

SOMMAIRE

Numéro – **idée principale pouvant motiver la lecture**

(premier auteur et al, année ; revue ; notoriété revue)

.....

1- Dis moi ce que tu manges, je te dirai quelle abeille tu es

(Barraud et al.; 2022; *Frontiers in Sustainable Food Systems*; IF 3,95)

2- Les biotechnologies et l'ARNi comme nouvelle piste de traitement contre *Varroa*

(Muntaabski et al.; 2022; *Journal of Apicultural Research*; IF 2,58)

3- L'odeur du sexe : une piste pour lutter contre le petit coléoptère de la ruche

(Papach et al.; 2022; *Journal of Apicultural Research*; IF 2,58)

4- Cold case : la disparition d'une souche virale de DWV en Egypte

(de Miranda et al.; 2022; *Virology Journal*; IF 4,10)

5- Gaz d'échappement des moteurs diesel : un cofacteur nuisible supplémentaire pour l'abeille

(Reitmayer et al.; 2022; *Environmental Pollution*; IF 8,07)

6- Détecter l'adultération du miel de manière non invasive

(Shao et al.; 2022; *Vibrational Spectroscopy*; IF 2,51)

7- Une étude sur un traitement printanier original à l'acide formique

(Căuia et al.; 2022; *Insects*; IF 2,77)

8- Des probiotiques pour prévenir les loques ?

(Pietropaoli et al.; 2022; *Applied Sciences*; IF 2,68)

9- *Apis mellifera* : à l'interface entre l'Homme et la santé des écosystèmes

(Papa et al.; 2022; *Biology*; IF 5,08)

10- Surveiller la loque américaine par le dénombrement des spores dans le miel ?

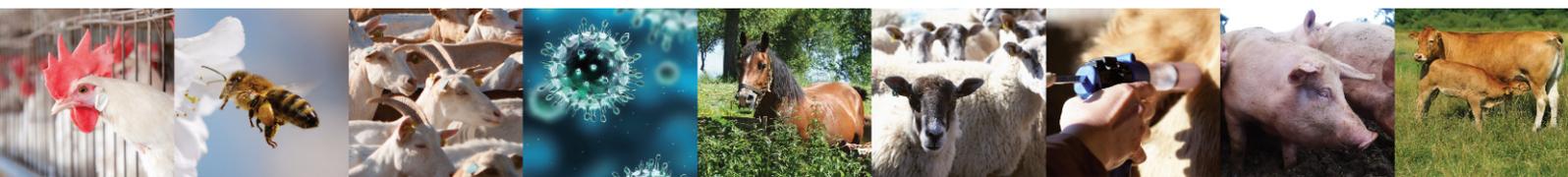
(Zabrodski et al.; 2022; *PLOS One*; IF 3,24)

.....

Ont collaboré à ce numéro : S. Boucher, M. L'Hostis, G. Therville, S. Hoffmann & Ch. Roy

Version anglaise : S. Hoffmann, Ch Roy & N. Vidal-Naquet

Attention : cette revue ne prétend pas être exhaustive et ne regroupe que des publications d'intérêts aux yeux des membres de la commission apicole SNGTV ; seules 10 publications par numéro sont ainsi retenues pour faire l'objet d'un focus.



1- Dis moi ce que tu manges, je te dirai quelle abeille tu es

Barraud, A., Barascou, L., Lefebvre, V., Sene, D., Le Conte, Y., Alaux, C., Grillenzoni, F.-V., Corvucci, F., Serra, G., Costa, C., Vanderplanck, M., Michez, D., 2022. Variations in Nutritional Requirements Across Bee Species. *Frontiers in Sustainable Food Systems* 6.

