis mellifera L. and Varroa destructor Mite Populations in France. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 7185–7191. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.12.7185-7191.2004>
- Thompson, H.M., Brown, M.A., Ball, R.F., Bew, M.H., 2002. First report of Varroa destructor resistance to pyrethroids in the UK. *Apidologie* 33, 357–366. <https://doi.org/10.1051/apido:2002027>
- Thompson, H.M., Wilkins, S., Battersby, A.H., Waite, R.J., Wilkinson, D., 2005. The Effects of Four Insect Growth-Regulating (IGR) Insecticides on Honeybee (Apis mellifera L.) Colony Development, Queen Rearing and Drone Sperm Production. *Ecotoxicology* 14, 757–769. <https://doi.org/10.1007/s10646-005-0024-6>
- Tong, F., Coats, J.R., 2010. Effects of monoterpenoid insecticides on [3H]-TBOB binding in house fly GABA receptor and 36Cl⁻ uptake in American cockroach ventral nerve cord. *Pestic. Biochem. Physiol.* 98, 317–324. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2010.07.003>
- Traynor, K., Mondet, F., Miranda, J. de, Techer, M., Kowallik, V., Oddie, M., Chantawannakul, P., McAfee, A., 2020. Varroa destructor: A Complex Parasite, Crippling Honeybees Worldwide. Preprints. <https://doi.org/10.20944/preprints202002.0374.v1>
- Traynor, K.S., Le Conte, Y., Page, R.E., 2015. Age matters: pheromone profiles of larvae differentially influence foraging behaviour in the honeybee, Apis mellifera. *Anim. Behav.* 99, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2014.10.009>
- Traynor, K.S., Le Conte, Y., Page, R.E., 2014. Queen and young larval pheromones impact nursing and reproductive physiology of honey bee (Apis mellifera) workers. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 68, 2059–2073. <https://doi.org/10.1007/s00265-014-1811-y>
- Traynor, K.S., Mondet, F., de Miranda, J.R., Techer, M., Kowallik, V., Oddie, M.A.Y., Chantawannakul, P., McAfee, A., 2020. Varroa destructor: A Complex Parasite, Crippling Honey Bees Worldwide. *Trends Parasitol.* 36, 592–606. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2020.04.004>
- Trhlin, M., Rajchard, J., 2011. Chemical communication in the honeybee (Apis mellifera L.): a review. *Veterinární Medicína* 56, 265–273. <https://doi.org/10.17221/1543-VETMED>

