



**COMITE SCIENTIFIQUE
DE L'AGENCE FEDERALE POUR LA SECURITE
DE LA CHAINE ALIMENTAIRE**

AVIS 12-2012

Objet : Evaluation du risque que des bourdons d'élevage contaminés par des spores et/ou des cellules végétatives de la loque américaine (*Paenibacillus larvae*) provoquent une apparition clinique de cette maladie chez les abeilles domestiques (dossier SciCom 2011/16).

Avis approuvé par le Comité scientifique le 20 avril 2012.

Résumé

Le Comité scientifique a évalué le risque que des bourdons d'élevage contaminés par des spores et/ou des cellules végétatives de la loque américaine (*Paenibacillus larvae*) provoquent une apparition clinique de cette maladie chez les abeilles domestiques.

Le Comité scientifique conclut que ce risque est faible, étant donné qu'il n'a jamais été démontré jusqu'ici que les bourdons pouvaient être porteurs de cette maladie. De plus, la probabilité que les abeilles domestiques soient contaminées par la loque américaine via les bourdons d'élevage est beaucoup plus faible par rapport à la probabilité qu'elles le soient suite à un contact direct ou indirect avec d'autres abeilles, vu que la maladie est largement répandue. Les bonnes pratiques d'élevage de bourdons exigent néanmoins que toutes les mesures nécessaires soient prises afin de limiter au minimum le risque de contamination par des spores et/ou des cellules végétatives de la loque américaine (ex. : respect de règles de biosécurité).

Summary

Advice 12-2012 of the Scientific Committee of the FASFC on the assessment of the risk that reared bumblebees contaminated with spores and/or vegetative cells of American foulbrood (*Paenibacillus larvae*) induce a clinical outbreak of this disease in honeybees.

The Scientific Committee has assessed the risk that reared bumblebees contaminated with spores and/or vegetative cells of American foulbrood (*Paenibacillus larvae*) induce a clinical outbreak of this disease in honeybees.

The Scientific Committee concludes that this risk is low, since it has never been shown so far that bumblebees could be carriers of this disease. Moreover, the probability that honeybees become contaminated with American foulbrood by reared bumblebees is much lower compared to the probability that they become infected following a direct or indirect contact with other bees, as the disease is widespread. Good bumblebees rearing practices do require however that all necessary measures are taken to minimize the risk of contamination by spores and/or vegetative cells of American foulbrood (e.g. : compliance with biosecurity rules).

Mots clés

Bourdon – abeille – loque américaine – *Paenibacillus larvae* – évaluation du risque

1. Termes de référence

1.1. Objectif

Ce dossier a pour objectif d'évaluer le risque que des bourdons d'élevage contaminés par des spores et/ou des cellules végétatives de la loque américaine (*Paenibacillus larvae*) provoquent une apparition clinique de cette maladie chez les abeilles domestiques.

1.2. Contexte législatif

Arrêté royal du 25 avril 1988 désignant les maladies des animaux soumises à l'application du chapitre III de la loi du 24 mars 1987 relative à la santé des animaux.

Arrêté royal du 23 mai 2000 portant des dispositions particulières concernant l'acquisition, la détention d'un dépôt, la prescription, la fourniture et l'administration de médicaments destinés aux animaux par le médecin vétérinaire et concernant la détention et l'administration de médicaments destinés aux animaux par le responsable des animaux.

Arrêté royal du 14 novembre 2003 relatif à l'autocontrôle, à la notification obligatoire et à la traçabilité dans la chaîne alimentaire.

Arrêté royal du 14 décembre 2006 relatif aux médicaments à usage humain et vétérinaire.

Arrêté royal du 7 mars 2007 relatif à la lutte contre les maladies contagieuses des abeilles.

Arrêté ministériel du 31 août 1993 définissant les conditions de police sanitaire régissant les échanges et les importations d'animaux, de sperme, d'ovules et d'embryons non soumis en ce qui concerne les conditions de police sanitaire aux réglementations communautaires spécifiques visées à l'annexe II, A, de l'arrêté royal du 31 décembre 1992 relatif aux contrôles vétérinaires et zootechniques applicables aux échanges intracommunautaires de certains animaux vivants et produits.

Règlement (CE) n° 1430/94 de la Commission du 22 juin 1994 modifiant les annexes I, II, III et IV du règlement (CEE) n° 2377/90 du Conseil établissant une procédure communautaire pour la fixation des limites maximales de résidus de médicaments vétérinaires dans les aliments d'origine animale.

Directive 82/894/CEE du Conseil du 21 décembre 1982 concernant la notification des maladies des animaux dans la Communauté.

Directive 92/65/CEE du Conseil du 13 juillet 1992 définissant les conditions de police sanitaire régissant les échanges et les importations dans la Communauté d'animaux, de spermes, d'ovules et d'embryons non soumis, en ce qui concerne les conditions de police sanitaire, aux réglementations communautaires spécifiques visées à l'annexe A section I de la directive 90/425/CEE.

Vu les discussions durant les réunions de groupe de travail des 5 juillet 2011, 24 août 2011 et 11 octobre 2011, et les séances plénières des 14 octobre 2011 et 20 avril 2012,

le Comité scientifique émet l'avis suivant :

2. Introduction

Le présent dossier fait suite à la détection de spores de la loque américaine (*Paenibacillus larvae*) dans une entreprise produisant des bourdons dans le but de commercialiser ceux-ci comme insectes auxiliaires de pollinisation des cultures (ex. : tomates, aubergines et poivrons

sous serre). En effet, dans le cadre de son autocontrôle, cette entreprise prélève toutes les trois semaines des échantillons de couvain afin de détecter d'éventuels agents pathogènes. Une de ces analyses de laboratoire a révélé en mai 2011 la présence de spores de la loque américaine (LA) dans du couvain de l'espèce *Bombus terrestris*. Cependant, aucun signe clinique de la LA n'a été observé au sein de l'entreprise. De plus, des échantillonnages poussés et des analyses bactériologiques n'ont pas pu mettre en évidence une contamination par *P. larvae*. Il semblerait dès lors *a priori* qu'il s'agisse d'une contamination due au fait que les bourdons sont nourris avec du pollen pouvant être contaminé avec des spores de la LA. Suite à cette détection, l'entreprise en question a décidé de stériliser le pollen utilisé pour l'alimentation des bourdons à l'aide de rayons gamma. Les échantillons prélevés ultérieurement se sont tous révélés négatifs.

En ce qui concerne les résultats belges des analyses pour la détection de spores de la LA chez les abeilles domestiques et les bourdons d'élevage, le tableau 1 montre qu'il n'y a eu que 4 échantillons positifs (sur un total de 1.123 échantillons analysés, soit 0,36 %) en ce qui concerne les bourdons d'élevage en Belgique au cours de la période 2000-2011. Dans le même temps, 77 échantillons se sont révélés positifs (sur un total de 1.929 échantillons analysés, soit 3,99 %) en ce qui concerne les abeilles domestiques. Le nombre de foyers de LA s'établit à 22 depuis l'année 2004, allant de 0 à 7 foyers par an, et ces foyers ne concernent que les abeilles domestiques. Précisons également que la Belgique comptait en 2010 quelques 3.000 apiculteurs d'après l'AFSCA, mais environ 7.600, pour un total approximatif de 112.000 ruches, d'après les Régions.

Cependant, il est à noter que le prélèvement et l'analyse de ces échantillons avait pour objectif de certifier l'absence de spores de la LA au niveau d'un lot d'abeilles domestiques ou de bourdons d'élevage, et non pas de réaliser un monitoring visant à détecter la présence de la maladie sur le territoire belge. L'interprétation des résultats, d'un point de vue épidémiologique, est dès lors délicate.

Tableau 1 : Aperçu du nombre d'échantillons analysés pour la détection de spores de la loque américaine chez les abeilles domestiques et les bourdons d'élevage, du nombre de ces échantillons qui se sont révélés positifs et du nombre de foyers de loque américaine chez les abeilles en Belgique au cours de la période 2000-2011 (données extraites du LIMS du CODA-CERVA).

Année	Nombre d'échantillons analysés			Nombre d'échantillons positifs			Nombre de foyers
	Abeilles	Bourdons	Total	Abeilles	Bourdons	Total	Abeilles
2000	153	0	153	12 ^b	0 ^b	12 ^b	- ^a
2001	226	0	226	15 ^b	0 ^b	15 ^b	- ^a
2002	154	0	154	10 ^b	0 ^b	10 ^b	- ^a
2003	102	3	105	3	0	3	- ^a
2004	205	9	214	7	1	8	2
2005	148	7	155	7	0	7	7
2006	157	6	163	3	0	3	3
2007	171	9	180	7	0	7	5
2008	141	193	334	5	0	5	1
2009	219	233	452	8	0	8	4
2010	142	198	340	0	0	0	0
2011	111	465	576	0	3	3	0
Total	1.929	1.123	3.052	77	4	81	22

^a = donnée non disponible

^b = non confirmé par PCR, uniquement isolement et identification

La présente demande d'avis a dès lors pour objectif d'examiner dans quelle mesure ces bourdons d'élevage contaminés peuvent être utilisés dans des exploitations agricoles et

horticoles en Belgique et à l'étranger sans mettre en danger la santé des abeilles domestiques.

3. Biologie et rôle des bourdons

3.1. Biologie et habitats naturels

Alors que la pollinisation par les abeilles domestiques est bien connue et très souvent médiatisée, on connaît souvent mal l'importance pollinisatrice des bourdons.

Les bourdons sont pourtant les pollinisateurs les plus performants de nombreuses plantes telles que le trèfle rouge, la luzerne, et dans certaines régions, le cotonnier, les framboisiers, les pommiers ou les pruniers (Faegri & van der Pijl, 1979).

S'ils sont si performants, c'est parce qu'ils :

- ont la capacité de voler à des températures relativement basses ;
- possèdent une langue plus longue que celle des abeilles domestiques et peuvent donc polliniser des fleurs à corolle plus profonde ;
- sont très poilus et sont donc également capables de véhiculer une quantité plus importante de pollen.

Les bourdons vivent en colonies comptant jusqu'à 300 individus (incluant reine, ouvrières et mâles). Ce sont des insectes holométaboles, c'est-à-dire qu'ils passent successivement par 4 stades distincts durant leur développement (œuf, larve, nymphe et adulte).

Bien qu'ils vivent en colonies, les bourdons sont classés parmi les insectes eusociaux primitifs en raison de l'existence d'une période solitaire de la reine (Michener, 2007). Dans les zones tempérées du globe, ils possèdent en outre un cycle de vie annuel.

A la fin de l'été, une reine vierge est fécondée par un mâle (Alford, 1975). Celle-ci cherche alors une cavité pour sa diapause hivernale (= hibernation) qui dure de 6 à 9 mois, selon les températures printanières. Les membres des autres castes (anciennes reines, ouvrières, mâles) meurent avant l'hiver.

Au printemps, la reine émerge et part à la recherche d'un site pour y fonder son nid (souvent un ancien abri de micromammifère), et dès lors sa propre colonie (Alford, 1969). Elle se nourrit alors de nectar et de pollen nécessaires au développement de ses ovaires (Heinrich, 1979). Le site trouvé, elle pond et couve ses œufs tout en se nourrissant de nectar collecté et stocké dans un « pot à miel » préalablement confectionné à partir de cire.

Le nombre d'œufs pondus par cellule est variable selon l'espèce considérée. Ils évoluent vers le stade 'larves', puis vers le stade 'nymphe'. Celles-ci sont alors séparées dans des cocons individualisés. Enfin, le stade 'adultes' est atteint (Heinrich, 1979).

La reine utilise sa thermorégulation pour maintenir une température adéquate à la survie et au développement de sa descendance. Lorsque les premières ouvrières émergent des cocons, la reine ne fait plus que pondre et les ouvrières effectuent l'ensemble des autres tâches de la colonie (collecte de pollen et de nectar, etc.) indispensables au maintien de l'intégrité du nid.

Lorsque la reine n'a plus de spermatozoïde dans sa spermathèque, elle pond des œufs non fécondés qui donnent uniquement des mâles (parthénogenèse arrhénotoque).

Contrairement aux abeilles domestiques, pour lesquelles la production de reines est intimement liée à la production de « gelée royale », chez les bourdons c'est la sécrétion d'une phéromone contraceptive par la reine et la quantité de nourriture fournie par individu qui sont déterminantes.

