



HAL
open science

Impact de la microsporidie *Nosema ceranae* et d'insecticides neurotoxiques sur la santé de l'abeille domestique (*Apis mellifera*)

Julie Aufauvre

► **To cite this version:**

Julie Aufauvre. Impact de la microsporidie *Nosema ceranae* et d'insecticides neurotoxiques sur la santé de l'abeille domestique (*Apis mellifera*). Sciences du Vivant [q-bio]. Université Blaise Pascal (Clermont Ferrand 2), 2013. Français. NNT : 2013CLF22427 . tel-02810315

HAL Id: tel-02810315

<https://hal.inrae.fr/tel-02810315>

Submitted on 6 Jun 2020

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

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



Distributed under a Creative Commons Attribution - ShareAlike 4.0 International License



Impact de la microsporidie *Nosema ceranae* et d'insecticides neurotoxiques sur la santé de l'abeille domestique (*Apis mellifera*)

Julie Aufauvre

► **To cite this version:**

Julie Aufauvre. Impact de la microsporidie *Nosema ceranae* et d'insecticides neurotoxiques sur la santé de l'abeille domestique (*Apis mellifera*). Sciences agricoles. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2013. Français. .

HAL Id: tel-00973858

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00973858>

Submitted on 4 Apr 2014

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

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

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE,
SANTÉ, AGRONOMIE, ENVIRONNEMENT

Thèse

Présentée à l'Université Blaise Pascal
pour l'obtention du grade de DOCTEUR D'UNIVERSITÉ

Spécialité : Physiologie et génétique moléculaires

Soutenue le 19 décembre 2013 par

Julie AUFAUVRE

**Impact de la microsporidie *Nosema ceranae* et d'insecticides
neurotoxiques sur la santé de l'abeille domestique (*Apis mellifera*)**

Membres du jury :

Rapporteurs :

M. Dominique FERRANDON, DR CNRS,
Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Strasbourg

M. Gérard ARNOLD, DR CNRS,
Laboratoire Évolution, Génome et Spéciation, Gif-sur-Yvette

Examineurs :

M. Jean-Marc BONMATIN, CR CNRS,
Centre de Biophysique Moléculaire, Orléans

M. Richard BONNET, PU-PH,
Service de Bactériologie, Mycologie et Parasitologie, CHU Clermont-Ferrand

Directeurs de thèse :

M. Nicolas BLOT, MCU, *LMGE, Clermont-Ferrand*

M. Bernard VIGUÈS, CR CNRS, *LMGE, Clermont-Ferrand*

RÉSUMÉ

Apis mellifera est un insecte pollinisateur jouant un rôle économique et écologique majeur. Depuis plus d'une vingtaine d'années, d'importantes pertes de colonies d'abeilles ont été recensées à l'échelle mondiale. L'origine de ce phénomène impliquerait de nombreux facteurs de stress qui pourraient en outre interagir entre eux. Ce travail de thèse a eu pour but d'évaluer l'impact sur la santé de l'abeille de l'association entre un facteur biotique, le parasite microsporidien *Nosema ceranae*, et un facteur abiotique, des insecticides neurotoxiques à faibles doses. Des études en laboratoire ont montré que l'association *N. ceranae*-insecticide entraîne une surmortalité significative, et plus précisément un effet synergique sur la mortalité des abeilles. Cet effet synergique semble indépendant de l'ordre d'exposition des abeilles aux deux facteurs de stress. De plus, lorsqu'ils ont été appliqués dès l'émergence des abeilles, ces facteurs ont eu un impact plus fort sur la mortalité. La réponse de l'abeille à *N. ceranae* et aux insecticides a ensuite été analysée à l'échelle transcriptomique. L'analyse du transcriptome de l'intestin a été réalisée en combinant une approche globale de séquençage à haut débit (RNA-Seq) et un suivi de l'expression d'une sélection de gènes par qRT-PCR. L'exposition à *N. ceranae* et aux insecticides a entraîné des modifications de l'expression de gènes impliqués dans les défenses de l'abeille (immunité, détoxification) et dans les métabolismes du tréhalose et de la chitine. De nombreuses perspectives à ce travail sont envisageables dans le but de mieux appréhender la réponse de l'abeille à différents facteurs de stress, notamment en combinant des expérimentations en laboratoire avec des études de terrain.

Mots-clés : *Apis mellifera*, *Nosema ceranae*, insecticides, interaction, synergie, transcriptome.

ABSTRACT

Apis mellifera is a pollinator insect playing of major economical and ecological importance. For more than two decades, severe honeybee colony losses have been reported worldwide. The origin of this phenomenon is thought to involve numerous stressors that could interact with each other. The objective of this work was to evaluate the impact on honeybee health of the association between a biotic stressor, namely the microsporidian parasite *Nosema ceranae*, and an abiotic stressor, here low doses of neurotoxic insecticides. Laboratory studies showed that the *N. ceranae*-insecticide association leads to a higher mortality in honeybees, and more precisely to a synergistic effect. This effect seemed to be independent of the exposure sequence to stressors. Moreover, when applied at the emergence of honeybees, these stressors had a higher impact on individuals' mortality. The honeybee response to *N. ceranae* and to insecticides has also been analysed at a transcriptional level. A midgut transcriptome analysis has been performed combining a global approach, using high-throughput sequencing (RNA-Seq), and a quantitative RT-PCR monitoring of the expression of selected genes. The exposure to *N. ceranae* and to insecticides led to modifications in the expression of genes involved in honeybee defenses (immunity, detoxification) and in trehalose and chitin metabolisms. Following this work, several prospects can be initiated in order to improve our understanding regarding the honeybee response to various stressors, combining laboratory experiments with field studies.