- Trouiller, J., 1998. Monitoring *Varroa jacobsoni* resistance to pyrethroids in western Europe. *Apidologie* 29, 537–546. <https://doi.org/10.1051/apido:19980606>
- Trouiller, J., Arnold, G., Chappe, B., Le Conte, Y., Masson, C., 1992. Semiochemical basis of infestation of honey bee brood by *Varroa jacobsoni*. *J. Chem. Ecol.* 18, 2041–2053.
- Ullah, A., Tlak Gajger, I., Majoros, A., Dar, S.A., Khan, S., Kalimullah, Haleem Shah, A., Nasir Khabir, M., Hussain, R., Khan, H.U., Hameed, M., Anjum, S.I., 2021. Viral impacts on honey bee populations: A review. *Saudi J. Biol. Sci.* 28, 523–530. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.10.037>
- Vallon, J., Savary, F., Jourdan, P., 2007. Suivi de l'efficacité des traitements contre *Varroa destructor* bénéficiant d'une AMM au cours de l'automne et de l'hiver 2006/2007. *Bull. Tech. Apic.* 2, 49–54.
- Van Leeuwen, T., Tirry, L., Yamamoto, A., Nauen, R., Dermauw, W., 2015. The economic importance of acaricides in the control of phytophagous mites and an update on recent acaricide mode of action research. *Pestic. Biochem. Physiol., Insecticide and Acaricide Modes of Action and their Role in Resistance and its Management* 121, 12–21. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2014.12.009>
- Van Leeuwen, T., Vontas, J., Tsagkarakou, A., Dermauw, W., Tirry, L., 2010. Acaricide resistance mechanisms in the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* and other important Acari: A review. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 40, 563–572. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2010.05.008>
- Vandame, J., 2018. Médicaments de lutte contre *Varroa destructor*, Tests d'efficacité 2017.
- Vandervalk, L.P., Nasr, M.E., Dosdall, L.M., 2014. New Miticides for Integrated Pest Management of *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) in Honey Bee Colonies on the Canadian Prairies. *J. Econ. Entomol.* 107, 2030–2036. <https://doi.org/10.1603/EC14048>
- vanEngelsdorp, D., Evans, J.D., Saegerman, C., Mullin, C., Haubruge, E., Nguyen, B.K., Frazier, M., Frazier, J., Cox-Foster, D., Chen, Y., Underwood, R., Tarpy, D.R., Pettis, J.S., 2009a. Colony Collapse Disorder: A Descriptive Study. *PLOS ONE* 4, e6481. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006481>
- Vanoosthuysse, F., Firlej, A., Ménard, E., Dieni, A., Charbonneau, A., Cormier, D., 2018. La résistance des insectes et acariens aux produits antiparasitaires pour les espèces agricoles présentes au Québec.
- Veatch, V., Moilanen, A., Minin, E.D., 2017. Threats from urban expansion, agricultural transformation and forest loss on global conservation priority areas. *PLOS ONE* 12, e0188397. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188397>
- Vereecken, N., 2017. Découvrir et Protéger nos abeilles sauvages. Glénat.
- Villa, J.D., Bustamante, D.M., Dunkley, J.P., Escobar, L.A., 2008. Changes in Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Colony Swarming and Survival Pre- and Postarrival of *Varroa destructor* (Mesostigmata: Varroidae) in Louisiana. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 101, 867–871. <https://doi.org/10.1093/aesa/101.5.867>
- Villar, G., Grozinger, C.M., 2017. Primer effects of the honeybee, *Apis mellifera*, queen pheromone 9-ODA on drones. *Anim. Behav.* 127, 271–279. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2017.03.023>
- von Frisch, K., 1967. The dance language and orientation of bees. Harv. Univ. Press.
- Wallberg, A., Han, F., Wellhagen, G., Dahle, B., Kawata, M., Haddad, N., Simoes, Z.L.P., Allsopp, M.H., Kandemir, I., De la Rua, P., Pirk, C.W., Webster, M., 2014. A worldwide survey of genome sequence variation provides insight into the evolutionary history of the honeybee *Apis mellifera*. *Nat. Genet.* 46, 1081–1088.
- Wang, R., Liu, Z., Dong, K., Elzen, P.J., Pettis, J., Huang, Z., 2002. Association of novel mutations in a sodium channel gene with fluvalinate resistance in the mite, *Varroa destructor*. *J. Apic. Res.* 41, 17–25. <https://doi.org/10.1080/00218839.2002.11101064>
- Wegener, J., Ruhnke, H., Scheller, K., Mispagel, S., Knollmann, U., Kamp, G., Bienefeld, K., 2016. Pathogenesis of varroosis at the level of the honey bee (*Apis mellifera*) colony. *J. Insect Physiol.* 91–92, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2016.06.004>