Résumé : Avec 2000 espèces actuellement recensées en Europe, les abeilles constituent un groupe d'insectes pollinisateurs très diversifié et efficace. Elles tirent leurs nutriments du nectar et du pollen des fleurs. Cependant, la composition chimique de ces ressources, en particulier du pollen (par exemple, la teneur en protéines, lipides, acides aminés, acides gras ou stéroïdes) est très variable selon les espèces végétales. S'il est bien connu que les abeilles présentent des variations interspécifiques dans leurs choix floraux, il existe un manque d'informations sur les besoins nutritionnels des différentes espèces d'abeilles. Nous avons donc développé des expériences originales dans des conditions de laboratoire pour évaluer les variations interspécifiques des besoins nutritionnels des abeilles. Nous avons analysé le contenu chimique de huit mélanges de pollen, différents en termes de concentration totale et de profils de protéines, lipides, acides aminés et stéroïdes. Chaque mélange de pollen a été fourni à quatre espèces d'abeilles modèles différentes : abeilles mellifères (*Apis mellifera*), bourdons (*Bombus terrestris*), abeilles maçonnes (*Osmia bicornis* et *Osmia cornuta*). Pour chaque espèce, des protocoles spécifiques ont été utilisés pour suivre leur développement (par exemple : le poids, la synchronisation, la survie) et la collecte des ressources. Dans l'ensemble, nous avons constaté que les besoins nutritionnels de ces espèces sont différents et qu'un régime alimentaire de faible qualité pour une espèce n'est pas nécessairement de faible qualité pour une autre. Alors que les abeilles domestiques sont négativement affectées par les régimes à haute teneur en protéines (env. 40 %), les bourdons et les abeilles maçonnes se développent normalement sur ces régimes mais luttent sur les régimes à faible teneur en acides aminés totaux et en stéroïdes, spécifiquement avec de faibles concentrations de 24-méthylènecholestérol et de β -sitostérol. Dans l'ensemble, notre étude soutient la nécessité de conserver et/ou d'introduire une diversité végétale dans les écosystèmes gérés afin de répondre aux préférences nutritionnelles naturelles des abeilles au niveau des espèces et des communautés.

Téléchargeable <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fsufs.2022.824750>

2- Les biotechnologies et l'ARNi comme nouvelle piste de traitement contre *Varroa*

Muntaabski, I., Scannapieco, A.C., Liendo, M.C., Niz, J.M., Russo, R., Salvador, R., 2022. Bacterially expressed dsRNA induces *Varroa destructor* gene knockdown by honey bee-mediated oral administration. *Journal of Apicultural Research*. <https://doi.org/10.1080/00218839.2022.2028967>

Résumé : L'ectoparasite *Varroa destructor* provoque de graves pertes de colonies d'*Apis mellifera* et a un impact négatif sur les filières apicoles du monde entier. De nouvelles méthodes de lutte ont été proposées, basées sur la technique de l'ARN interférent. Des études précédentes ont montré que les abeilles parasitées nourries avec de l'ARN double brin (ARNdb) synthétisé *in vitro* réduisent les niveaux de transcription de gènes cibles chez *Varroa*. Une alternative efficace et peu coûteuse pour produire des ARNdb est l'utilisation de bactéries (*E. coli*) capables d'atteindre des niveaux élevés de synthèse *in vivo*. Dans la présente étude, des ARNdb synthétisés *in vivo* ont été utilisés pour induire le silençage de gènes chez *V. destructor** et évaluer leurs effets sur la survie des abeilles domestiques et des acariens parasites *Varroa*. Les résultats ont montré que les ARNdb synthétisés donnés aux abeilles ont engendré une extinction des gènes chez les acariens, inhibant les niveaux d'expression des gènes cibles de 50 %. En effet, une réduction de 50 % de la survie des *Varroas* a été observée lorsque des ARNdb exprimés par des bactéries ont été administrés à des abeilles parasitées. Les abeilles ouvrières qui ont été nourries avec des ARNdb ciblés sur *Varroa* ont montré un taux de survie similaire aux abeilles témoins, nourries avec des solutions de saccharose ou d'ARNdb-GFP**. Nos résultats ont démontré que l'ARNdb spécifique surexprimé dans une bactérie est capable de réduire la survie des acariens après une administration orale aux abeilles. Cette étude fournit une méthode efficace et peu coûteuse pour la production d'ARNdb afin de contrôler les parasites et les maladies des abeilles mellifères.

* Gènes impliqués dans l'inhibition de l'apoptose, la synthèse d'une ARN polymérase et d'un canal Na/K chez *Varroa*. Ces ARNdb n'ont pas de séquences laissant penser qu'ils interfèrent avec des ARNm humains ou des abeilles.