Key-words : *Apis mellifera*, *Nosema ceranae*, insecticides, interaction, synergy, transcriptome.

À mon père, qui m'a montré l'exemple il y a 17 ans
À ma mère, pour son soutien inconditionnel
À William, sans qui mon quotidien ne serait pas ce qu'il est

REMERCIEMENTS

Je souhaite avant toute chose remercier Dominique Ferrandon et Gérard Arnold pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail, ainsi que Jean-Marc Bonmatin et Richard Bonnet pour avoir également accepté de se joindre à mon jury de thèse.

Je remercie Frédéric Delbac, responsable de l'équipe Interactions Hôtes-Parasites pour m'avoir fait confiance et m'avoir permis de rejoindre l'équipe durant mes stages de Master 1 et de Master 2 et durant mon doctorat. J'ai énormément appris scientifiquement avec toi que ce soit en cours (sans conteste, les meilleurs cours de toute ma scolarité) ou au laboratoire.

Un merci très chaleureux à Nicolas Blot, mon directeur de thèse, pour sa disponibilité incomparable. Merci aussi pour tous les conseils que tu m'as donnés et qui m'ont fait avancer. Je garderai en mémoire beaucoup de moments sympathiques passés avec toi, notamment en Bretagne, en Allemagne et même en Ukraine !! Dommage que je ne puisse pas t'emmener dans ma valise pour partir en post-doc et y travailler avec toi !

Merci à Gus, alias Bernard Vigùès, mon deuxième directeur de thèse, pour tes nombreux conseils avisés et toujours très bien argumentés, pour les discussions très intéressantes que nous avons eues ensemble et pour ton trait d'humour toujours présents dans tes e-mails.

Je remercie également celles et ceux qui ont toujours accepté, avec le sourire, de donner un coup de main lorsqu'il fallait infecter je-ne-sais-combien-d'abeilles individuellement ; et plus généralement, tous les membres de l'équipe Interactions Hôtes-Parasites pour les moments passés ensemble.

Merci aux amibes, Mathieu, Pierre et Mumu, pour votre bonne humeur ! Cette thèse n'aurait pas été la même sans vous dans les parages. Merci pour les nombreux souvenirs que je garderai en tête : bars, restos, matchs de l'ASM au stade Marcel Michelin, week-ends à Saint-Julien Chapteuil, festival Musilac, soirées jeux de société, mariage, concerts, sans oublier le week-end à Porto pour prendre un peu le soleil avant les longues semaines de rédaction. De tout cœur, j'espère qu'il y en aura plein d'autres !

Merci à Régis et à Mélanie, pour les très bons moments passés ensemble au LMGE mais surtout en dehors ! Avec vous, j'ai réellement eu les discussions les plus variées et les plus insolites de toute ma vie et c'est vraiment quelque chose qui va beaucoup me manquer. Je trouve qu'on faisait un super trio et j'aurai toujours le sourire en repensant aux soirées passées aux Dos Hermanos.

Merci à toute la famille et plus particulièrement à Maman et à Papa, pour votre soutien, vos paroles réconfortantes, et tout simplement pour votre amour. Tous les enfants devraient avoir la chance d'avoir des parents comme vous. Et puis merci à Germaine, alias Mémé, pour ta faculté à toujours voir le bon côté des choses et pour toutes les gourmandises que tu nous prépares.

Et le dernier grand merci va à mon William ! Toujours ensemble après la rédaction simultanée de deux thèses, je crois que c'est bon signe ! Je suis certaine d'une chose, c'est que je n'aurais pas vécu cette fin de thèse de la même façon si tu n'avais pas été là. Merci pour le réconfort que tu m'apportes, pour ton écoute et ton soutien ainsi que pour toutes les petites attentions qui rendent le quotidien avec toi si agréable. Moi, je dis : "Longue vie à nous deux" :)

"L'important n'est pas de convaincre, mais de donner à réfléchir."