En effet, au début de la colonie, une phéromone contraceptive libérée par la reine inhibe la ponte des ouvrières. Avec l'augmentation de la taille de la colonie, son effet s'avère plus diffus et les structures sexuelles des nouvelles venues sont susceptibles de se développer. A ce stade, les ouvrières sont nombreuses et le ratio nombre d'ouvrières/œufs est élevé. La nouvelle progéniture reçoit donc une quantité de nourriture abondante et suffisante à l'accroissement de leur taille et au développement de leurs structures reproductrices. De nouvelles reines fertiles sont donc produites. Elles quitteront finalement le nid et s'accoupleront avec des mâles avant de boucler le cycle.

3.2. Caractéristiques de l'élevage des bourdons

Ce fut un défi scientifique d'élever des bourdons dans un confinement total, indépendamment de leur cycle de vie saisonnier, tout en étant capable de produire au besoin des espèces expérimentales. Les progrès accomplis ont mené les entrepreneurs à élever des bourdons à des fins commerciales. Les coûts élevés du travail et le faible taux de réussite de l'élevage ont orienté le secteur privé vers les cultures à haute valeur ajoutée, par ex. celles pour la production de semences hybrides, surtout si elles nécessitaient une pollinisation à la main (Velthuis & van Doorn, 2006). Les affaires se sont développées de façon continue depuis qu'un vétérinaire belge a, en 1985, commencé l'élevage de bourdons pour des applications commerciales.

3.2.1. Choix des espèces

Différentes espèces de bourdons sont utilisées, tout en répondant à différents critères :

- (i) l'espèce doit avoir une large aire de répartition naturelle,
- (ii) l'espèce doit reproduire de grandes colonies,
- (iii) l'espèce est de préférence une pollinisatrice globale, capable de polliniser de manière vibratile, c'est-à-dire par sonication, (par ex. pour polliniser des tomates) et
- (iv) l'espèce doit avoir un taux de réussite élevé pour l'élevage en milieu confiné.

En même temps que le marché était en expansion, le nombre d'espèces élevées s'est accru, ce qui a permis d'offrir des espèces de bourdons indigènes pour la pollinisation dans différents continents (voir tableau 2). Le comportement de nourrissage des larves des bourdons est un critère important pour l'élevage. Les stockeurs de pollen (*pollen-storers*), un groupe de bourdons qui stockent le pollen dans des pots en cire, alimentent les larves de façon continue par régurgitation, et ils acceptent facilement le pollen distribué en captivité. Ceci contrairement aux '*pocket-makers*', qui déposent un stock de pollen au sommet de la cellule du couvain à partir duquel les larves s'alimentent.

Tableau 2 : (Sous-)Espèces de bourdons élevées commercialement pour la pollinisation (Velthuis & van Doorn, 2006).

Espèce	Origine	Utilisée en	N colonies en 2004	N ouvrières / colonie
Sous-genre <i>Bombus</i>				
<i>B. terrestris</i> L.	Europe, Afrique du Nord, Asie occidentale	Europe, Afrique du Nord, Asie, Asie australe, Amérique du Sud	900.000	200–400
<i>B. t. canariensis</i> Pérez	Iles Canaries	Iles Canaries	30.000	150–300
<i>B. lucorum</i> L.	Europe, Asie	Asie orientale	4.000	50–150
<i>B. ignitus</i> Smith	Asie orientale	Asie orientale	3.500	100–200
<i>B. occidentalis</i> Greene	Amérique du Nord occidentale	Amérique du Nord occidentale	1.000	200–400
Sous-genre <i>Pyrobombus</i>				
<i>B. impatiens</i> Cresson	Amérique du Nord orientale	Amérique du Nord	55.000	300–500

3.2.2. Hibernation

Le comportement naturel d'hibernation (cf. point 3.1.) peut être simulé en captivité, les reines fécondées sont autorisées à s'enterrer dans un tas de terre (ou un autre substrat) dans la cage de fécondation. Ces reines sont déterrées et conservées dans un conteneur individuel ou collectif à 1 à 5°C (à nouveau, on peut utiliser différents substrats comme de la terre, du papier humide, de la tourbe humide) (Velthuis & van Doorn, 2006). Si des milieux d'hibernation stérilisés sont utilisés, l'occurrence des infections fongiques diminue, ce qui se traduit par un meilleur taux de survie à l'hibernation (Macfarlane *et al.*, 1995).

3.2.3. Initiation de la colonie

L'hibernation peut être interrompue ou empêchée par un traitement au CO₂. Après avoir subi la narcose (= sommeil provoqué artificiellement), les jeunes reines entrent en activité et sont prêtes à fonder une colonie (Röseler, 1985; Velthuis & van Doorn, 2006). On augmente à la fois la température ambiante et l'intensité lumineuse. Une température de 28-30°C et une humidité relative de plus de 50 % doivent être maintenues. L'initiation de la colonie peut être accomplie en plaçant deux reines ensemble. Quoique l'agressivité qui en résulte entraîne souvent la mort de l'une des deux reines, ce qui nuit à l'efficacité de l'élevage. D'autres méthodes ajoutent des ouvrières de même espèce, des cocons ou même des abeilles ouvrières, mais la stimulation artificielle comme les cocons en plastique ont aussi prouvé leur succès (Jie *et al.*, 2005; Velthuis & van Doorn, 2006).

3.2.4. Fécondation

Pour obtenir des reines fécondées, des mâles et des reines d'âges adaptés sont placés dans des cages de fécondation de 40x40x60 cm ou un peu plus grandes. L'accouplement se produit essentiellement au cours des heures matinales, la lumière du soleil ou une forte illumination favorise le succès. La plupart des reines européennes ne s'accouplent qu'une seule fois, par contre des accouplements multiples ont été rapportés chez les espèces nord-américaines. D'autre part, les mâles peuvent copuler plusieurs fois (Velthuis & van Doorn, 2006).

3.2.5. Nourrissement

En tant que source d'énergie et de carbone, on utilise un sirop sucré, alors que du pollen butiné par des abeilles est distribué comme source d'azote. Un essai comparatif sur la qualité du pollen pour les bourdons a révélé que le succès de l'élevage est meilleur avec du pollen à forte teneur en protéines. La cause de la moindre réussite de l'élevage pourrait toutefois aussi être attribuée à une carence en composants tels qu'une vitamine ou un acide aminé essentiels (Velthuis & van Doorn, 2006).

4. La loque américaine

4.1. La maladie

La loque américaine (LA) est une maladie des larves de l'abeille (*Apis mellifera*), provoquée par la bactérie sporulante Gram positive *Paenibacillus larvae* (Genersch *et al.*, 2006), anciennement appelée *Bacillus larvae*. Le nom 'vuilbroed' (= 'loque', en néerlandais) fait référence aux symptômes cliniques de la LA en cas de forte contamination de la colonie, à savoir la transformation du couvain en une masse pourrie et sale ('vuilbroed' = littéralement : 'couvain sale'). Pour cette raison aussi, la maladie est parfois appelée 'Amerikaans broedrot' en néerlandais ('broedrot' = littéralement : 'couvain pourri'). Il existe aussi une maladie que l'on appelle la loque européenne, mais elle est quelque peu différente, que ce soit au niveau de l'agent infectieux (*Melissococcus plutonius*), de l'évolution de la maladie ou du tableau clinique. La LA se caractérise par des restes de larves qui sont brun clair, glaireux voire collants, ce qu'on peut observer en enfonçant un coton-tige ou une spatule en bois (ou encore une allumette) à travers les restes de larves : en retirant l'objet, la masse que l'on en retire s'effiloche. Cette technique est aussi connue dans les milieux apicoles et se décrit généralement comme le 'test de l'allumette'. La maladie ne se présente toutefois pas toujours de cette façon-là. Souvent, la larve meurt à un stade précoce et le cadavre est rapidement enlevé par les ouvrières. Lors du développement ultérieur du couvain, seules les alvéoles contenant des larves sont scellées par un couvercle en cire et nous obtenons une formation en mosaïque où alternent des alvéoles vides et des alvéoles scellées. Ce tableau clinique se présente toutefois aussi pour d'autres maladies du couvain. Ce qui est caractéristique, mais plutôt rare, c'est la situation où l'abeille ne meurt qu'au stade de nymphe et que les structures dures de la langue pupale émergent des restes pourris (Genersch, 2010).

P. larvae est une bactérie sporulante, et ces stades sporulés sont particulièrement résistants. Ils peuvent supporter pour une courte durée des températures jusqu'à 100°C (Hansen & Brodsgaard, 1999). De plus, les spores sont viables pendant de nombreuses décennies ; il a même été décrit que des restes de larves de colonies malades peuvent encore provoquer la maladie après 35 ans (Haseman, 1961). Et, étant donné qu'une seule larve morte peut contenir jusqu'à 25×10^9 spores, une ruche atteinte de la LA constitue une source de contamination importante pour les ruches voisines. La maladie se transmet d'ailleurs exclusivement via ce stade sporulé. Cela vient du fait que les cellules végétatives de *P. larvae* sont particulièrement sensibles à la gelée royale, la sécrétion des glandes hypopharyngées dont sont nourries les jeunes larves (Hornitzky, 1998). Les stades 'cellules divisées' (= cellules végétatives) qui sont absorbés par voie orale avec la nourriture par les larves sont le plus souvent déjà morts avant d'atteindre l'intestin ; ceci contrairement aux spores qui sont insensibles à la gelée royale (Hornitzky, 1998). Les larves sont surtout sensibles à l'infection jusqu'à 36 heures après éclosion ; 10 spores (ou moins) sont alors suffisantes pour provoquer une infection fatale (Genersch, 2010). Dès qu'elles ont atteint 48 heures, les larves s'avèrent de plus en plus résistantes (Hansen & Brodsgaard, 1999). Cela vient notamment de la formation d'une membrane péritrophe dans le lumen de l'intestin larvaire, qui protège l'épithélium intestinal contre les attaques microbiennes. En cas de dose infectieuse élevée ou après multiplication du germe dans le lumen intestinal, une situation apparaît où la barrière intestinale peut être percée même à un âge plus avancé. La multiplication du germe se fait ensuite aussi dans la cavité abdominale, ce qui est généralement fatal à la larve. La dégradation du tissu, y compris le tégument, par les enzymes microbiennes est ce qui donne aux restes de larves cette consistance caractéristique et ce qui garantit, qu'après sporulation, le germe pathogène peut facilement

se propager à l'intérieur de la colonie et être absorbé par une nouvelle victime (Genersch, 2010).

Des différences de virulence au sein de l'espèce *P. larvae* ont été décrites. De plus, elles s'avèrent être en corrélation avec le génotype déterminé sur base d'éléments répétitifs dans le génome bactérien, à savoir les séquences '*enterobacterial repetitive intergenic consensus* (ERIC)' (Genersch *et al.*, 2006). ERIC-I et ERIC-II donnent lieu aux tableaux cliniques décrits ci-avant, alors qu'ERIC-III et ERIC-IV correspondent à l'ancienne sous-espèce *pulvificiens*, responsable de la '*powdery scale disease*' (Katznelson, 1950). Cette classification en sous-espèces a été à l'origine de nombreuses controverses (de Graaf *et al.*, 2006) et n'est plus utilisée actuellement. Les génotypes ERIC-III et ERIC-IV n'ont plus été isolés récemment et ne peuvent plus être retrouvés que dans des collections de cultures. Des infections expérimentales ont fait apparaître qu'ERIC-I est moins virulent (au niveau des larves) que les autres génotypes. Cependant, il existe une corrélation négative entre la virulence au niveau des larves et celle au niveau de la colonie. En effet, les souches qui tuent rapidement les larves se dispersent moins rapidement dans une colonie, parce que la mort prématurée de la larve provoque une disparition plus rapide de la souche hors de la colonie, ce qui empêche d'atteindre des concentrations en spores dangereusement élevées (Genersch *et al.*, 2006).