** ARN double brin codant pour une protéine fluorescente verte (ici utilisé en tant qu'ARNdb d'un lot de témoin).

Non téléchargeable gratuitement

3- L'odeur du sexe : une piste pour lutter contre le petit coléoptère de la ruche

Papach, A., Balusu, R., Williams, G.R., Fadamiro, H.Y., Neumann, P., 2022. The smell of sex: cuticular hydrocarbons of adult small hive beetles, *Aethina tumida* (Coleoptera: Nitidulidae). Journal of Apicultural Research 0, 1–3. <https://doi.org/10.1080/00218839.2021.2015057>

Résumé : Les hydrocarbures cuticulaires (CHC) jouent un rôle olfactif clé dans l'accouplement des insectes, et peuvent donc être utilisés pour la lutte contre les parasites. Cependant, les profils des hydrocarbures cuticulaires des adultes du petit coléoptère de la ruche (PCR), *Aethina tumida*, sont actuellement inconnus, même si cette espèce invasive répandue menace l'agriculture et les populations d'abeilles sauvages. Nous montrons ici que les profils des CHC peuvent différer entre les mâles et les femelles du PCR, ainsi qu'entre leurs statuts d'accouplement. En laboratoire, les PCR ont été élevés individuellement puis maintenus seuls ou en groupes mixtes de mâles et de femelles jusqu'à la maturité sexuelle au 10ème jour. Ensuite, les profils des CHC ont été comparés entre les six groupes (femelles vierges 1 et 10 jours, femelles accouplées 10 jours, mâles vierges 1 et 10 jours, et mâles accouplés 10 jours). Les données montrent des profils de CHC largement homogènes, sans qu'aucune sous-position ne soit spécifique aux mâles. Cependant, l'Hexahydropyridine,1-méthyl-4-[4,5-dihydroxyphényl] n'a été détectée que chez les PCR femelles et la 2'-Hydroxypropionophénone dérivée du TMS (tétraméthylsilane) n'a été détectée que chez les femelles vierges de 10 jours. Le 5-Cyclohexyl-1-pentène a été trouvé exclusivement chez les coléoptères accouplés, indépendamment du sexe ou de l'âge. L'activité biologique de ces molécules candidates doit être confirmée. Étant donné qu'elles constituent des signaux olfactifs impliqués dans l'accouplement, elles offriraient une voie prometteuse pour la lutte durable contre le PCR, permettant pour la première fois de protéger également les populations d'abeilles sauvages.

Non téléchargeable gratuitement

4- Cold case : la disparition d'une souche virale de DWV en Egypte

de Miranda, J.R., Brettell, L.E., Chejanovsky, N., Childers, A.K., Dalmon, A., Deboutte, W. et al. , 2022. Cold case: The disappearance of Egypt bee virus, a fourth distinct master strain of deformed wing virus linked to honeybee mortality in 1970's Egypt. Virol J 19, 12. <https://doi.org/10.1186/s12985-022-01740-2>

Résumé : En 1977, on a découvert qu'un échantillon d'abeilles adultes infectées (*Apis mellifera*) en provenance d'Égypte contenait de grandes quantités d'un virus jusque-là inconnu, le virus Égyptien de l'abeille, qui s'est par la suite révélé être par typage sérologique lié au virus des ailes déformées (DWV). En séquençant l'isolat original, nous démontrons que le virus Égyptien de l'abeille est en fait un quatrième variant unique et majeur du DWV (DWV-D) : plus étroitement lié au DWV-C qu'au DWV-A ou au DWV-B. DWV-A et DWV-B sont les variants DWV les plus courants dans le monde en raison de leur relation étroite et de leur transmission par *Varroa destructor*. Cependant, nous n'avons pu trouver aucune trace du DWV-D dans plusieurs centaines de bibliothèques de séquençage d'ARN issues d'une sélection mondiale d'échantillons d'abeilles mellifères, de *Varroas* et de bourdons. Cela signifie que le DWV-D a soit disparu, soit été remplacé par d'autres variants du DWV mieux adaptés à la transmission par le *Varroa*, soit persiste uniquement dans une zone géographique ou une aire de répartition restreinte, isolée des voies de commerce communes des abeilles et des apiculteurs.