-Bernard Werber-

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE 1 : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	6
1. Le déclin de l'abeille mellifère <i>Apis mellifera</i>	7
1.1. Abeille mellifère et enjeux de la pollinisation	7
1.2. Pertes de colonies d'abeilles	9
1.3. Origine multifactorielle des pertes de colonies.....	10
1.3.1. Climat, paysages et ressources	10
1.3.2. Contaminations anthropogéniques	11
1.3.3. Agents pathogènes.....	11
1.3.4. Un nouveau prédateur	12
1.3.5. Interactions entre facteurs de stress	13
2. Exposition des abeilles à des insecticides neurotoxiques	14
2.1. Nouvelles classes d'insecticides neurotoxiques.....	14
2.1.1. La classe des néonicotinoïdes	15
2.1.2. La classe des phénylpyrazoles	16
2.2. Exposition de l'abeille mellifère : de la plante à la ruche.....	16
2.2.1. Des pesticides présents dans l'ensemble de la plante.....	17
2.2.2. Contamination des matrices de la ruche.....	18
2.2.2.1. Contamination par de multiples résidus	19
2.2.2.2. Contamination et pratiques agricoles	20
2.3. Impact des insecticides neurotoxiques sur l'abeille.....	21
2.3.1. Évaluation de la toxicité des pesticides envers l'abeille domestique	21
2.3.2. Effets des insecticides sur la cognition des abeilles	22
2.3.3. Effets des insecticides sur l'activité de butinage	24
2.3.4. Effets des insecticides sur la physiologie de l'abeille.....	26
2.3.5. Effets des insecticides sur le développement larvaire.....	26

2.3.6. Immunotoxicité des pesticides	27
2.3.7. Impact de doses considérées comme sublétales sur la mortalité des abeilles	28
2.4. Mécanismes de détoxification chez l'abeille domestique	29
2.4.1. Les trois phases de la détoxification	29
2.4.2. La détoxification chez l'abeille	29
3. Le parasite microsporidien <i>Nosema ceranae</i>	30
3.1. Les microsporidies	30
3.1.1. Une phylogénie encore controversée	31
3.1.2. Cycle de vie	31
3.1.3. Les génomes microsporidiens reflètent une forte dépendance envers leur hôte.....	34
3.2. L'infection des colonies d' <i>Apis mellifera</i> par <i>N. ceranae</i>	36
3.2.1. Deux espèces microsporidiennes, <i>N. ceranae</i> et <i>N. apis</i> , infectent l'abeille	36
3.2.2. <i>N. ceranae</i> est désormais l'espèce microsporidienne prédominante dans les colonies d' <i>A. mellifera</i>	37
3.2.3. Les voies de transmission de <i>N. ceranae</i> chez <i>A. mellifera</i>	37
3.2.4. Facteurs influençant le développement de l'infection par <i>N. ceranae</i> dans la colonie	38
3.2.5. Traitement contre la nosérose	39
3.3. Effet de l'infection par <i>N. ceranae</i> sur l'abeille domestique	40
3.3.1. Effet sur l'état nutritionnel et énergétique de l'abeille	40
3.3.2. Effet sur l'activité de butinage	41
3.3.3. Effet sur la production d'hormones et de phéromones chez l'abeille.....	42
3.3.4. Effet sur l'épithélium intestinal de l'abeille.....	43
3.3.5. Effet sur la survie de l'abeille	44
3.4. Rôle de <i>N. ceranae</i> dans l'effondrement des colonies d'abeilles	45
3.5. Les mécanismes de défense de l'abeille	46
3.5.1. La réponse immunitaire à l'échelle de l'individu	46
3.5.2. La réponse immunitaire à l'échelle de la colonie.....	51

CHAPITRE 2 : IMPACT DE L'ASSOCIATION <i>NOSEMA CERANAE</i>-INSECTICIDE SUR LA SURVIE DE L'ABEILLE MELLIFÈRE.....	54
Introduction.....	55
CHAPITRE 3 : RÉPONSE TRANSCRIPTOMIQUE DE L'ABEILLE À <i>NOSEMA CERANAE</i> ET AUX INSECTICIDES	73
Introduction.....	74
CHAPITRE 4 : CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	99
1. Surmortalité des abeilles exposées à une combinaison <i>N. ceranae</i> -insecticides	100
2. Réponse de l'abeille à <i>N. ceranae</i> et aux insecticides	102
3. La multiplicité des facteurs de stress accroît les possibilités d'interactions	105
RÉFÉRENCES.....	107
ANNEXE.....	127

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ABC	ATP binding cassette
ABPV	acute bee paralysis virus
ACh	acétylcholine
AChE	acétylcholinestérase
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
AMP	antimicrobial peptide
ANR	agence nationale de la recherche
ANSES	agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
ARNr	acide ribonucléique ribosomique
ARNm	acide ribonucléique messenger
ATP	adénosine triphosphate
BQCV	black queen cell virus
C	cytosine
CCE	carboxyl/cholinestérase
CO ₂	dioxyde de carbone
CS	conditioned stimulus
CYP	cytochrome P450
DDT	dichlorodiphényltrichloroéthane
DL50	dose létale 50 %
DWV	deformed wing virus
G	guanine
GABA	acide γ -amino-butérique
GST	glutathion-S-transférase
IAPV	Israel acute paralysis virus
IPM	integrated pest management
JH	juvenile hormone
KBV	Kashmir bee virus
Mb	mégabase : 1 Mb = 1 million de paires de bases
MRP	multidrug resistance-associated protein
nAChR	récepteurs nicotiques à l'acétylcholine
OEPP	organisation européenne et méditerranéenne pour la protection des plantes
PAM	peptide antimicrobien
PCR	polymerase chain reaction
PER	proboscis extension reflex
PGRP	peptidoglycan-recognition protein
PO	phénoloxydase
qRT-PCR	PCR quantitative en temps réel
RFID	radio frequency identification
RNAi	RNA interference
RNA-Seq	RNA-sequencing
ROS	reactive oxygen species
SBV	sacbrood virus
SIDA	syndrome de l'immunodéficience acquise
US	unconditioned stimulus
Vg	vitellogénine
Wg	voie de signalisation Wingless