Les abeilles adultes ne sont pas sensibles à la LA (Hitchcock *et al.*, 1979; Wilson, 1971; Riessberger-Galle *et al.*, 2001). On sait peu de choses sur la sensibilité des larves d'autres espèces d'abeilles ou de bourdons. Ainsi, le *Terrestrial Animal Health Code* (OIE, 2010) définit la LA comme une maladie des *Apidae*, une famille d'insectes à laquelle appartiennent toutes les espèces d'abeilles et de bourdons. Or, l'origine de cette définition est depuis lors tombée en désuétude ; le manuel de l'OIE a subi au cours des ans des révisions successives par des auteurs divers (de Graaf, communication orale). Chez l'abeille africaine, une infection expérimentale porte sur *P. larvae* (Danka & Villa, 1994), mais il s'agit seulement d'une sous-espèce de l'abeille européenne (*Apis mellifera scutellata*). L'absence de rapportage de la LA en Afrique subsaharienne est peut-être la conséquence du comportement hygiénique de cette sous-espèce (Fries & Raina, 2003). Le comportement hygiénique se trouverait aussi à la base de l'absence d'infections de LA dans les colonies de l'abeille asiatique (*Apis cerana*), et ce malgré le fait qu'ici aussi la sensibilité à l'infection de LA a pu être prouvée expérimentalement (Chen *et al.*, 2000). C'est également le seul rapport que nous avons pu trouver sur une espèce d'abeilles autre qu'*Apis mellifera* qui soit sensible aux infections de *P. larvae*. A notre connaissance, la littérature scientifique ne fait donc état d'aucun cas de présence de la LA au sein du genre *Bombus* ou au sein d'un autre genre de la famille des *Apidae* mis à part le genre *Apis*. Il est considéré que les abeilles et les bourdons hébergent leurs propres types de pathogènes apparentés. Par exemple, *Crithidia bombi* et *Nosema bombi* infectent les bourdons tout en étant incapables d'infecter les abeilles, alors que *Crithidia melliferum* et *Nosema apis* infectent les abeilles sans pouvoir infecter les bourdons (Ruiz-Gonzalez & Brown, 2006; Eijnde & Vette, 1993; Fries *et al.*, 2001). Toutefois, de récentes études sur les pathogènes ont permis de constater que les espèces d'abeilles partagent au moins quelques pathogènes, c'est-à-dire certains virus à ARN comme l'*acute bee paralysis virus*' (Bailey & Gibbs, 1964), le '*Kashmir bee virus*' (Ward *et al.*, 2007; Singh *et al.*, 2010), le '*sac brood virus*' (Singh *et al.*, 2010), l'*Israeli acute paralysis virus*' (Singh *et al.*, 2010), le '*black queen cell virus*' (Singh *et al.*, 2010), et le '*deformed wing virus*' (Genersch *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 2010), mais aussi certains pathogènes bactériens tels que *Spiroplasma apis* et *Spiroplasma melliferum* (Meeus *et al.*, soumis) et le protozoaire *Nosema ceranae* (Plischuk *et al.*, 2009). Ces pathogènes ont tous été d'abord détectés chez les abeilles, et rapportés ultérieurement aussi chez les bourdons. Cette palette de pathogènes partagés n'est en fait pas surprenante si on considère l'habitat partagé des bourdons et des abeilles, et les mêmes voies de transmission utilisées par leurs pathogènes. Une transmission horizontale par utilisation partagée d'une fleur a été prouvée comme étant une voie de transmission réussie pour plusieurs pathogènes des abeilles, à savoir *Spiroplasma* (Raju *et al.*, 1981) et *Crithidia* (Durrer *et al.*, 1994). Une seconde autre voie de transmission horizontale importante des pathogènes peut aussi être le fait pour les bourdons de piller les stocks des abeilles, car ils sont connus pour le faire. En résumé, la transmission interspécifique est une adaptation réussie pour les pathogènes des abeilles parce que les infections au sein d'une autre espèce n'entraîne pas une issue fatale, mais entraîne la capacité d'exploiter davantage d'hôtes.

La résistance de l'abeille face à la LA a fait l'objet d'études intensives. Bon nombre d'aspects s'avèrent jouer un rôle, dont :

- (i) le comportement des abeilles,
- (ii) l'immunité innée,
- (iii) les sécrétions des glandes hypopharyngiennes,
- (iv) la flore intestinale et
- (v) les éléments environnementaux.

Les colonies d'abeilles qui ont été sélectionnées pour leur comportement hygiénique sur base d'un test au cours duquel les larves ont été tuées par congélation, ont présenté une résistance considérablement plus élevée à l'égard de la LA (Spivak & Reuter, 2001). En Argentine, un véritable programme d'élevage a été élaboré sur base de cette constatation (Basualdo *et al.*, 2008). Récemment, les étapes successives de ce comportement hygiénique ont été inventoriées (Gramacho & Goncalves, 2009). L'étude de la base génétique de ce comportement a reçu récemment une nouvelle impulsion par la découverte de '*quantitative trait loci*' (Oxley *et al.*, 2010) et de '*binary trait loci*' (Arechavaleta-Velasco *et al.*, 2011). Précédemment déjà, une variation génétique intra-coloniale de la résistance à l'égard de la LA a été démontrée, et il est possible que le fait que la reine s'accouple avec plusieurs faux-bourçons (polyandrie) constitue une adaptation en vue de réduire le risque d'une atteinte infectieuse catastrophique (Palmer & Oldroyd, 2003; Invernizzi *et al.*, 2009). Au cours de la dernière décennie, on a également pu démontrer que la résistance à l'égard de la LA en fonction de l'âge est causée non seulement par la formation d'une membrane péritrophique, mais aussi par une substance que l'on retrouve dans la larve (Crailsheim & Riessberger-Galle, 2001; Wedenig *et al.*, 2003). Peu après, Evans a pu démontrer que l'expression du peptide antimicrobien 'abaecine' est fortement régulée 24 h après l'inoculation par voie orale de *P. larvae* (Evans, 2004). L'abaecine fait partie de l'immunité innée de l'abeille. La maladie de la colonie s'avère en outre présenter une corrélation négative avec l'expression du gène de cette abaecine chez les ouvrières. Et ensuite, il a pu être démontré que l'expression de ce gène est modérément héréditaire et que cet '*immune trait*' et d'autres peuvent faire partie de programmes d'élevage destinés à améliorer la santé des abeilles (Decanini *et al.*, 2007). Les sécrétions des glandes hypopharyngiennes, ce qu'on appelle la gelée royale et qui servent à nourrir les larves qui viennent d'éclore, peuvent aussi s'avérer contenir des peptides antimicrobiens actifs contre *P. larvae* (Bachanova *et al.*, 2002). En outre, des bactéries qui inhibent la croissance de *P. larvae* ont été isolées à partir de larves (Evans & Armstrong, 2005). De plus, on a pu démontrer que des bactéries non pathogènes induisent l'expression du gène de l'abaecine. Il a été suggéré que de telles bactéries non pathogènes peuvent être utilisées en tant que probiotiques (Evans & Lopez, 2004). Enfin, il a pu être démontré que la propolis présente également une activité antimicrobienne à l'égard de *P. larvae* (Bastos *et al.*, 2008). La propolis est constituée de résines provenant d'arbres, que les abeilles collectent pour boucher les fentes et les fissures dans la ruche. Récemment, on a cependant pu démontrer que ces résines influencent négativement l'expression de gènes d'immunité au niveau de la colonie (Simone *et al.*, 2009). C'est la première fois qu'une relation a pu être trouvée entre des éléments environnementaux et l'expression de gènes d'immunité. Il est clair que la résistance à l'égard de la LA comporte de nombreuses facettes, dont certaines sont héréditaires.

4.2. Méthodes de diagnostic

Le diagnostic de la LA peut se faire par une empreinte ADN directe (*polymerase chain reaction*, PCR) ou par enrichissement préalable sur des milieux de culture solides (de Graaf *et al.*, 2006). L'analyse PCR directe est possible, par exemple, en cas de larves cliniquement malades ('test de l'allumette' positif). Dans tous les autres cas, un enrichissement est souhaitable. Souvent la culture est précédée d'un choc thermique afin de détruire les bactéries non sporulantes. En raison de la faible vitesse de croissance de *P. larvae*, il faut éviter les milieux de culture liquides ; ils permettraient à d'éventuels contaminants d'envahir la culture. La culture à partir de restes de larves glaireux aboutit souvent à une croissance confluyente sur la plaque et d'éventuels contaminants sont plutôt rares. Lors de l'analyse du miel, par contre, l'utilisation de milieux semi-sélectifs est nécessaire ; l'adjonction d'acide nalidixinique (Hornitzky & Clark, 1991) et d'acide pipémidinique (Alippi, 1991; Alippi, 1995) est indiquée. Les colonies de bactéries ayant une morphologie caractéristique peuvent alors être

confirmées via la technologie PCR. Plusieurs ensembles de primer et procédures PCR ont déjà été décrits, cependant la méthode de Dobbelaere *et al.* (2001) a prouvé sa spécificité et sa robustesse au cours de la décennie écoulée.

La caractérisation biochimique de l'agent pathogène est également possible. Cette approche ne nécessite pas d'appareillage sophistiqué, elle est bon marché mais longue. Le plus souvent, on commence par une coloration gram (doit être positive, avec reconnaissance de la forme en bâtonnet de la bactérie au microscope), éventuellement complétée d'un test de la catalase (doit être négatif ou rapporté faiblement positif), après quoi la culture microbienne est cultivée en présence d'hydrates de carbone spécifiques et d'un indicateur de pH. Une galerie d'identification à 4 sucres peut donner un résultat discriminatoire : les acides se forment avec le glucose et le tréhalose, et non avec l'arabinose et le xylose (Gordon *et al.*, 1973).

Depuis peu, un test immunologique permettant une confirmation rapide sur le terrain se trouve sur le marché (Vita Europe). Ce test fonctionne uniquement si l'on peut tirer des restes de larves les fils glaireux caractéristiques. Pour une discussion plus détaillée des possibilités de diagnostic, nous renvoyons à l'article récapitulatif de de Graaf *et al.* (2006) et au *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2011* (OIE, 2011).

4.3. Dispositions réglementaires

Au niveau européen, la Directive 82/894/CEE concernant la notification des maladies des animaux dans la Communauté mentionne le petit coléoptère des ruches (*Aethina tumida*) et l'acarien *Tropilaelaps* en ce qui concerne les abeilles mais ne contient aucune disposition pour les bourdons.

La Directive 92/65/CEE, définissant les conditions de police sanitaire régissant les échanges et les importations dans la Communauté d'animaux, de spermatozoïdes, d'ovules et d'embryons non soumis, en ce qui concerne les conditions de police sanitaire, aux réglementations communautaires spécifiques visées à l'annexe A section I de la directive 90/425/CEE, mentionne à l'article 8 :

« Les États membres veillent à ce que les abeilles (*Apis mellifera*) ne puissent faire l'objet d'échanges que si elles satisfont aux exigences suivantes :

a) provenir d'une zone qui ne fait pas l'objet d'une interdiction liée à l'apparition de loque américaine.

La durée d'interdiction doit être d'au moins trente jours à compter du dernier cas constaté et de la date à laquelle toutes les ruches situées dans un rayon de trois kilomètres ont été contrôlées par l'autorité compétente et toutes les ruches infectées ont été brûlées ou traitées et contrôlées à la satisfaction de ladite autorité compétente.

Selon la procédure prévue à l'article 26, et après avis du comité scientifique vétérinaire, les exigences auxquelles sont soumises les abeilles (*Apis mellifera*) ou des exigences équivalentes peuvent être appliquées aux bourdons ;

b) être accompagnées d'un certificat sanitaire conforme au modèle figurant à l'annexe E, dont l'attestation devra être complétée par l'autorité compétente pour attester le respect des exigences prévues au point a). ».

Cette Directive ajoute la loque américaine comme maladie animale à déclaration obligatoire pour les abeilles (cf. annexe A de ladite Directive).

Cette Directive impose également l'utilisation du certificat sanitaire 92/65/EI pour les échanges d'abeilles et de bourdons (cf. annexe E de ladite Directive, deuxième partie). En ce qui concerne la loque américaine, il est mentionné dans celui-ci :

« les abeilles/bourdons proviennent d'une zone qui n'est pas soumise à une interdiction liée à l'apparition de la loque américaine (la période d'interdiction a été maintenue pendant trente jours au moins à compter du dernier cas constaté et de la date à laquelle toutes les ruches situées dans un rayon de trois kilomètres ont été contrôlées par l'autorité compétente, et toutes les ruches infectées ont été brûlées ou traitées et contrôlées à la satisfaction de ladite autorité compétente),

ou,

les bourdons proviennent d'une structure isolée de l'environnement extérieur, agréée et supervisée par l'autorité compétente de l'Etat membre, indemne de la loque américaine et

ayant fait l'objet d'une inspection juste avant l'expédition et ni les bourdons ni les couvains n'ont présenté de signe clinique ou autre indice de maladie. ».