Téléchargeable <https://virology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12985-022-01740-2>

5- Gaz d'échappement des moteurs diesel : un cofacteur nuisible supplémentaire pour l'abeille

Reitmayer, C.M., Girling, R.D., Jackson, C.W., Newman, T.A., 2022. Repeated short-term exposure to diesel exhaust reduces honey bee colony fitness. Environmental Pollution 118934. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.118934>

Résumé : De nombreuses productions agricoles dépendent de la pollinisation et font appel aux abeilles mellifères (*Apis mellifera*). Les colonies peuvent être gérées et déplacées pour répondre aux exigences des systèmes productifs modernes de monoculture intensives. Une augmentation de la mortalité des colonies a été observée. Elle serait due à l'interaction de facteurs tels que l'exposition aux pesticides, aux parasites, aux virus, à l'intensification de l'agriculture et aux changements climatiques mondiaux et régionaux. Cependant, alors que les polluants atmosphériques troposphériques courants (par exemple, les oxydes d'azote, les particules, etc.) sont connus pour avoir une série d'effets négatifs sur la santé humaine, il existe peu de preuves de leur impact sur la santé d'*A. mellifera*. Cette étude s'intéresse aux effets de l'exposition aux gaz d'échappement des moteurs diesel sur *A. mellifera*, tant au niveau des butineuses individuelles qu'au niveau de la colonie entière. Nous avons exposé une série de colonies à des fumées d'échappement de diesel pendant deux heures par jour sur une période de trois semaines et avons comparé leurs performances à celles d'une série de colonies témoins situées sur le même site. Nous avons étudié les marqueurs de la santé neuronale dans le cerveau des butineuses et mesuré la prévalence de virus communs. Des compteurs électroniques ont suivi l'activité quotidienne de la colonie et des échantillons de pollen provenant des butineuses ont été analysés pour étudier la richesse et la diversité des espèces végétales récoltées. Les quantités de miel, de couvain et de pollen dans chaque colonie ont été mesurées régulièrement. Nous avons démontré une régulation positive de la protéine synaptique Neurexine 1 dans les cerveaux des butineuses exposées de façon répétée aux gaz d'échappement des moteurs diesel. De plus, nous avons constaté que les colonies exposées aux gaz d'échappement diesel perdaient du poids après la période d'exposition jusqu'à la fin de la saison estivale, tandis que les colonies témoins gagnaient du poids vers la fin de la saison. Des recherches supplémentaires sont nécessaires, mais nous supposons que de tels effets sur la santé des butineuses et de la colonie entière pourraient finalement contribuer aux pertes hivernales des colonies d'abeilles domestiques, en particulier en présence de facteurs de stress supplémentaires.

Non téléchargeable gratuitement

6- Détecter l'adultération du miel de manière non invasive

Shao, Y., Shi, Y., Xuan, G., Li, Q., Wang, F., Shi, C., Hu, Z., 2022. Hyperspectral imaging for non-destructive detection of honey adulteration. Vibrational Spectroscopy 103340. <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2022.103340>

Résumé : L'adultération du miel est susceptible d'entraîner de graves pertes économiques pour la filière et la présence de différents sirops dans les miels, en particulier, est difficile à détecter. Il ne fait aucun doute que la recherche scientifique sur la falsification du miel revêt une grande importance pour protéger le marché du miel et pour défendre les droits et intérêts légitimes des consommateurs. Des images hyperspectrales d'échantillons de miels purs et de miels adultérés ont été capturées à l'aide d'un système d'imagerie hyperspectrale (ou spectro-imagerie) (de 400 à 1000 nm). Dans cette étude, l'imagerie hyperspectrale et la chimométrie ont été combinées pour détecter l'adultération du miel et un modèle prédictif de l'adultération a été établi. Le miel pur a été mélangé à 0 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 30 % et 40 % d'adultérants (sirop de fructose et solution de saccharose). Une calibration par lot d'échantillons, entre les miels purs et les miels adultérés, a été réalisée. Dans un premier temps, les images hyperspectrales réalisées ont été interprétées par l'analyse en composantes principales (ACP) pour détecter la falsification du miel. A partir des longueurs d'onde obtenues, un modèle d'analyse des échantillons de miel pur et de miel adultéré a été établi. Les résultats ont montré que la précision de classification du modèle pour la falsification du miel était de 92,5 %, ce qui permet de détecter l'adultération. La régression par les moindres carrés partiels (PLSR) a été utilisée pour établir la prédiction du niveau d'adultération. La précision de validation de ce modèle était de 0,84 et l'erreur quadratique moyenne de 5,26 %. Par conséquent, nous considérons qu'il est possible de détecter l'adultération du miel par l'imagerie hyperspectrale. Cette méthode présente les avantages de la précision, de la simplicité et d'être écologique.