INTRODUCTION

L'abeille mellifère *Apis mellifera* fait partie des espèces pollinisatrices animales majeures et joue un rôle écologique et économique significatif (Klein *et al.*, 2007; Gallai *et al.*, 2009). Depuis plusieurs dizaines d'années, des déclin dans les populations d'abeilles domestiques et d'autres insectes pollinisateurs ont été rapportés à l'échelle mondiale (Biesmeijer *et al.*, 2006; Goulson *et al.*, 2008; Potts *et al.*, 2010; Cameron *et al.*, 2011) avec d'importantes diminutions du cheptel en Europe et aux États-Unis durant la deuxième moitié du XXème siècle (vanEngelsdorp & Meixner, 2010; Levy, 2011). De nombreux facteurs environnementaux peuvent affecter la santé de l'abeille et donc être potentiellement à l'origine de ces pertes. L'abeille doit en effet faire face aux modifications climatiques et paysagères, et à une multitude de contaminations chimiques et d'agents pathogènes. Or, à ce jour, aucun de ces facteurs n'explique à lui seul l'ampleur des pertes de colonies rapportées qui auraient plutôt pour origine l'action combinée de différents facteurs de stress (vanEngelsdorp *et al.*, 2009, 2010; Neumann & Carreck, 2010; Potts *et al.*, 2010). L'objectif de cette thèse s'inscrit dans ce contexte et vise à évaluer l'impact de l'interaction entre deux facteurs environnementaux, d'origines biotique et abiotique, sur la santé de l'abeille mellifère.

Le facteur abiotique a été choisi parmi les pesticides auxquels l'abeille est fréquemment exposée au sein de la colonie. Les insecticides neurotoxiques appartenant aux familles des néonicotinoïdes (imidaclopride et thiaclopride) et des phénylpyrazoles (fipronil) sont couramment utilisés pour le traitement des cultures agricoles (Jeschke *et al.*, 2011). Les abeilles peuvent rentrer en contact avec ces molécules lors de leur activité de butinage puisque les parties florales, comme le pollen ou le nectar, des plants traités peuvent être contaminées par ces insecticides (Schmuck *et al.*, 2001; Bonmatin *et al.*, 2003, 2005; Aajoud *et al.*, 2008). En conséquence, de faibles concentrations de divers insecticides sont très fréquemment mesurées à l'intérieur des colonies (Chauzat *et al.*, 2006, 2009; Mullin *et al.*, 2010; Lambert *et al.*, 2013). L'exposition des abeilles à ces faibles concentrations d'insecticides peut entraîner des effets sublétaux, notamment sur le comportement et la physiologie des individus (Desneux *et al.*, 2007; Belzunces *et al.*, 2012). De plus, l'exposition prolongée, donc chronique, à ces concentrations peut parfois s'avérer létale en augmentant significativement la mortalité des abeilles (Suchail *et al.*, 2001; Decourtye *et al.*, 2005; Aliouane *et al.*, 2009).

Le parasite *Nosema ceranae* a été choisi comme facteur biotique pour ce travail de thèse. Cette microsporidie est un parasite intracellulaire obligatoire se développant dans les cellules de l'épithélium intestinal de l'abeille. Il s'agit d'un parasite émergent qui présente une distribution mondiale et une forte prévalence au sein des colonies d'abeilles (Klee *et al.*, 2007; Chaimanee *et al.*, 2010; Stevanovic *et al.*, 2010; Botías *et al.*, 2012b). Les données concernant l'impact de ce parasite sur l'abeille mellifère sont relativement récentes mais ont mis en évidence un effet de l'infection sur l'état nutritionnel et énergétique, sur l'activité de butinage et sur la production d'hormones et de phéromones de l'hôte. En revanche, l'impact de *N. ceranae* sur la survie des abeilles est difficile à

appréhender en raison de la nature contradictoire des données disponibles (Paxton *et al.*, 2007; Higes *et al.*, 2008a; Alaux *et al.*, 2010a; Dussaubat *et al.*, 2012, 2013b). La virulence de ce parasite semble ainsi dépendre de facteurs variés et pourrait notamment être influencée par des facteurs environnementaux.

Le premier objectif de cette thèse a été d'évaluer l'impact de ces facteurs biotique et abiotique, appliqués seuls ou en combinaison, sur la survie des abeilles. Deux études consécutives ont permis de déterminer que la combinaison de ces deux facteurs entraînait un effet synergique sur la mortalité des abeilles. L'importance de l'ordre d'exposition des abeilles à ces facteurs a également été analysée et nous avons pu démontrer que la séquence d'exposition n'avait pas d'influence sur la synergie. Ces études ont également permis d'observer un impact variable des facteurs en fonction de l'âge de l'abeille, puisqu'ils semblent affecter plus lourdement la mortalité des abeilles exposées dès leur émergence. Dans un second temps et pour mieux comprendre les raisons de la surmortalité induite par l'association *N. ceranae*-insecticide, nous nous sommes intéressés à la réponse de l'abeille exposée à ces deux facteurs. Cette étude s'est focalisée sur l'analyse du transcriptome de l'intestin de l'abeille en combinant une approche globale de séquençage à haut débit, dite de RNA-Seq, et l'analyse de l'expression d'une sélection de gènes par RT-qPCR. Ce travail a permis d'identifier des gènes de l'abeille dont l'expression est significativement affectée en réponse à *N. ceranae* seul, à l'insecticide seul ou à l'association *N. ceranae*-insecticide.