Les autorités sanitaires de différents Etats membres ont été contactées dans le cadre du présent dossier et toutes ont répondu qu'aucune exigence légale spécifique pour les bourdons n'est imposée.

Au niveau belge, l'arrêté royal du 25 avril 1988 désigne la loque américaine, la loque européenne, l'acariose, la varroase, le petit coléoptère des ruches (*Aethina tumida*) et l'acarien *Tropilaelaps* comme maladies animales à déclaration obligatoire pour les abeilles, mais ne contient aucune disposition pour les bourdons.

L'arrêté royal du 7 mars 2007 relatif à la lutte contre les maladies contagieuses des abeilles précise que les six maladies ci-dessus font l'objet d'une lutte officielle, mais ne contient lui non plus aucune disposition pour les bourdons.

L'arrêté ministériel du 31 août 1993, définissant les conditions de police sanitaire régissant les échanges et les importations d'animaux, de sperme, d'ovules et d'embryons, mentionne notamment à l'article 10 :

« *Les abeilles (Apis mellifera) ne peuvent faire l'objet d'échanges que si elles satisfont aux exigences suivantes :*

- a) *Elles doivent provenir d'une zone qui ne fait pas l'objet de mesures d'interdiction en raison de l'apparition de la loque américaine. La durée d'interdiction doit être d'au moins trente jours à compter du dernier cas constaté et de la date à laquelle toutes les ruches situées dans un rayon de trois kilomètres ont été contrôlées par le conseiller apicole et toutes les ruches infectées ont été brûlées ou traitées et contrôlées à la satisfaction du conseiller apicole. Le chef du Service définit les exigences auxquelles sont soumis les bourdons. ».*

Jusqu'à présent, aucune exigence n'a été déterminée pour les bourdons.

Au niveau international, il semblerait que l'Organisation Mondiale de la Santé animale (OIE) travaille à l'élaboration d'exigences spécifiques pour les bourdons d'ici deux ans.

4.4. Méthodes de lutte

4.4.1. Mesures de biosécurité

Les mesures de biosécurité sont celles qui sont prises pour minimiser le risque d'introduction d'agents pathogènes dans des unités de production individuelles (bio-exclusion) et pour minimiser le risque de leur transmission à l'extérieur (bio-confinement) et de leur propagation ultérieure. Il s'agit notamment d'adopter une attitude et un comportement susceptibles de minimiser ces risques. Dans les grandes unités d'élevage de bourdons, une compartimentation additionnelle de la production en sous-unités est requise afin de minimiser la transmission de pathogènes au sein même de l'exploitation (bio-compartimentation).

Pratiquement, il convient de compartimenter la production et d'empêcher tout accès à l'extérieur pour les bourdons et tout accès à l'intérieur pour les abeilles (cf. point 5.2.).

Comme mentionné ci-dessus, les spores de *P. larvae* sont très résistantes et peuvent rester infectieuses durant une longue période, jusqu'à plus que 35 ans (Haseman, 1961). La désinfection du matériel est dès lors une étape cruciale dans la gestion de la LA, surtout après un foyer clinique au cours duquel un nombre extrêmement élevé de spores sont formés. Une telle désinfection peut s'effectuer avec des produits à base d'hypochlorite de sodium (NaOCl), de glutaraldéhyde ou de formaldéhyde. Une désinfection efficace, par laquelle les spores qui ne se trouvent pas directement à la surface du matériel en bois sont également détruites, n'est toutefois seulement atteinte qu'avec des solutions à une concentration de 50 % ou plus (Dobbelaere *et al.*, 2001). Pour rappel, seuls les biocides (= désinfectants) autorisés en Belgique et appartenant au groupe 1 « *Désinfectants et produits biocides généraux* » peuvent être utilisés (cf. la liste des biocides autorisés à l'adresse suivante :

<http://www.health.belgium.be/eportal/Environment/Chemicalsubstances/Biocids/index.htm>).

Ce groupe 1 comprend les produits des types allant de 1 à 5, à savoir les « Produits biocides destinés à l'hygiène humaine », les « Désinfectants utilisés dans le domaine privé et dans le domaine de la santé publique et autres produits biocides », les « Produits biocides destinés à l'hygiène vétérinaire », les « Désinfectants pour les surfaces en contact avec les denrées alimentaires et les aliments pour animaux » et les « Désinfectants pour eau de boisson ». Les spores peuvent également être détruites par la chaleur. Pour ce faire, on peut utiliser une flamme nue ou plonger le matériel dans la paraffine chaude. Une destruction efficace des spores de la LA situées plus profondément dans le bois n'est pas atteinte avec une flamme nue, mais bien par l'immersion dans de la paraffine à 160 °C ou plus (Dobbelaere *et al.*, 2001). La stérilisation humide détruit toutes les spores en surface, mais laisse encore un nombre limité de spores internes infectieuses (Dobbelaere *et al.*, 2001). Dans le cadre de l'élevage des bourdons, on évitera dès lors par précaution l'emploi de matériel en bois et on privilégiera l'utilisation de matériel facilement nettoyable et désinfectable (ex. : étagères en acier galvanisé) ou à usage unique (ex. : conteneur en plastique pour la production d'une seule et même colonie).

Les locaux d'élevage, d'emballage et de stockage doivent aussi être régulièrement nettoyés et désinfectés, au moins entre chaque cycle de production.

Les membres du personnel, ainsi que les visiteurs des unités d'élevage, doivent également respecter des règles d'hygiène telles que le lavage/la désinfection des mains, le port d'un tablier, d'une charlotte et de couvre chaussures, la désinfection des pieds avant l'entrée dans les différents compartiments de production.

4.4.2. Utilisation d'antibiotiques

Certaines maladies et ravageurs des abeilles pourraient être soignés par des antibiotiques ou des agents chimiothérapeutiques. Une revue complète des antimicrobiens pertinents en apiculture a été donnée par Reybroeck (2010) et Reybroeck *et al.* (2012).

De nombreux auteurs ont écrit à propos de l'efficacité de plusieurs antibiotiques et agents chimiothérapeutiques à tenir en échec la loque américaine (LA).

L'oxytétracycline (OTC), habituellement sous sa forme d'hydrochlorure, est utilisée en apiculture dans quelques pays depuis le début des années cinquante pour le traitement des maladies bactériennes du couvain comme la LA (Hopingarner & Nelson, 1987; Spivak, 2000). Terramycin® (hydrochlorure d'OTC) (Phibro Animal Health, Ridgefield Park, NJ) a été pendant longtemps le seul traitement agréé pour les maladies du couvain aux Etats-Unis (Anon., 2010). Actuellement, aux USA, de nombreux autres produits pharmaceutiques vétérinaires ayant l'OTC comme ingrédient de base sont agréés par la Food and Drug Administration (FDA) pour utilisation en apiculture.

La streptomycine est un antibiotique aminoglycoside utilisé en apiculture pour protéger les abeilles contre une série de maladies du couvain. Malgré le fait que le médicament n'est pas autorisé dans de nombreux pays (UE, USA), son usage est souvent suggéré dans les forums et dans les manuels d'apiculture (Mutinelli, 2003). En Chine, la streptomycine et le chloramphénicol (également interdit d'utilisation dans l'UE, cf. ci-après) ont été les antibiotiques privilégiés pour le contrôle d'un important foyer de LA en 1997 (Ortelli *et al.*, 2004).

L'utilisation de sulfamidés pour protéger les abeilles des maladies bactériennes est devenue une pratique usuelle dans l'apiculture commerciale après que Haseman & Childers (1944) eurent appris que les sulfamidés, et surtout le sulfathiazole, pouvaient empêcher la propagation de la LA. Le composé sulfathiazole procurait un contrôle à court terme en supprimant les symptômes de la maladie des abeilles provoquée par *P. larvae*. Il empêchait également la germination des spores reproductrices. L'utilisation de sulfamidés dans l'alimentation des abeilles au printemps et en automne a aussi été encouragée par d'autres auteurs (Eckert, 1947; Reinhardt, 1947; Johnson, 1948; Katznelson & Gooderham, 1949; Katznelson, 1950). Malgré l'efficacité des sulfamidés contre la LA, leur stabilité et leurs

résidus conséquents dans le miel ont posé problème, et l'enregistrement fut amené à disparaître dans les années septante (Shimanuki & Knox, 1994).

La tylosine, un antibiotique macrolide, a été utilisée de façon générale en apiculture. Son efficacité a été démontrée par différents auteurs (Hitchcock *et al.*, 1970; Moffett *et al.*, 1970; Peng *et al.*, 1996; Pettis & Feldlaufer, 2005). La tylosine s'est avérée plus stable dans les sirops sucrés que l'OTC (Kochansky *et al.*, 1999). En octobre 2005, le Tylan Soluble® (Elanco Animal Health, Indianapolis, IN), à savoir le tartrate de tylosine, a reçu aux USA l'agrément de la FDA pour le traitement de la LA active, mais pas pour un usage préventif dans les colonies saines. L'utilisation de la tylosine contre la LA a été encouragée après que *Paenibacillus* eut manifesté une résistance à l'égard des tétracyclines.

L'érythromycine, un autre macrolide, a été testé pour la première fois en 1955 (Katznelson *et al.*, 1955; Katznelson, 1956). En fonction de la littérature, l'érythromycine a été rapportée comme étant efficace (Machova, 1970; Okayama *et al.*, 1996), alors que d'autres auteurs l'ont trouvée inefficace contre la LA (Katznelson *et al.*, 1955; Moffett *et al.*, 1958).

La lincomycine fait partie du groupe des lincosamidés. Son effet contre *P. larvae* a été relaté par certains auteurs (Okayama *et al.*, 1996; Kochansky *et al.*, 2001). La lincomycine a été, avec la tylosine, testée comme médicament potentiel pour un agrément par la FDA pour lutter contre la LA résistante aux tétracyclines. La lincomycine était efficace dans la lutte contre la LA lorsqu'elle était administrée aux colonies d'abeilles sous forme de poudre dans le sucre de glace (Feldlaufer *et al.*, 2001). L'agrément de la FDA lui-même est encore un projet en cours.

Le chloramphénicol (CAP) est un puissant antibiotique à large spectre et un carcinogène potentiel qui a été interdit d'utilisation chez les animaux producteurs d'aliments, y compris les abeilles, dans l'Union européenne depuis 1994 (Règlement (CE) de la Commission n° 1430/94). En Chine en 1997-1998, des centaines de milliers de ruches ont été infectées par la LA et traitées au CAP ou à la streptomycine par les apiculteurs pour sauver leurs ruches et leur industrie (Ortelli *et al.*, 2004).

D'autres antibiotiques et agents chimiothérapeutiques pourraient aussi être utilisés pour lutter contre la LA. Machova (1970) a obtenu une bonne sensibilité de *P. larvae* à la bacitracine, un antibiotique polypeptide. Les isolats de *P. larvae* testés par Okayama *et al.* (1996) étaient sensibles aux macrolides. Parmi les macrolides, la microsamicine s'est révélée être l'agent le plus efficace. Kochansky *et al.* (2001) ont testé des antibiotiques alternatifs contre les *P. larvae* résistants à l'OTC. La rifampicine, un antibiotique bactéricide du groupe des rifamycines, était de loin l'antibiotique testé le plus actif ; la monensine (un antibiotique ionophore) et l'érythromycine, la tylosine et la lincomycine, décrites ci-avant, se sont également révélées actives *in vitro* contre les souches résistantes de *P. larvae*. Dans une étude ultérieure (Kochansky & Pettis, 2005), d'autres antimicrobiens ont été testés. La pirlimycine (lincosamide) et la tiamuline, un antibiotique pleuromutiline, ont présenté une activité élevée *in vitro* mais partagent le mode d'action de la tylosine, et de ce fait n'offrent pas d'avantage. L'efficacité de la tilmicosine, un antibiotique macrolide, contre la LA *in vitro* et *in vivo* a été rapportée par Reynaldi *et al.* (2008). La liste d'alternatives efficaces à l'oxytétracycline et à la tylosine pour traiter la LA est très limitée. Malgré le fait que certains produits pharmaceutiques semblent représenter des traitements alternatifs potentiels de la LA, il n'y a jusqu'à présent pas d'indices de l'utilisation de bacitracine, microsamicine, rifamycine, monensine, pirlimycine, tiamuline et de tilmicosine en apiculture.