Téléchargeable <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924203122000078>

7- Une étude sur un traitement printanier original à l'acide formique

Căuia, E., Căuia, D., 2022. Improving the *Varroa* (*Varroa destructor*) Control Strategy by Brood Treatment with Formic Acid—A Pilot Study on Spring Applications. *Insects* 13, 149. <https://doi.org/10.3390/insects13020149>

Résumé : L'importance de la lutte contre la varroose de manière naturelle et durable est cruciale pour l'apiculture, compte tenu de l'impact du *Varroa* sur la santé des abeilles mellifères. Au cours des dernières années, nous avons mis au point un procédé très efficace pour traiter *Varroa* dans le couvain operculé en utilisant des acides organiques volatils. Cette procédure peut être appliquée à tout moment de la saison apicole car elle utilise des substances organiques. Compte tenu de la nécessité de réduire drastiquement le niveau d'infestation par le parasite dans les colonies avant l'élevage d'abeilles d'hiver, nous avons développé une étude pilote relativement simple pour tester préliminairement l'impact des traitements de printemps sur le niveau d'infestation de *Varroa* dans le couvain, à évaluer en été lorsque, naturellement, la population d'acariens augmente. Pour tester l'hypothèse, deux groupes traités expérimentalement et un groupe témoin ont été utilisés. Le traitement consistait à broser tout le couvain operculé avec de l'acide formique à une concentration de 65 % en une ou deux applications. Les résultats obtenus montrent des différences très significatives entre les groupes traités et les groupes témoins en termes de pourcentages de cellules infestées évaluées au cours de la période de juillet à août. Par conséquent, les traitements de printemps pourraient être un outil important pour limiter la multiplication des acariens, mais d'autres expériences sont nécessaires pour les tester et les adapter aux différentes conditions locales.

Téléchargeable https://mdpi-res.com/d_attachment/insects/insects-13-00149/article_deploy/insects-13-00149.pdf

8- Des probiotiques pour prévenir les loques ?

Pietropaoli, M., Carpana, E., Milito, M., Palazzetti, M., Guarducci, M., Croppi, S., Formato, G., 2022. Use of *Lactobacillus plantarum* in Preventing Clinical Cases of American and European Foulbrood in Central Italy. *Applied Sciences* 12. <https://doi.org/10.3390/app12031388>

Résumé : Les loques américaine et européenne sont considérées comme les maladies infectieuses des abeilles domestiques les plus contagieuses dans le monde. De nouvelles stratégies durables doivent être mises en place pour leur prévention et leur contrôle, et les probiotiques peuvent représenter une solution à explorer. Dans notre étude, nous avons évalué l'efficacité d'une souche de *Lactobacillus plantarum* isolée sur des abeilles saines du nord de l'Italie, administrée par voie orale aux abeilles pour prévenir les loques. De mars à septembre 2014, un total de 979 colonies d'abeilles (9,6 % de la province de Viterbe – Italie centrale) ont été suivies dans 22 ruchers. La prévalence globale de la loque américaine était de 5,3 % dans les colonies traitées et de 5,1 % dans les colonies non traitées (différence non significative). En revanche, la prévalence de la loque européenne était plus faible dans les colonies traitées (2,5 %) que dans celles non traitées (4,5 %). *L. plantarum* a montré un effet significatif dans la réduction de l'apparition de cas de loque européenne jusqu'à 35 jours après la fin du traitement (valeur p : 0,034). Cette étude dont le but était d'investiguer une éventuelle efficacité préventive de *L. plantarum* dans le contrôle des loques américaine et européenne a permis d'obtenir des données officielles sur leur prévalence clinique dans le centre de l'Italie.

Téléchargeable <https://www.mdpi.com/2076-3417/12/3/1388/pdf>

9- *Apis Mellifera* : à l'interface entre l'Homme et la santé des écosystèmes

Papa, G., Maier, R., Durazzo, A., Lucarini, M., Karabagias, I.K., Plutino, M., Bianchetto, E., Aromolo, R., Pignatti, G., Ambrogio, A., Pellicchia, M., Negri, I., 2022. The Honey Bee *Apis Mellifera*: An Insect at the Interface between Human and Ecosystem Health. *Biology* 11, 233. <https://doi.org/10.3390/biology11020233>