- Wendling, S., 2014. Reproductive features of *Varroa destructor*, agent of honeybee varroosis. Prospects for control. Faculté de Médecine de Créteil.
- Wilkinson, D., Smith, G., 2002. Modeling the Efficiency of Sampling and Trapping *Varroa destructor* in the Drone Brood of Honey bees (*Apis mellifera*). *Am. Bee J.* 142, 209–212.
- Williams, M., 2007. Temporal and Spatial Variations in *Varroa* Mite Levels, Influence of Apiary Density on Mite Fall Rate, Exploring New Methods to Measure Honey Bee Drifting for a Two-Concentric Circle Apiary Design.
- Williams, N.M., Crone, E.E., Roulston, T.H., Minckley, R.L., Packer, L., Potts, S.G., 2010. Ecological and life-history traits predict bee species responses to environmental disturbances. *Biol. Conserv., Conserving complexity: Global change and community-scale interactions* 143, 2280–2291. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2010.03.024>
- Winston, M.L., 1991. *The Biology of the Honey Bee*. Harvard University Press.
- Winston, M.L., Slessor, K.N., Willis, L.G., Naumann, K., Higo, H.A., Wyborn, M.H., Kaminski, L.A., 1989. The influence of queen mandibular pheromones on worker attraction to swarm clusters and inhibition of queen rearing in the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Insectes Sociaux* 36, 15–27. <https://doi.org/10.1007/BF02225877>
- Witherell, P.C., 1971. Duration of Flight and of Interflight Time of Drone Honey Bees, *Apis mellifera*. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 64, 609–612. <https://doi.org/10.1093/aesa/64.3.609>
- Wolfgang, W., 2018. Traitement anti-varroa par hyperthermie. ECODESIGN.
- Woodard, S.H., Fischman, B.J., Venkat, A., Hudson, M.E., Varala, K., Cameron, S.A., Clark, A.G., Robinson, G.E., 2011. Genes involved in convergent evolution of eusociality in bees. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 7472–7477.
- Woyke, J., 1955. Multiple mating of the honeybee queen (*Apis mellifica* L.) in one nuptial flight. *Bull Acad Pol. Sci Cl* 3, 175–180.
- Wu, J.Y., Anelli, C.M., Sheppard, W.S., 2011. Sub-Lethal Effects of Pesticide Residues in Brood Comb on Worker Honey Bee (*Apis mellifera*) Development and Longevity. *PLOS ONE* 6, e14720. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014720>
- Xu, D., He, Y., Zhang, Y., Xie, W., Wu, Q., Wang, S., 2018. Status of pesticide resistance and associated mutations in the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae*, in China. *Pestic. Biochem. Physiol.* 150, 89–96. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2018.07.008>
- Yang, X., Cox-Foster, D.L., 2005. Impact of an ectoparasite on the immunity and pathology of an invertebrate: Evidence for host immunosuppression and viral amplification. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 7470–7475. <https://doi.org/10.1073/pnas.0501860102>
- Yue, C., Genersch, E., 2005. RT-PCR analysis of Deformed wing virus in honeybees (*Apis mellifera*) and mites (*Varroa destructor*). *J. Gen. Virol.* 86, 3419–3424. <https://doi.org/10.1099/vir.0.81401-0>
- Zanni, V., Değirmenci, L., Annoscia, D., Scheiner, R., Nazzi, F., 2018. The reduced brood nursing by mite-infested honey bees depends on their accelerated behavioral maturation. *J. Insect Physiol.* 109, 47–54. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2018.06.006>
- Zee, R. van der, Gray, A., Pisa, L., Rijk, T. de, 2015. An Observational Study of Honey Bee Colony Winter Losses and Their Association with *Varroa destructor*, Neonicotinoids and Other Risk Factors. *PLOS ONE* 10, e0131611. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131611>
- Zulian, G., Maes, J., Paracchini, M.L., 2013. Linking Land Cover Data and Crop Yields for Mapping and Assessment of Pollination Services in Europe. *Land* 2, 472–492. <https://doi.org/10.3390/land2030472>

« Nous sommes les abeilles de l'Univers.

Nous butinons éperdument le miel du visible pour l'accumuler dans la grande ruche d'or de l'invisible »

Rainer Maria Rilke

Gabrielle ALMECIJA

Résistances de *Varroa destructor* aux acaricides et influence sur l'efficacité des traitements

Résumé

Le varroa (*Varroa destructor*) est un ectoparasite de l'abeille qui conduit à l'effondrement de la colonie en quelques années si l'infestation est trop élevée. Les apiculteurs disposent de plusieurs substances acaricides autorisées en France pour contrôler l'infestation. Le tau-fluvalinate était très utilisé dans les années 90 jusqu'à ce que le varroa développe une résistance diminuant significativement l'efficacité des traitements. La seconde substance acaricide la plus utilisée est l' amitraze. Un traitement annuel était suffisant pour maintenir une infestation faible. Mais depuis quelques années, des observations de baisse d'efficacité ont été observées par les apiculteurs et l'application d'un second traitement hivernal devient courant. Plusieurs paramètres peuvent influencer l'efficacité des traitements. Nous nous focaliserons sur l'étude des résistances de Varroa au tau-fluvalinate et à l' amitraze. Dans un premier temps, nous avons cherché à détecter la présence de varroas résistants aux acaricides en France.

Nous utiliserons un test de sensibilité phénotypique pour détecter la présence de varroas résistants dans une population. A partir de populations sensibles de référence, nous avons choisi la méthode de la concentration discriminante (CL90) pour établir la proportion de varroas résistants dans une population. Nous avons établi trois classes de sensibilité en fonction des résultats obtenus : sensible (Mortalité >76%), résistance modérée (Mortalité 75-41%) et résistance forte (Mortalité <40%). En France, sur 59 échantillons prélevés, 45% et 66% des populations sont modérément ou fortement résistantes respectivement au tau-fluvalinate et à l' amitraze.