En ce qui concerne l'utilisation d'antibiotiques ou d'agents chimiothérapeutiques contre la loque américaine, il est important de considérer que :

- Les antibiotiques peuvent seulement atténuer – et pas éliminer – la maladie, c'est pourquoi, dans l'hypothèse de leur utilisation, les ruches ou les colonies de bourdons infectées doivent être traitées constamment en prévention de l'apparition d'un foyer de LA. Les médicaments ne tuent pas les spores de *P. larvae*, qui se sont formées dans les écailles (= larves infectées et mortes qui se sont desséchées et qui adhèrent aux parois de la cellule) hautement infectieuses et qui pourraient rester viables pendant des années.

- L'utilisation d'antibiotiques dans le cadre de l'élevage de bourdons pourrait propager une résistance des souches de *Paenibacillus*, tout comme l'usage intensif de tétracyclines dans l'apiculture professionnelle s'est traduit par l'apparition de souches de *Paenibacillus* résistantes aux tétracyclines aux USA (Miyagi *et al.*, 2000), au Canada (Colter, 2000), et en Argentine (Alippi, 2000). Il y a maintenant une inquiétude générale concernant la résistance répandue à l'égard des tétracyclines.
- L'utilisation d'antibiotiques en apiculture donne lieu à des niveaux élevés en résidus dans le miel, ce qui conduit à devoir retirer celui-ci du marché pendant de longues périodes. Etant donné que les abeilles sont classées parmi les animaux producteurs d'aliments dans l'UE, l'établissement d'une limite maximale en résidus (LMR) pour le miel est nécessaire avant de pouvoir accorder une autorisation de commercialisation à un médicament vétérinaire. Les bourdons sont élevés à des fins de pollinisation et pas pour la production de miel, et ne sont dès lors pas soumis à la législation pour les animaux producteurs d'aliments. En tout cas, il faudrait éliminer toutes les possibilités de transmission de résidus d'antimicrobiens à partir des élevages de bourdons vers les ruches de production de miel.
- Pour rappel, seuls les médicaments à usage vétérinaire autorisés au niveau national ou au niveau européen peuvent être utilisés, conformément à l'arrêté royal du 23 mai 2000. L'Agence Fédérale des Médicaments et des Produits de Santé (AFMPS) fournit davantage d'informations à ce sujet (cf. <http://www.fagg-afmps.be/fr/veterinaire/>).
- Au besoin, le système de la cascade pourrait être appliqué, conformément à l'arrêté royal du 14 décembre 2006. Ce système offre au vétérinaire la possibilité de s'écarter de l'utilisation stricte des médicaments enregistrés en Belgique. Ainsi, il est possible d'utiliser un médicament pour des animaux d'une autre espèce ou pour des animaux de la même espèce mais pour une affection différente. D'autre part, le vétérinaire peut aussi prescrire un médicament à usage vétérinaire qui est autorisé dans un autre Etat membre de l'Union européenne, un médicament à usage humain et même une préparation magistrale. L'Agence Fédérale des Médicaments et des Produits de Santé (AFMPS) fournit davantage d'informations à ce sujet (cf. <http://www.fagg-afmps.be/fr/veterinaire/>).

4.5. Facteurs de risque

En ce qui concerne la contamination éventuelle des bourdons par des spores et/ou des cellules végétatives de la LA au niveau des unités d'élevage, les facteurs de risque suivants ont été identifiés :

- L'utilisation de pollen de corbicules (= récolté par des abeilles) et/ou de miel et/ou de sirop de sucre contaminé(s) pour nourrir les colonies de bourdons ;
- L'utilisation de bourdons/abeilles sauvages contaminé(e)s pour démarrer un nouveau cycle de production (ex. : si production d'une nouvelle espèce par exemple) ;
- La contamination par le personnel manipulant les colonies en croissance et/ou par les visiteurs de l'unité d'élevage ;
- La contamination par le matériel utilisé dans le cadre de l'élevage.

Après leur vente, ces bourdons d'élevage éventuellement contaminés par des spores et/ou des cellules végétatives de la LA pourraient contaminer à leur tour des abeilles domestiques :

- soit via la visite d'une même fleur ou d'une même source d'eau ;
- soit après le pillage par les abeilles des restes de nourriture issus de l'unité d'élevage des bourdons (ex. : le sirop de sucre placé dans les boîtes de livraison des colonies de bourdons) ;
- soit par contact avec du matériel ayant été utilisé au sein de l'unité d'élevage et contaminé ;
- soit suite à un contact direct entre ces bourdons et des abeilles domestiques.

Ces différents facteurs de risque identifiés sont représentés à la figure 1 et sont détaillés ci-après.

Le facteur de risque 'Homme' désigne le risque de transmission de la LA des bourdons d'élevage aux abeilles domestiques et *vice-versa* que représentent les éleveurs de bourdons,

les apiculteurs et les visiteurs des centres d'élevage ou d'apiculture (jouant le rôle de vecteurs animés).

Une transmission indirecte de la LA entre les bourdons d'élevage et les abeilles domestiques via un autre insecte (ou arthropode) n'a pas été retenue comme pertinente, vu que dans l'état actuel des connaissances, aucun ectoparasite commun aux deux espèces n'est connu.

Sous le terme 'Alimentation', il faut comprendre le pollen et les sirops sucrés de nourrissage ainsi qu'éventuellement le miel et les larves d'abeilles.

Au niveau de l'élevage, une contamination est possible de bourdons à bourdons soit si des reines sont élevées et que des bourdons mâles sauvages sont utilisés pour la fécondation, soit si on importe du matériel d'élevage pour multiplier une nouvelle race de bourdons. En effet, un scénario possible est qu'une ruche « morte », et donc sans défense, soit pillée par des bourdons sauvages. Si cette ruche est contaminée par des cellules végétatives et/ou des spores de la LA, les bourdons sauvages « pilleurs » peuvent être contaminés. Si ces derniers sont ensuite utilisés dans le cadre de l'élevage de bourdons, ils peuvent transmettre la LA.

Bien que cela ne soit pas l'objet du présent dossier, une contamination d'abeilles à abeilles est possible au niveau de la conduite de ruches suite aux phénomènes de pillage et d'essaimage, à l'achat/échange de reines, à la transhumance des ruches, au rassemblement de ruches ou encore au nivellement des ruches.

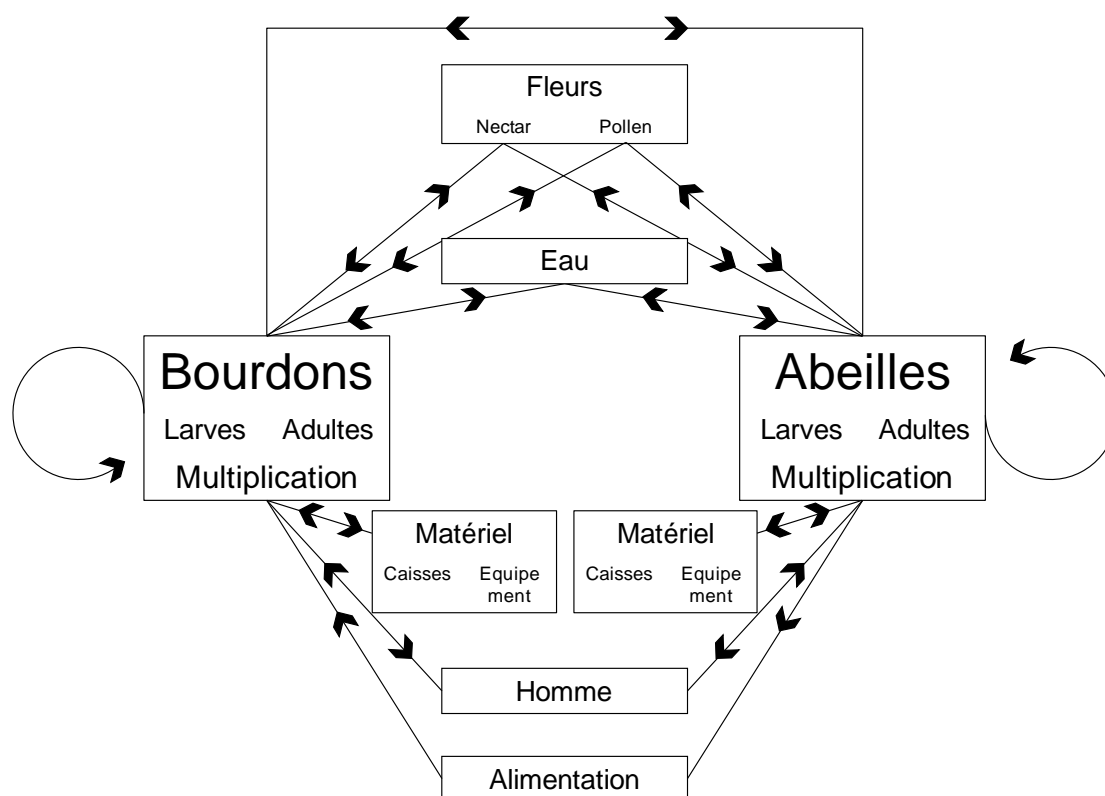


Figure 1: Représentation schématique de l'ensemble des facteurs de risque de contamination des abeilles domestiques par des spores et/ou des cellules végétatives de la loque américaine via les bourdons d'élevage et *vice-versa*.

5. Evaluation du risque

5.1. Identification des voies (pathways) de dissémination

De manière générale et comme indiqué au point 4.1., le risque posé par les cellules végétatives de la LA est négligeable comparé à celui posé par les spores. Les premières sont en effet nettement moins résistantes que les secondes. Il y a donc lieu de considérer que la transmission de la maladie se fait presque exclusivement via la forme sporulée.

5.1.1. Pendant la période d'élevage des bourdons

En ce qui concerne les unités d'élevage de bourdons, les différentes voies de dissémination de la LA entre les bourdons d'élevage et les abeilles domestiques sont représentées à la figure 2.

Au sein de ces unités d'élevage, le risque de transmission de la LA entre les bourdons et les abeilles via les fleurs et/ou l'eau est *a priori* inexistant. Ceci est vrai pour autant que les règles élémentaires de biosécurité soient respectées au niveau de l'élevage des bourdons. Cela signifie notamment qu'il faut compartimenter la production et empêcher tout accès à l'extérieur pour les bourdons et tout accès à l'intérieur pour les abeilles (cf. point 4.4.1.).

En ce qui concerne le matériel, supposé différent selon qu'on se situe au niveau de l'élevage de bourdons ou de la conduite de ruches, le risque de transmission de la LA entre les bourdons et les abeilles est également *a priori* inexistant si le matériel utilisé pour l'élevage des bourdons est tenu hors de portée des abeilles. Un risque de transmission de la LA existe cependant pour les bourdons d'élevage dans le cas où le matériel, utilisé pour l'élevage des bourdons et éventuellement contaminé, est réutilisé (= recyclage) pour l'élevage d'autres bourdons. Ce même risque de transmission existe également en ce qui concerne les abeilles domestiques vu que le matériel apicole est en général réutilisé.

Dans les établissements professionnels d'élevage de bourdons, il n'y a pratiquement aucun contact entre les bourdons élevés et le monde extérieur ou l'habitat des abeilles. Tous les contacts extérieurs sont évités par un système d'élevage in-house (allant de la reproduction jusqu'au produit final, en passant par l'hibernation, l'initiation de la colonie et la croissance de la colonie). Nous donnons ci-après un résumé des seuls lieux dans la chaîne où il y a un contact avec le monde extérieur et l'habitat des abeilles :

1. L'apport de nouveau matériel génétique :
Les établissements d'élevage ne donnent pas facilement d'informations sur ce point. Officiellement, ils communiquent qu'aucun nouveau matériel génétique n'est nécessaire pour garantir leur système d'élevage de masse. Mais d'un autre côté, ils informent cependant que lorsque de nouvelles reines de bourdon entrent, elles sont d'abord placées en quarantaine. De plus, ils précisent que les colonies et les reines filles peuvent être inspectées avant d'entrer dans l'unité d'élevage de masse.
2. Contacts avec les membres du personnel et/ou les visiteurs :
Des mesures de précaution sont prises (cf. 4.4.1.), essentiellement pour prévenir toute contamination d'une chambre d'élevage à une autre.
3. Sources d'aliments :
La source alimentaire, à savoir les sirops sucrés de nourrissage, sont garantis exempts de LA. La source protéinique est le pollen récolté par les abeilles, qui peut contenir des spores de la LA. Le pollen utilisé dans les établissements d'élevage est du pollen corbiculaire, tombant des pattes des abeilles butineuses avant leur entrée au nid et ayant donc un contact non direct avec les spores provenant de larves infectées (spores des larves → abeille nourrice → butineuse → corbicules). A notre connaissance, *P. larvae* n'a pas été détecté dans le pollen corbiculaire. Mais *N. ceranae* (Higes *et al.*, 2008) et des virus de RNA (Singh *et al.*, 2010) ont été détectés dans du pollen corbiculaire, et *P. larvae* dans du miel (Bakonyi *et al.*, 2003).
4. Initiation de la colonie :
Dans certains établissements d'élevage, une abeille est placée avec la reine bourdon pour initier la ponte. Mais, à notre connaissance, cette technique n'est pas très

répandue et elle est discutable en raison de la transmission potentielle de pathogènes.