Résumé : Le concept de service écosystémique se comprend comme les services et avantages que les écosystèmes fournissent à l'Homme. Ils ont été classés en approvisionnement, régulation de l'écosystème et services culturels. Cet article vise à fournir un aperçu actualisé de ces avantages que l'Abeille mellifère, *Apis mellifera*, fournit à l'Homme ainsi qu'aux écosystèmes. Nous avons étudié le rôle de l'abeille comme pollinisateur dans les écosystèmes naturels pour préserver et restaurer la biodiversité locale des plantes sauvages ; dans les agroécosystèmes, cette espèce est largement utilisée pour améliorer le rendement et la qualité des cultures, et répondre à la demande alimentaire croissante. L'activité apicole fournit aux humains non seulement une nourriture de haute qualité mais aussi des substances utilisées comme matières premières dans les produits pharmaceutiques ; et dans les zones polluées, les abeilles transmettent des informations précieuses sur la présence de polluants dans l'environnement et leur impact sur l'humain et la santé de l'écosystème. Enfin, le rôle de l'abeille dans la tradition symbolique, la mystique et les valeurs culturelles des habitats des abeilles sont également présentées. Globalement, nous suggérons que la valeur symbolique de l'abeille est le rôle le plus important joué par cette espèce d'insecte, car elle peut aider à revitaliser et renforcer la relation intime et réciproque entre les humains et la nature, en évitant l'inexactitude de considérer les écosystèmes comme de simples fournisseurs de services à l'Homme.

Téléchargeable https://mdpi-res.com/d_attachment/biology/biology-11-00233/article_deploy/biology-11-00233-v2.pdf

10- Surveiller la loque américaine par le dénombrement des spores dans le miel ?

Zabrodski, M.W., DeBruyne, J.E., Wilson, G., Moshynskyy, I., Sharafi, M., Wood, S.C. et al., 2022. Comparison of individual hive and apiary-level sample types for spores of *Paenibacillus larvae* in Saskatchewan honey bee operations. *PLOS One* 17, e0263602. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0263602>

Résumé : Au cours de l'été 2019, trois exploitations apicoles professionnelles de la région du Saskatchewan au Canada, qui ont connu des foyers de loque américaine (LA) et une utilisation récente ou continue d'antibiotiques dans un but métaglyactique, ont été intensivement échantillonnées pour détecter la présence de spores de *Paenibacillus larvae*. Nous avons comparé les concentrations en spores dans différents types d'échantillons prélevés au sein de ruches individuelles, évalué l'intérêt d'échantillonner plutôt du miel collecté dans les hausses à la place du miel de corps ainsi que l'intérêt de prélèvements d'abeilles adultes dans les ruches. Nous avons aussi évalué la capacité d'un pool (miel extrait à partir de la production de plusieurs colonies) à refléter le degré de contamination en spores en le comparant aux données obtenues par les analyses individuelles. Nous avons échantillonné du miel et des abeilles provenant de ruches situées dans des ruchers présentant un cas récent et confirmé de loque américaine dans une seule ruche (ruchers index) et de ruchers ne présentant aucune preuve clinique de la présence de la loque américaine (ruchers non affectés). Nous avons également réalisé des échantillons de mélanges de miels, au niveau du rucher, issus de l'extraction de fin de saison, afin de les mettre en culture pour détecter et dénombrer les spores. Seules quelques ruches ont été fortement contaminées par des spores dans un rucher donné. Toutes les exploitations étaient différentes les unes des autres en ce qui concerne à la fois le degré global de contamination par les spores dans les ruchers et la distribution des spores entre les ruchers index et les ruchers non affectés. Au sein des trois exploitations, les concentrations de spores dans les ruches individuelles des ruchers non affectés étaient significativement différentes de celles des ruchers index en ce qui concerne les analyses des miels de corps, des miels de hausse et des abeilles adultes. Dans tous les cas, le miel de corps était le meilleur pour distinguer les ruchers index des ruchers non affectés ($p = 0,001$), suivi par le miel de hausse ($p = 0,06$) et les abeilles adultes ($p = 0,398$). Le dénombrement de spores dans le miel de hausse est positivement corrélé avec celui du miel de corps ($r_s = 0,76$, $p < 0,0001$) et celui des abeilles adultes ($r_s = 0,50$, $p < 0,0001$), ce qui suggère qu'ils peuvent être substitués les uns aux autres. Les concentrations en spores de *P. larvae* dans le miel extrait semblent avoir un potentiel prédictif de la contamination globale d'une exploitation apicole par les spores et peuvent avoir une valeur pronostique dans l'évaluation du risque de futurs foyers de loque américaine au niveau du rucher (ou de l'exploitation).

Téléchargeable <https://journals.plos.org/plosone/article/file?id=10.1371/journal.pone.0263602&type=printable>