Ces travaux ont donné lieu aux publications et aux communications suivantes :

PUBLICATIONS

Vidau C, Diogon M, **Aufauvre J**, Fontbonne R, Viguès B, Brunet JL, Texier C, Biron DG, Blot N, El Alaoui H, Belzunces LP, Delbac F. Exposure to sublethal doses of Fipronil and Thiacloprid highly increases mortality of honeybees previously infected by *Nosema ceranae*. PLoS ONE (2011) 6(6): e21550.

Vidau C, Diogon M, **Aufauvre J**, Fontbonne R, Viguès B, Brunet JL, Texier C, Biron DG, Blot N, El Alaoui H, Belzunces LP, Delbac F. Déclin des colonies d'abeilles et origine multifactorielle : cas de *Nosema ceranae* et des insecticides. La Santé de l'abeille (2011) 245, 9-10 : 417-426.

Aufauvre J, Biron DG, Vidau C, Fontbonne R, Roudel M, Diogon M, Viguès B, Belzunces LP, Delbac F, Blot N. Parasite-insecticide interactions: a case study of *Nosema ceranae* and Fipronil synergy on honeybee. *Scientific Reports* (2012) 2:326.

Aufauvre J, Viguès B, Delbac F, Blot N. Transcriptome analysis of the honeybee response to *Nosema ceranae* and insecticides. *PLoS ONE*, *in prep*.

COMMUNICATIONS ORALES

Aufauvre J, Fontbonne R, Roudel M, Vidau C, Diogon M, Pointcloux D, El Alaoui H, Texier C, Viguès B, Blot N, Delbac F. Impact of pesticides on the virulence of *Nosema ceranae*, an emerging parasite of the honeybee *Apis mellifera*. Workshop “Standardized methods for honeybee rearing in hoarding cages”, Bologna, Italie, 25-26 novembre 2010.

Aufauvre J, Vidau C, Diogon M, Fontbonne R, Viguès B, Texier C, Biron DG, Blot N, El Alaoui H, Delbac F. Mortalité des abeilles: interactions entre de faibles doses d’insecticides et le parasite microsporidien *Nosema ceranae*. Journées Thématiques du Groupement des protistologues de Langue Française (GPLF), Clermont-Ferrand, France, 24-25 octobre 2011.

Aufauvre J, Biron DG, Vidau C, Fontbonne R, Roudel M, Diogon M, Viguès B, Belzunces LP, Delbac F, Blot N. Interaction synergique entre le parasite *Nosema ceranae* et l’insecticide Fipronil chez l’abeille domestique. Journée Scientifique Apicole, Nantes, France, 7 juin 2012.

Aufauvre J, Biron DG, Vidau C, Fontbonne R, Roudel M, Diogon M, Viguès B, Belzunces LP, Delbac F, Blot N. Parasite-insecticide interactions: a case study of *Nosema ceranae* and Fipronil synergy on honeybee. 5th European Conference of Apidology (EurBee 5), Halle an der Saale, Allemagne, 3-7 septembre 2012.

Aufauvre J, Viguès B, Delbac F, Blot N. Interactions entre le parasite microsporidien *Nosema ceranae* et l’insecticide Fipronil chez l’abeille *Apis mellifera*. Journée des doctorants du LMGE, Clermont-Ferrand, France, 7 décembre 2012.

Aufauvre J, Viguès B, Delbac F, Blot N. Interactions between the parasite *Nosema ceranae* and neurotoxic insecticides in *Apis mellifera*. XXXXIII International Apimondia Congress, Kyiv, Ukraine, 29 septembre - 4 octobre 2013.