Puis dans un second temps, à l'aide d'un modèle, nous avons analysé l'impact de différents paramètres, dont la présence de varroas résistants, sur l'efficacité du traitement Apivar®. Une population modérément résistante entraînera une perte d'efficacité de 5 à 10% alors qu'une population fortement résistante entraînera une efficacité inférieure à 78%. Des populations fortement résistantes observées sur le terrain sont venues confirmer ces résultats simulés par le modèle. Nous avons également mis en évidence que l'infestation initiale, la période de traitement et la formulation du traitement influençaient l'efficacité du traitement.

La gestion du varroa par les apiculteurs doit donc maintenant impliquer un contrôle des résistances de varroas aux acaricides. Pour cela, des stratégies de lutte proposées par l'Insect Resistance Management (IRM) pourraient permettre de limiter la dissémination de varroas résistants. Les laboratoires pharmaceutiques peuvent également participer à la diminution des résistances en développant des traitements de moins longue durée et optimisent la dose d'acaricide. Dans ce cadre, nous proposons de développer une Varroa Resistance Management (VRM) qui correspond aux différentes actions à mener pour contrôler les résistances en l'état actuel. En plus de la VRM, l'apiculteur doit également maintenir une infestation faible dans ses colonies pour assurer une efficacité suffisante du traitement. Le développement de résistances aux acaricides complexifie la gestion de l'infestation des colonies d'abeilles obligeant donc les apiculteurs à s'adapter et à développer de nouvelles stratégies de lutte.

Mots clés : Abeilles, Acarien, Apiculture, Contrôle, Amitraze, Tau-fluvalinate, Modèle mathématique

***Varroa destructor* resistance to acaricides and influence on the efficacy of treatments**

Abstract

Varroa destructor is a honeybee ectoparasite that leads to colony collapse within few years if the infestation is too high. Beekeepers have several acaricide substances authorized in France to control the infestation. Tau-fluvalinate was widely used in the 90s until varroa developed resistances significantly reducing the effectiveness of treatments. The second most used acaricide substance is amitraz. Annual treatment was sufficient to maintain low infestation. But in recent years, observations of decreased efficacy have been observed by beekeepers and the application of a second winter treatment is becoming common. Several parameters can influence the efficacy of treatments. We will focus on the study of Varroa resistance to tau-fluvalinate and amitraz.

First, we tried to detect the presence of varroas resistant to acaricides in France. A phenotypic sensitivity test was used to detect the presence of resistant mites in a population. Using sensitive reference populations, we selected the discriminant concentration method (LC90) to determine the proportion of resistant mites in a population. We established three sensitivity classes according to the results obtained: sensitive (Mortality > 76%), moderate resistance (Mortality 75-41%) and high resistance (Mortality < 40%). In France, out of 59 samples collected, 45% and 66% of populations are moderately or highly resistant to tau-fluvalinate and amitraz, respectively.

Then, using a model, we analyzed the impact of various parameters, including the presence of resistant varroa on the efficacy of Apivar treatment. A moderately resistant population will result in a loss of efficacy of 5-10% while a highly resistant population will result in an efficacy of less than 78%. Highly resistant populations observed in the field confirmed these simulated model results. We also found that initial infestation, treatment period and treatment formulation influenced the efficacy of treatment.

The management of varroa by beekeepers must now include resistance management. For this, control strategies proposed by the Insect Resistance Management (IRM) could limit the spread of resistant mites. Pharmaceutical laboratories may also contribute to the reduction of resistance by developing treatments that reduce their duration and optimize the dose of acaricide. In this context, we propose to develop a Varroa Resistance Management (VRM) that corresponds to the different actions to be carried out to control resistance in the current state. IN addition to VRM, the beekeeper must also maintain a low infestation in its colonies to ensure sufficient treatment efficacy. The development of resistance to mites complicates the management of honeybee colony infestation, requiring beekeepers to adapt and develop new control strategies.

Keywords: Honeybee, Mites, Beekeeping, Management, Amitraz, Tau-fluvalinate, Mathematic model