En conclusion, si la LA n'apparaît pas naturellement chez les bourdons, la principale voie d'introduction dans les colonies est le pollen récolté par les abeilles.

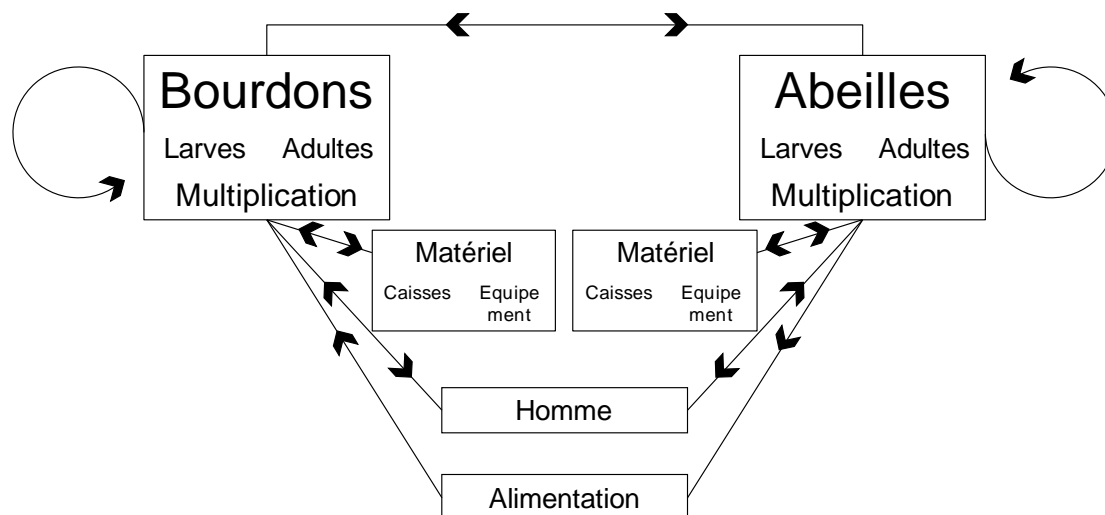


Figure 2 : Représentation schématique de l'ensemble des voies de dissémination de la loque américaine entre les bourdons d'élevage et les abeilles domestiques, au cours de l'élevage de ceux-ci (= avant la vente).

5.1.2. Après la vente des bourdons d'élevage

Après la vente des bourdons d'élevage, c'est-à-dire lors de leur utilisation, le risque de transmission de la LA aux abeilles domestiques est de manière générale *a priori* plus élevé car il y a davantage de contacts possibles entre ces deux groupes. Les différentes voies de dissémination de la LA entre ces deux groupes lors de l'utilisation des bourdons sont représentées à la figure 3.

La situation présentant le risque le plus élevé de transmission de la LA des bourdons aux abeilles, soit directement, soit indirectement, se présente lorsque ces deux types d'insecte sont utilisés simultanément dans un milieu confiné (ex. bourdons et abeilles dans certaines serres).

En situation naturelle, si la LA infectait *Bombus* sp., elle ne produirait probablement pas les importants signes cliniques qu'on retrouve chez les abeilles. Mais un tableau infectieux atténué a pu facilement être resté inaperçu dans les études moins nombreuses sur les bourdons, comme la prévalence récemment découverte de *Spiroplasma apis* chez les bourdons européens (Meeus *et al.*, soumis). A notre connaissance, on n'a pas procédé à d'importantes activités de contrôle (screening) en vue de détecter *P. larvae*, l'agent vecteur de la LA. D'autre part, de récentes études ont fait appel à des méthodes non biaisées de screening de bactéries intestinales sur plusieurs espèces de bourdons, mais n'ont pas permis de détecter *P. larvae* (Koch & Schmid-Hempel, 2011; Martinson *et al.*, 2011). En conclusion, si *P. larvae* pouvait infecter les bourdons, il ne provoquerait probablement pas de signes cliniques, ou alors plutôt atténués, puisqu'il est resté inaperçu jusqu'à présent.

Autrefois, on considérait que les spores de *P. larvae* germaient à l'une des deux extrémités de l'intestin moyen (ou mésentéron) des larves d'abeilles, peu après l'entrée dans l'intestin moyen, et qu'elles traversaient l'épithélium par phagocytose. Toutefois, de récentes études ont démontré qu'elles germent à n'importe quel endroit de l'intestin moyen et que les cellules (bactéries) végétatives colonisent l'intestin moyen de la larve où elles prolifèrent massivement comme commensaux des aliments ingérés par la larve. A un stade ultérieur, lorsque l'intestin

moyen ne contient plus rien d'autre que ces bactéries pathogènes, elles pénètrent dans l'épithélium intestinal et 'éclatent' hors de l'intestin dans la cavité abdominale, tuant du même coup la larve (Yue *et al.*, 2008; Genersch, 2008). Etant donné que ces bactéries fonctionnent comme un commensal aux premiers stades des infections, il est plus que probable qu'elles puissent infecter d'autres insectes hôtes. L'étape la plus critique pour le changement d'hôte est que les spores puissent germer ou non, mais elles n'ont pas besoin de pénétrer l'intestin de la larve pour s'établir. Si les spores ne sont pas capables de germer à l'intérieur de l'intestin, il reste encore à déterminer si elles sont encore infectieuses après avoir passé l'intestin du bourdon (vectoring). Par exemple, *Crithidia bombi* n'est pas capable d'infecter les abeilles mais est capable de survivre au passage à travers leur intestin tout en étant encore capable d'infecter des bourdons ultérieurement (Ruiz-Gonzalez & Brown, 2006).

Ci-avant, nous avons expliqué que l'utilisation partagée de fleurs et l'activité de pillage sont les principales voies de transmission de pathogènes entre les abeilles et les bourdons. Les abeilles pilleuses sont considérées comme une voie de transmission importante de la LA entre les colonies d'abeilles (Genersch *et al.*, 2008). Mais les bourdons pilleurs entrent en contact avec *P. larvae* et peuvent aussi potentiellement infecter leur nid.

En conclusion, comme les abeilles et les bourdons ont un habitat qui se chevauche et que les bourdons sont connus pour piller les réserves des abeilles, les colonies de bourdons peuvent entrer en contact avec *P. larvae*. Les premières étapes de l'infection par *P. larvae* sont commensales, rendant davantage possible, mais non garantie, l'infection interspécifique.

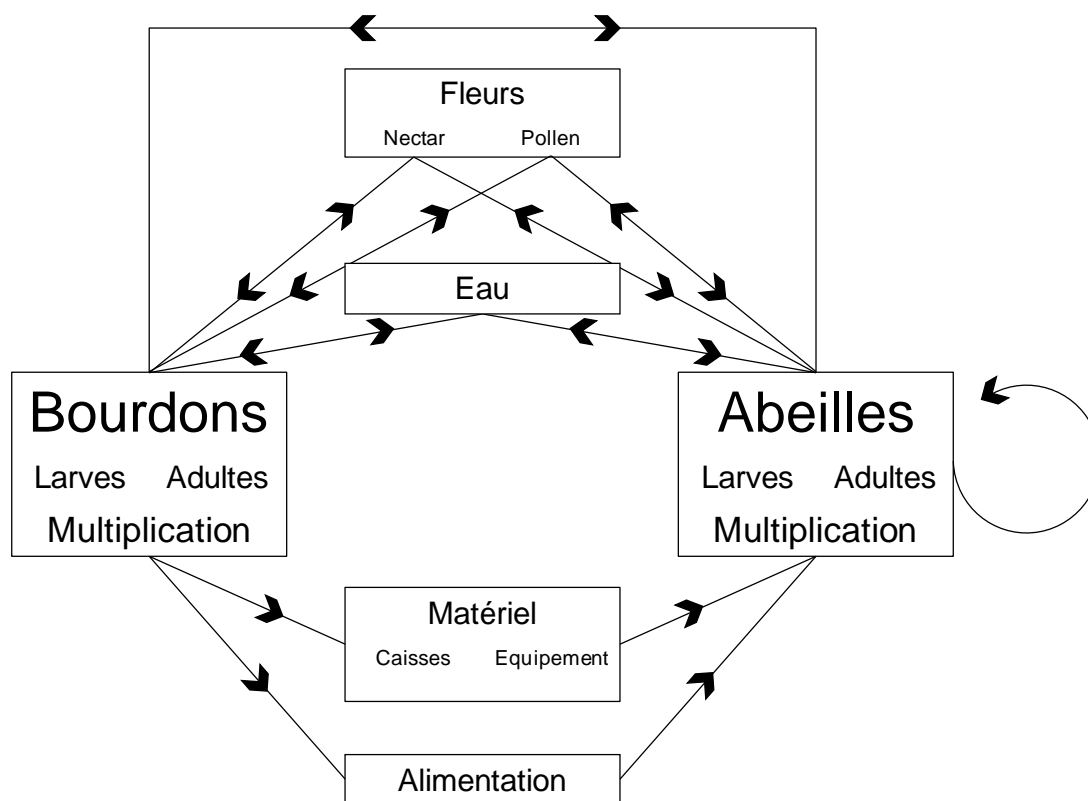


Figure 3 : Représentation schématique de l'ensemble des voies de dissémination de la loque américaine entre les bourdons d'élevage et les abeilles domestiques, au cours de l'utilisation de ceux-ci (= après la vente).

5.2. Identification des options de gestion

Etant donné que les antibiotiques sont inefficaces contre les spores de la LA, l'accent devrait être mis sur la prévention de la contamination des bourdons d'élevage, afin que ceux-ci ne deviennent pas à leur tour, lors de leur utilisation, une source de contamination pour les

abeilles domestiques. C'est la raison pour laquelle il est recommandé de mettre en œuvre toutes les mesures de biosécurité nécessaires au sein des unités d'élevage. Par exemple, l'infrastructure et les équipements de ces unités devraient empêcher toute entrée d'insecte sauvage (ex. : abeilles et bourdons) et tout contact entre les différents lots/colonies de bourdon produits (ex. : production séparée de différentes espèces de bourdons) pour éviter une dissémination éventuelle de la maladie au sein de l'unité d'élevage (= respect du principe de compartimentation de la production). Les intrants d'origine apicole tels que le pollen, susceptibles d'être contaminés par des spores et/ou des cellules végétatives de la LA, devraient être évités ou analysés et décontaminés si nécessaire avant utilisation (ex. : traitement par rayons gamma du pollen). Les autres intrants devraient aussi être analysés afin de détecter toute éventuelle contamination et devraient également être décontaminés si nécessaire. Les locaux d'élevage, d'emballage et de stockage devraient être régulièrement nettoyés et désinfectés, au moins entre chaque cycle de production. Les membres du personnel, ainsi que les visiteurs des unités d'élevage, devraient respecter des règles d'hygiène telles que le lavage/la désinfection des mains, le port d'un tablier, d'une charlotte et de couvrir chaussures, la désinfection des pieds avant l'entrée dans les différents compartiments de production.

L'éventuelle utilisation d'antibiotiques afin de lutter contre la LA chez les bourdons d'élevage ne devrait s'envisager qu'occasionnellement, en cas de foyer, ce qui pour rappel n'a jusqu'à présent jamais été rencontré, et pas de manière systématique, étant donné le risque de voir alors apparaître des souches résistantes.

6. Recommandations

Afin d'améliorer les connaissances scientifiques, il serait nécessaire d'étudier la possibilité que les bourdons d'élevage soient contaminés par des cellules végétatives et/ou des spores de la LA, qu'ils les multiplient et les disséminent (ex. : sont-ils réellement infectés par la LA ou les spores ne font-elles que résister au passage dans leur intestin ?), et qu'ils développent la maladie (ex. : dans l'affirmative, quelle serait la dose infectieuse ?). Il serait également nécessaire d'examiner dans quelles concentrations *P. larvae* peut-il se retrouver dans le pollen corbiculaire ou le miel.