CHAPITRE 1

ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

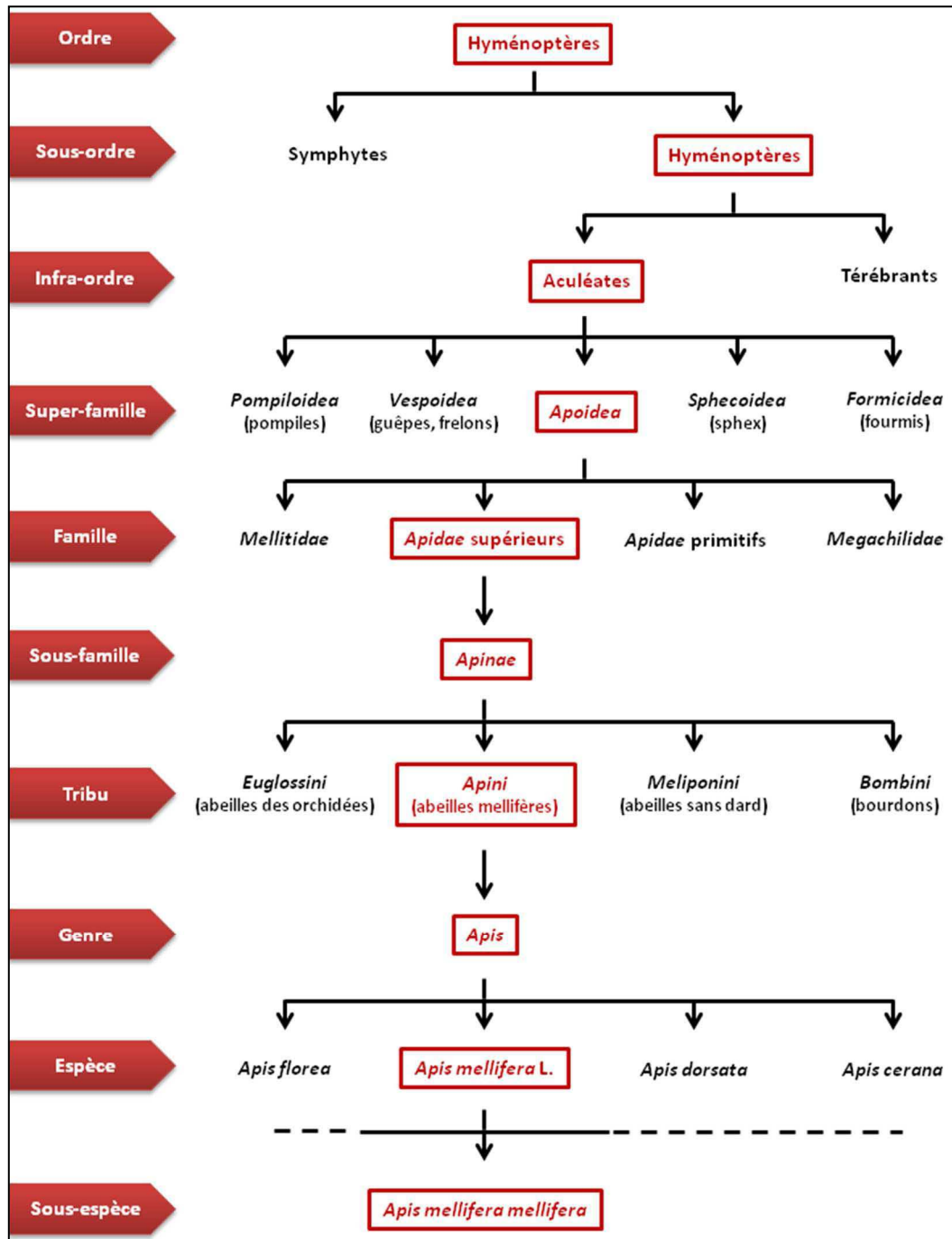


Figure 1. Classification systématique des abeilles mellifères (d'après Le Conte, 2002).

Les abeilles sont des Arthropodes appartenant à la classe des insectes. Elles font partie de l'ordre des Hyménoptères caractérisé par la présence de deux paires d'ailes membraneuses transparentes, de tailles inégales et réunies par une série de crochets. Parmi les Apocrites, hyménoptères dont l'abdomen est séparé du thorax par un étranglement, certains individus femelles possèdent un aiguillon caractérisant le sous-ordre des Aculéates. Les Aculéates regroupent les super-familles des *Apoidea* (abeilles), des *Formicoidea* (fourmis) et des *Vespoidea* (guêpes et frelons). Les *Apoidea* ont une cuticule poilue, sont caractérisés par un appareil pour la récolte de pollen, d'une langue développée et d'une alimentation à base de nectar et de pollen. Les abeilles vivant en groupe et possédant une forme de socialité sont des *Apoidea* supérieurs dont fait partie la sous-famille des *Apinae* regroupant l'ensemble des abeilles à corbeilles. Parmi les *Apinae*, la tribu des *Apini* comprend un unique genre, *Apis*, représenté par les abeilles dites mellifères, réparties en neuf espèces distinctes dont l'abeille européenne *Apis mellifera* Linnaeus. L'espèce *Apis mellifera* L. a évolué en plus d'une vingtaine de sous-espèces interfécondes.

1. Le déclin de l'abeille mellifère *Apis mellifera*

Depuis déjà plus d'une vingtaine d'années, des pertes importantes de colonies d'abeilles domestiques sont rapportées dans le monde entier. Ces pertes représentent un problème pour l'apiculture, l'agriculture et la biodiversité de par le rôle de pollinisateur majeur que tiennent ces insectes. L'origine de ces pertes reste encore mal connue et implique très probablement de multiples facteurs de stress.

1.1. Abeille mellifère et enjeux de la pollinisation

Les abeilles sont des insectes de l'ordre des Hyménoptères. Le genre *Apis* représente les abeilles dites mellifères, réparties en neuf espèces distinctes dont l'abeille européenne *Apis mellifera* Linnaeus (Figure 1) (Le Conte, 2002). Sous l'influence des conditions environnementales (climat, biogéographie, végétation) et en fonction de ses voies d'expansion, *Apis mellifera* a évolué en plus d'une vingtaine de sous-espèces différentes. La biologie de l'abeille, ses adaptations anatomiques, son cycle de vie, ainsi que son polyéthisme de caste et d'âge (spécialisation du travail d'un individu en fonction de son âge et/ou de sa morphologie) sont relativement bien connus et documentés dans des ouvrages spécialisés comme von Frisch K (1969) *Vie et mœurs des abeilles*. Albin Michel, Paris, 250 p ; Winston M L (1987) *The biology of the honey bee*. Harvard University Press, États-Unis, 294 p ; Goodman L J (2003) *Form and function in the honey bee*. IBRA, Cardiff, 220 p ; Tautz J (2009) *L'étonnante abeille*. De Boeck, Bruxelles, 278 p. L'abeille mellifère, d'origine européenne, est capable de collecter de grandes quantités de ressources alimentaires en peu de temps et de les stocker dans la ruche pour survivre aux mois d'hiver. Ceci explique les capacités d'*A. mellifera* à produire d'importants rendements en miel et pourquoi cette espèce a été choisie et domestiquée par l'Homme (Le Conte & Navajas, 2008). La domestication d'*A. mellifera* a permis une distribution mondiale de l'espèce qui est actuellement retrouvée en Asie, en Europe, en Afrique, en Amérique et en Océanie dans des climats très divers (Winston, 1987; Le Conte & Navajas, 2008). De plus, la population globale d'*A. mellifera* s'est considérablement accrue suite à l'augmentation de 45 % du nombre de colonies dans le monde au cours de la deuxième moitié du XXème siècle (Aizen & Harder, 2009). Ainsi, le nombre total de colonies d'abeilles domestiques dans le monde a été estimé à 72,6 millions en 2007 (vanEngelsdorp & Meixner, 2010). L'abeille, l'état sanitaire des colonies ainsi que les ressources alimentaires stockées peuvent servir de bio-indicateurs de la qualité de l'environnement (Balayiannis & Balayiannis, 2008; Tautz, 2009; Hilmi *et al.*, 2012). En effet, les poils recouvrant le corps des abeilles permettent de collecter diverses particules et substances avec lesquelles elles rentrent en contact (Hilmi *et al.*, 2012). De plus, ces organismes apparaissent sensibles à de nombreux

produits utilisés pour la protection des plantes, et leur taux de mortalité peut parfois refléter l'exposition à certaines de ces molécules. Enfin, leurs vols de butinage effectués sur de larges aires leur permettent de récolter par inadvertance divers résidus xénobiotiques qui pourront ensuite se retrouver dans leur corps et dans les différentes matrices de la ruche.

Les insectes pollinisateurs, dont font partie les abeilles, et les plantes à fleurs (angiospermes) partagent une longue histoire évolutive. Plantes et abeilles s'apportent des bénéfices réciproques au travers du mutualisme qui les unit. Par exemple, les abeilles dépendent des plantes à fleurs qui leur fournissent leurs principales sources de nourriture, le pollen et le nectar, ainsi que des matières premières utilisées pour la fabrication de cire et de propolis. À travers leur activité de butinage, les abeilles sont aussi les principaux pollinisateurs de la plupart des plantes sauvages et agricoles. Plus de 308 000 espèces d'angiospermes sont en effet pollinisées par des insectes ou par d'autres animaux, ce qui représente 87 % de l'ensemble des plantes à fleurs (Ollerton *et al.*, 2011). Ceci reflète le rôle écologique majeur que jouent les pollinisateurs dans le maintien de la biodiversité. À l'échelle humaine, les services rendus par les pollinisateurs sont également conséquents puisque 70 % des cultures agricoles destinées à la consommation humaine dépendent des pollinisateurs (Klein *et al.*, 2007). Les données sont plus contrastées lorsque l'on considère les volumes de production agricole, 60 % de la production globale provient en effet de cultures qui ne dépendent pas de la pollinisation animale. Il n'en reste pas moins que 35 % de la production agricole que nous consommons provient de cultures dépendantes de cette activité de pollinisation. La pollinisation par les insectes contribue également à l'obtention de plus hauts rendements de semences et à une production de meilleure qualité comme cela a pu être démontré pour le colza (Bommarco *et al.*, 2012). Ces données soulignent également l'importance économique des insectes pollinisateurs. La valeur de la pollinisation par les insectes a ainsi été estimée à 153 milliards d'euros par an, ce qui représente près de 10 % de la valeur de la production agricole mondiale (Gallai *et al.*, 2009).

L'abeille européenne *Apis mellifera* possède des caractéristiques particulières qui en font un pollinisateur majeur. Élevées en colonies pouvant atteindre plusieurs dizaines de milliers d'individus, les abeilles domestiques constituent une force de travail colossale pouvant être stimulée par les apiculteurs voire transportées sur de longues distances jusqu'à des sites de pollinisation stratégiques. À titre d'exemple, une butineuse à elle seule peut visiter entre 50 et 1000 fleurs en un seul vol de butinage et effectuer entre 7 et 14 vols par jour (Hilmi *et al.*, 2012). De plus, ces abeilles sont dites « généralistes » car visitant un large spectre de fleurs et elles sont capables de communiquer efficacement la localisation des ressources florales à leurs congénères au travers de leur célèbre danse (Tautz, 2009; vanEngelsdorp & Meixner, 2010).