Idéalement, afin de se prononcer sur le risque de transmission de la LA des bourdons d'élevage aux abeilles domestiques, il serait nécessaire de réaliser des essais d'infection en milieu confiné.

Il serait également nécessaire d'examiner en détail les mécanismes de résistance à la LA qui s'expriment différemment entre les diverses espèces d'abeilles et de bourdons.

Dans le cadre des bonnes pratiques d'élevage des bourdons, il est recommandé de décontaminer les intrants, notamment le pollen. Ce dernier peut être stérilisé à l'aide de rayons gamma, mais il a été constaté que sa qualité nutritionnelle était alors significativement diminuée, ce qui conduit à une baisse de la production au niveau de l'élevage des bourdons. Une analyse approfondie des avantages et inconvénients liés à ce type de traitement s'avère donc nécessaire avant de pouvoir recommander son application ou non au pollen.

Afin de limiter le risque de transmission de la LA aux bourdons d'élevage, il est recommandé d'éviter d'utiliser des aliments provenant de ruches d'abeilles domestiques pour l'alimentation des bourdons.

Dans le cadre des bonnes pratiques d'élevage des bourdons et afin de lutter au mieux contre la transmission d'agents infectieux et/ou de parasites, il est recommandé de compartimenter au maximum la production (= règle de biosécurité).

Afin de lutter contre la LA chez les bourdons d'élevage, des antibiotiques pourraient être administrés via l'alimentation sucrée. Par rapport aux abeilles domestiques, la question de la problématique des résidus d'antibiotiques dans le miel ne se pose bien sûr pas pour les bourdons avec la même acuité. Cependant, il est à noter que les antibiotiques sont efficaces

contre les cellules végétatives de la LA, mais pas contre les spores, ce qui pourrait représenter un problème sur le long terme. En outre, l'utilisation d'antibiotiques pourrait entraîner une diminution de la productivité des élevages de bourdons. Des phénomènes de résistance à ces antibiotiques pourraient également apparaître suite à une mauvaise utilisation de ceux-ci. De plus, en cas de traitement, toutes les mesures devront être prises afin d'éviter le « pillage » des restes de sirops sucrés de nourrissage des bourdons d'élevage, qui contiennent le(s) antibiotique(s), par les abeilles domestiques. Une analyse approfondie des avantages et inconvénients liés à l'utilisation d'antibiotiques s'avère donc nécessaire avant de pouvoir recommander leur utilisation ou non dans le cadre de la lutte contre la LA chez le bourdon d'élevage.

Afin d'améliorer l'efficacité de la lutte contre les maladies des abeilles domestiques et des bourdons d'élevage, il serait nécessaire de connaître au mieux le nombre d'apiculteurs et d'éleveurs de bourdons actifs en Belgique, ainsi que leurs coordonnées. Il est donc recommandé à l'AFSCA de stimuler l'enregistrement de ces apiculteurs ou éleveurs.

Un manque d'informations par rapport aux échantillons analysés a été constaté. En effet, il semble difficile, voire impossible, de préciser l'origine pour certains échantillons. Il est dès lors recommandé qu'à l'avenir un minimum d'informations soient associées aux échantillons analysés (ex. : localisation du producteur, contexte de la demande d'analyse telle que la suspicion d'un foyer ou la certification d'indemnité...).

7. Conclusions

Le Comité scientifique évalue comme faible le risque que des bourdons d'élevage contaminés par des spores et/ou des cellules végétatives de la LA (*Paenibacillus larvae*) provoquent une apparition clinique de cette maladie chez les abeilles domestiques, vu notamment le fait qu'il n'a jamais été démontré jusqu'ici que les bourdons pouvaient être porteurs de cette maladie.

De plus, la probabilité que les abeilles domestiques soient contaminées par la LA via les bourdons d'élevage est beaucoup plus faible par rapport à la probabilité qu'elles le soient suite à un contact direct ou indirect avec d'autres abeilles, vu que la maladie est largement répandue.

Les bonnes pratiques d'élevage de bourdons exigent néanmoins que toutes les mesures nécessaires soient mises en œuvre afin de limiter au minimum le risque de contamination de ceux-ci par des spores et/ou des cellules végétatives de la LA (ex. : respect de règles de biosécurité).

Pour le Comité scientifique,
Le Président,

Prof. Dr. Ir. André Huyghebaert

Bruxelles, le 23/04/2012

Références

Alford D.V., 1969. A study of the hibernation of bumblebees (*Hymenoptera: Bombidae*) in southern England. *Journal of Animal Ecology*. 38:149-170.

Alford D.V., 1975. *Bumblebees*. Davis-Poynter, London.

Alippi A.M., 1991. A comparison of laboratory techniques for the detection of significant bacteria of the honey bee, *Apis mellifera*, in Argentina. *J. Apic. Res.* 30, 75–80.

Alippi A.M., 1995. Detection of *Bacillus larvae* spores in Argentinian honeys by using a semi-selective medium. *Microbiologia*. 11, 343–350.

Alippi A.M., 2000. Is Terramycin losing its effectiveness against AFB? *Bee Biz*. 11:27-29.

Anonymous, 2010. FDA. Available at : <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/animaldrugsatfda/>.

Arechavaleta-Velasco M.E., Hunt G.J., Spivak M., Camacho-Rea C., 2011. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*. 2(3):283-298.

Bachanova K., Kludiny J., Kopernicky J., Simuth J., 2002. Identification of honeybee peptide active against *Paenibacillus larvae larvae* through bacterial growth-inhibition assay on polyacrylamide gel. *Apidologie*. 33(3):259-269.

Bakonyi T., Derakhshifar I., Grabensteiner E., Nowotny N., 2003. Development and evaluation of PCR assays for the detection of *Paenibacillus larvae* in honey samples: Comparison with isolation and biochemical characterization. *Applied and Environmental Microbiology*. 69:1504-1510.

Bastos E.M.A.F., Simone M., Jorge D.M., Soares A.E.E., Spivak M., 2008. In vitro study of the antimicrobial activity of Brazilian propolis against *Paenibacillus larvae*. *J. Invertebr. Pathol.* 97(3):273-281.

Basualdo M., Figini E., Torres J., Tabera A., Libonatti C., Bedascarrasbure E., 2008. *Spanish Journal of Agricultural Research*. 6(2):236-240.

Chen Y.W., Wang C.H., An J., Ho K.K., 2000. Susceptibility of the Asian honey bee, *Apis cerana*, to American foulbrood, *Paenibacillus larvae larvae*. *Journal of Apicultural Research*. 39(3-4):169-175.

Colter D., 2000. An update on resistant American foulbrood disease in Alberta. *Alberta Bee News*. September 2000:2-4.

Crailsheim K., Riessberger-Galle U., 2001. Honey bee age-dependent resistance against American foulbrood. *Apidologie*. 32(1):91-103.

Danka R.G., Villa J.D., 1994. Preliminary observations on the susceptibility of Africanized honey bees to American foulbrood. *Journal of Apicultural Research*. 33(4):243-245.

Decanini L.I., Collins A.M., Evans J.D., 2007. Variation and heritability in immune gene expression by diseased honeybees. *Journal of Heredity*. 98(3):195-201.

de Graaf D.C., De Vos P., Heyndrickx M., Van Trappen S., Peiren N., Jacobs F.J., 2006. Identification of *Paenibacillus larvae* to the subspecies level: an obstacle for AFB diagnosis. *J. Invertebr. Pathol.* 91, 115–123.

de Graaf D.C., Alippi A.M., Brown M., Evans J.D., Feldlaufer M., Gregorc A., Hornitzky M., Pernal S.F., Schuch D.M.T., Titěra D., Tomkies V., Ritter W., 2006. Diagnosis of American

- foulbrood in honey bees: a synthesis and proposed analytical protocols. *Lett. Appl. Microbiol.* 43(2006):583–590.
- Dobbelaere W., de Graaf D.C., Reybroeck W., Desmedt E., Peeters J.E., Jacobs F.J., 2001. Disinfection of wooden structures contaminated with *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* spores. *Journal of Applied Microbiology.* 91(2):212–216.
- Durrer S., Schmid-Hempel P., 1994. Shared use of flowers leads to horizontal pathogen transmission. *Proceedings of Biological Sciences.* 258:299-302.
- Eckert J.E., 1947. Use of sulfa drugs in the treatment of American foulbrood disease of honeybees. *J. Econ. Entomol.* 40:41-44.
- Eijnde J. van den, Vette N., 1993. *Nosema* infection in honeybees (*Apis mellifera* L.) and bumblebees (*Bombus terrestris* L.). *Proceedings of Experimental and Applied Entomology.* N. E. V. Amsterdam, 4:205-208.
- Evans J.D., 2004. Transcriptional immune responses by honey bee larvae during invasion by the bacterial pathogen, *Paenibacillus larvae*. *J. Invertebr. Pathol.* 85(2):105-111.
- Evans J.D., Lopez D.L., 2004. Bacterial Probiotics induce an immune response in the honey bee (*Hymenoptera: Apidae*). *J. Econ. Entomol.* 97(3):752-756.
- Evans J.D., Armstrong T.N., 2005. Inhibition of the American foulbrood bacterium, *Paenibacillus larvae*, by bacteria isolated from honey bees. *J. Apic. Res.* 44(4):168-171.
- Faegri K., van der Pijl L., 1979. *The principles of pollination ecology.* Pergamon Press, Oxford, New York.
- Feldlaufer M., Pettis J.S., Kochansky J.P., Stiles G., 2001. Lincomycin hydrochloride for the control of American foulbrood disease of honey bees. *Apidologie.* 32(6):547–554.
- Fries I., de Ruijter A., Paxton R.J., Da Silva A.J., Slemenda S.B., Pieniazek N.J., 2001. Molecular characterization of *Nosema bombi* (*Microsporidia: Nosematidae*) and a note on its sites of infection in *Bombus terrestris* (*Hymenoptera: Apoidea*). *Journal of Apicultural Research.* 40:91-96.
- Fries I., Raina S., 2003. American foulbrood and African honey bees (*Hymenoptera: Apidae*). *J. Econ. Entomol.* 96(6):1641-1646.
- Genersch E., Forsgren E., Pentikäinen J., Ashiralieva A., Rauch S., Kilwinski J., Fries I., 2006. Reclassification of *Paenibacillus larvae* subsp. *pulvifaciens* and *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* as *Paenibacillus larvae* without subspecies differentiation. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56, 501–511.
- Genersch E., 2008. *Paenibacillus larvae* and American Foulbrood - long since known and still surprising. *Journal Für Verbraucherschutz Und Lebensmittelsicherheit-Journal of Consumer Protection and Food Safety.* 3:429-434.
- Genersch E., 2010. American Foulbrood in honeybees and its causative agent, *Paenibacillus larvae*. *Journal of Invertebrate Pathology.* 103(2010)S10–S19.
- Gordon R.E., Haynes W.C., Pang H.N., 1973. The Genus *Bacillus*. Agriculture Handbook No. 427. Washington, DC: U.S. Department of Agriculture.
- Gramacho K.P., Goncalves L.S., 2009. Sequential hygienic behavior in Carniolan honey bees (*Apis mellifera carnica*). *Genet. Mol. Res.* 8(2):655-663.
- Hansen H., Brodsgaard C.J., 1999. American foulbrood: a review of its biology, diagnosis and control. *Bee World.* 80, 5–23.

- Haseman L., Childers L.F., 1944. Controlling American foulbrood with sulfa drugs. *Univ. Missouri Agric. Exp. Sta. Bull.* 482:3-16.
- Haseman L., 1961. How long can spores of American foulbrood live? *Am. Bee J.* 101, 298–299.
- Heinrich B., 1979. *Bumblebee economics*. Harvard university press, Cambridge, Massachusetts.
- Higes M., Martín-Hernández R., Garrido-Bailón E., García-Palencia P., Meana A., 2008. Detection of infective *Nosema ceranae* (*Microsporidia*) spores in corbicular pollen of forager honeybees. *Journal of Invertebrate Pathology.* 97:76-78.
- Hitchcock J.D., Moffett J.O., Lockett J.J., Elliott J.R., 1970. Tylosin for control of American foulbrood disease in honey bees. *J. Econ. Entomol.* 63:204-207.
- Hitchcock J.D., Stoner A., Wilson W.T., Menapace D.M., 1979. Pathogenicity of *Bacillus pulvifaciens* to honeybee larvae of various ages (*Hymenoptera: Apidae*). *J. Kansas Entomol. Soc.* 52, 238–246.
- Hopingarner R., Nelson K., 1987. American foulbrood cleanup rate using three terramycin treatments. *Am. Bee J.* 128:120-121.
- Hornitzky M.A.Z., Clark S., 1991. Culture of *Bacillus larvae* from bulk honey samples for the detection of American foulbrood. *J. Apic. Res.* 30, 13–16.
- Hornitzky M.A.Z., 1998. The pathogenicity of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* spores and vegetative cells to honey bee (*Apis mellifera*) colonies and their susceptibility to royal jelly. *Journal of Apicultural Research.* 37(4): 267–271.
- Invernizzi C., Penagaricano F., Tomasco I.H., 2009. Intracolony genetic variability in honeybee larval resistance to chalkbrood and American foulbrood parasites. *Insectes Sociaux.* 56(3):233-240.
- Jie W., Wenjun P., Jiandong A., Zhanbao G., Yueming T., Jilian L., 2005. Techniques for year-round rearing of *Bombus terrestris* L. (*Hymenoptera, Apoidea*) in China 65. *Journal of Apicultural Science.* 49:65-69.
- Johnson J.P., 1948. Sulfa drugs for American foul brood of honeybees: Third Report. *Jour. Econ. Entomol.* 41(2):314-318.
- Katznelson H., 1950. *Bacillus pulvifaciens* (n. sp.), an organism associated with powdery scale of honeybee larvae. *J. Bacteriol.* 59:153–155.
- Katznelson H., 1950. The influence of antibiotics and sulpha drugs on *Bacillus larvae*, cause of American foulbrood of the honeybee, *in vitro* and *in vivo*. *J. Bacteriol.* 59:471-479.
- Katznelson H., 1956. Stability of antibiotics in honey. *Am. Bee J.* 96:137.
- Katznelson H., Gooderham C.B., 1949. Sulfathiazole in relation to American foulbrood. *Sci. Agric.* 32:180-184.
- Katznelson H., Jamieson C.A., Austin G.H., 1955. Further studies on the chemotherapy of diseases of the honeybee. *Can. J. Agric. Sci.* 35:189-192.
- Koch H., Schmid-Hempel P., 2011. Bacterial communities in central European bumblebees: Low diversity and high specificity. *Microbiological Ecology.* 62:121-133.

- Kochansky J., Knox D., Shimanuki H., 1999. Comparative stability of oxytetracycline and tylosin in sugar syrup. *Apidologie*. 30:321–326.
- Kochansky J., Knox D.A., Feldlaufer M., Pettis J.S., 2001. Screening alternative antibiotics against oxytetracycline-susceptible and -resistant *Paenibacillus larvae*. *Apidologie*. 32:215-222.
- Kochansky J.P., Pettis J.S., 2005. Screening additional antibiotics for efficacy against American foulbrood. *J. Apic. Res.* 44(1):24-28.
- Macfarlane R. P., Lipa J.J., Liu H.J., 1995. Bumble bee pathogens and internal enemies. *Bee World*. 76:130-148.
- Machova M., 1970. Variations de la sensibilité aux antibiotiques des souches de *Bacillus larvae*. *Bull. Apic.* 13:5-11.
- Martinson V. G., Danforth B. N., Minckley R. L., Rueppell O., Tingek S., Moran. N. A., 2011. A simple and distinctive microbiota associated with honey bees and bumble bees. *Molecular Ecology*. 20:619-628.
- Meeus I., Brown M.J.F., de Graaf D.C., Smagghe G., 2011. Effects of Invasive Parasites on Bumble Bee Declines. *Conservation Biology*. 25(4):662-671.
- Meeus I, Vercruyse V., Smagghe G. Molecular detection of *Spiroplasma apis* and *Spiroplasma melliferum* in bees. *Journal of Invertebrate Pathology*. (submitted)
- Michener C.D., 2007. *The Bees of the World*. The Johns Hopkins University press Baltimore and London.
- Miyagi T., Peng C.Y.S., Chuang R.Y., Mussen E.C., Spivak M.S., Doi R.H., 2000. Verification of oxytetracycline-resistant American foulbrood pathogen *Paenibacillus larvae* in the United States. *Journal of Invertebrates Pathology*. 75:95-96.
- Moffett J.O., Wilson W.T., Parker R.L. 1958. The effect of Penicel, tetracycline and erythromycin on adult bees, brood-rearing, and honey production. *Am. Bee J.* 98:22-24.
- Moffett J.O., Hitchcock J.D., Lockett J.J., Elliot J.R. 1970. Evaluation of some new compounds in controlling American foulbrood. *J. Apic. Res.* 9:39-44.
- Mutinelli F. 2003. Practical application of antibacterial drugs for the control of honey bee diseases. *Apiacta*. 38:149-155.
- Mutinelli F., 2011. The spread of pathogens through trade in honey bees and their products (including queen bees and semen): overview and recent developments. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* 30(1):257-271.
- OIE, 2010. Chapter 9.2. American foulbrood of honeybees. *Terrestrial Animal Health Code*. World Organisation for Animal Health (OIE). Available at : http://www.oie.int/index.php?id=169&L=0&htmfile=chapitre_1.9.2.htm.
- OIE, 2011. Chapter 2.2.2. American foulbrood of honeybees. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2011*. World Organisation for Animal Health (OIE). Available at : http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.02.02_AMERICAN_FOULBR_OOD.pdf.
- Okayama A., Sakogawa T., Nakajima C., Hayama T., 1996. Biological properties and antibiotic susceptibility of *Bacillus larvae* originated from American foulbrood of honeybee in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 58(5):439-41.

- Ortelli D., Edder P., Corvi C., 2004. Analysis of chloramphenicol residues in honey by liquid chromatography – tandem mass spectrometry. *Chromatographia*. 59(1-2):61-64.
- Oxley P.R., Spivak M., Oldroyd B.P., 2010. Six quantitative trait loci influence task thresholds for hygienic behavior in honeybees (*Apis mellifera*). *Mol. Ecol.* 19(7):1452-1461.
- Palmer K.A., Oldroyd B.P., 2003. Evidence for intra-colonial genetic variance in resistance to American foulbrood of honey bees (*Apis mellifera*): further support for the parasite/pathogen hypothesis for the evolution of polyandry. *Naturwissenschaften*. 90(6):265-268.
- Peng C.Y.S., Mussen E., Fong A., Cheng P., Wong G., Montague M.A., 1996. Laboratory and field studies on the effects of the antibiotic tylosin on honey bee *Apis mellifera* L. (*Hymenoptera: Apidae*) development and prevention of American foulbrood disease. *Invertebr. Pathol.* 67(1):65-71.
- Pettis J., Feldlaufer M., 2005. Efficacy of tylosin and lincomycin in controlling American foulbrood in honey bee colonies. *J. Apic. Res.* 44(3):106-108.
- Plischuk S., Martín-Hernández R., Prieto L., Lucía M., Botías C., Meana A., Abrahamovich A.H., Lange C., Higes M., 2009. South American native bumblebees (*Hymenoptera: Apidae*) infected by *Nosema ceranae* (*Microsporidia*), an emerging pathogen of honeybees (*Apis mellifera*) *Environmental Microbiology Reports*. 1:131-135.
- Raju B.C., Nyland G., Meikle T., Purcell A. H., 1981. Helical, motile mycoplasmas associated with flowers and honey bees in California. *Canadian Journal of Microbiology*. 27:249-253.
- Reinhardt J.F., 1947. The sulfathiazole cure of American foulbrood: an explanatory theory. *J. Econ. Entomol.* 40:45-48.
- Reybroeck W., 2010. Screening for residues of antibiotics and chemotherapeutics in milk and honey. Ph. D. Thesis. *Ghent University, Faculty of Veterinary Medicine*. 295 pp.
- Reybroeck W., Daeseleire E., De Brabander H.F., Herman L., 2012. Antimicrobials in beekeeping (review article). *Vet. Microbiol.* (accepted, in press).
- Reynaldi F.J., Albo G.N., Alippi A.M., 2008. Effectiveness of tilmicosin against *Paenibacillus larvae*, the causal agent of American foulbrood disease of honeybee. *Vet. Microbiol.* 132(1-2):119-128.
- Riessberger-Galle U., von der Ohe W., Crailsheim K., 2001. Adult honeybee's resistance against *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood. *J. Invertebr. Pathol.* 77(4):231-236.
- Röseler P.F., 1985. A technique for year-round rearing of *Bombus terrestris* (*Apidae, Bombini*) colonies in captivity. *Apidologie*. 16:165-170.
- Ruiz-Gonzalez M.X., Brown M.J.F., 2006. Honey bee and bumblebee trypanosomatids: specificity and potential for transmission. *Ecological Entomology*. 31:616-622.
- Shimanuki H., Knox D.A., 1994. Susceptibility of *Bacillus larvae* to Terramycin. *Am. Bee J.* 134: 125-126.
- Simone M., Evans J.D., Spivak M., 2009. Resin collection and social immunity in honey bees. *Evolution*. 63(11):3016-3022.
- Singh R., Levitt A.L., Rajotte E.G., Holmes E.C., Ostiguy N., vanEngelsdorp D., Ian Lipkin W., dePamphilis C.W., Toth A.L., Cox-Foster D.L., 2010. RNA viruses in hymenopteran pollinators: evidence of inter-taxa virus transmission via pollen and potential impact on non-*Apis* Hymenopteran species. *PLoS ONE*. 5(12): e14357. doi:10.1371/journal.pone.0014357.

- Spivak M., 2000. Preventive antibiotic treatments for honey bees. *Am. Bee J.* 140: 867-868.
- Spivak M., Reuter G.S., 2001. Resistance to American foulbrood disease by honey bee colonies *Apis mellifera* bred for hygienic behavior. *Apidologie.* 32(6):555-565.
- Velthuis H. H.W., van Doorn A., 2006. A century of advances in bumblebee domestication and the economic and environmental aspects of its commercialization for pollination. *Apidologie.* 37:421-451.
- Wedenig M., Riessberger-Galle U., Crailsheim K., 2003. A substance in honey bee larvae inhibits the growth of *Paenibacillus larvae larvae*. *Apidologie.* 34(1):43-51.
- Wilson W.T., 1971. Resistance to American foulbrood in honey bees XI. Fate of *Bacillus larvae* spores ingested by adults. *J. Invertebr. Pathol.* 17:247-255.
- Yue D., Nordhoff M., Wieler L.H., Genersch E., 2008. Fluorescence in situ hybridization (FISH) analysis of the interactions between honeybee larvae and *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood of honeybees (*Apis mellifera*). *Environmental Microbiology.* 10:1612-1620.

Membres du Comité scientifique

Le Comité scientifique est composé des membres suivants :

D. Berkvens, C. Bragard, E. Daeseleire, P. Delahaut, K. Dewettinck, J. Dewulf, L. De Zutter, K. Dierick, L. Herman, A. Huyghebaert, H. Imberechts, G. Maghuin-Rogister, L. Pussemier, K. Raes*, C. Saegerman, B. Schiffers, M.-L. Scippo*, W. Stevens*, E. Thiry, T. van den Berg, M. Uyttendaele, C. Van Peteghem

*Experts invités.

Remerciements

Le Comité scientifique remercie la Direction d'encadrement pour l'évaluation des risques et les membres du groupe de travail pour la préparation du projet d'avis. Le groupe de travail était composé de :

Membres du Comité scientifique	C. Saegerman (rapporteur), C. Bragard, H. Imberechts
Experts externes	D. de Graaf (UGent), B.K. Nguyen (GxABT), W. Reybroeck (ILVO), G. Smagghe (UGent)

Cadre juridique de l'avis

Loi du 4 février 2000 relative à la création de l'Agence fédérale pour la Sécurité de la Chaîne alimentaire, notamment l'article 8 ;

Arrêté royal du 19 mai 2000 relatif à la composition et au fonctionnement du Comité scientifique institué auprès de l'Agence fédérale pour la Sécurité de la Chaîne alimentaire ;

Règlement d'ordre intérieur visé à l'article 3 de l'arrêté royal du 19 mai 2000 relatif à la composition et au fonctionnement du Comité scientifique institué auprès de l'Agence fédérale pour la Sécurité de la Chaîne alimentaire, approuvé par le Ministre le 9 juin 2011.

Disclaimer

Le Comité scientifique conserve à tout moment le droit de modifier cet avis si de nouvelles informations et données arrivent à sa disposition après la publication de cette version.