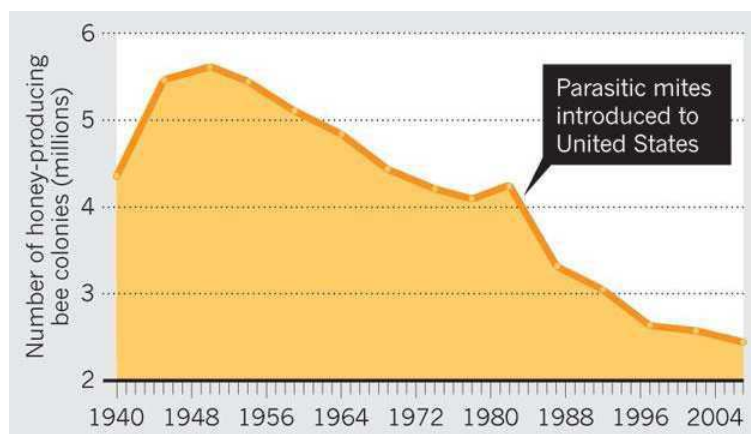


Figure 2. Évolution du nombre de colonies d’abeilles aux États-Unis (Levy, 2011).

Au cours de la deuxième moitié du XXème siècle, le nombre de colonies d’abeilles a été quasiment divisé par deux aux États-Unis.

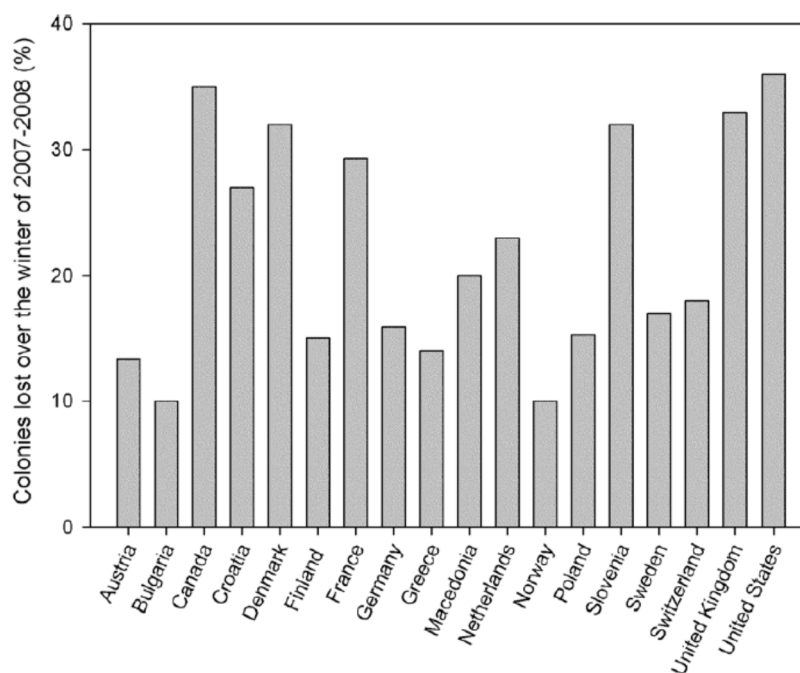


Figure 3. Pertes de colonies enregistrées durant l’hiver 2007-2008 dans différents pays (vanEngelsdorp et Meixner, 2010).

Les pertes de colonies observées à la fin de l’hiver 2007-2008 fluctuaient entre 10 % de pertes en Norvège et 36 % de pertes aux États-Unis. Les pertes hivernales sont donc d’amplieurs très variables en fonction du pays considéré.

1.2. Pertes de colonies d'abeilles

Le devenir des insectes pollinisateurs préoccupe actuellement la communauté scientifique, de nombreuses données faisant état d'importants déclin dans leurs populations (Potts *et al.*, 2010). Ces déclin ont été constatés dès la fin des années 1990, certains auteurs évoquent même une « crise globale de la pollinisation » (Kearns *et al.*, n.d.; Allen-Wardell *et al.*, 1998; Ghazoul, 2005). En effet, de nombreux insectes sauvages semblent également affectés par ces déclin, parmi lesquels plusieurs espèces d'abeilles, de bourdons, de syrphes et de papillons (Biesmeijer *et al.*, 2006; Goulson *et al.*, 2008; Potts *et al.*, 2010; Cameron *et al.*, 2011). En Europe, les baisses en effectifs de populations de certains insectes ont été observées parallèlement à des déclin chez certaines plantes à fleurs dépendant de ces pollinisateurs (Biesmeijer *et al.*, 2006).

L'abeille européenne *Apis mellifera*, espèce pollinisatrice majeure, est loin d'être épargné. En effet, même s'il est clair que le nombre global de colonies d'abeilles domestiques a considérablement augmenté au cours des cinq dernières décennies, l'ampleur de ces gains est variable en fonction de la zone géographique considérée (vanEngelsdorp & Meixner, 2010). Bien que de très fortes augmentations du nombre de colonies aient été enregistrées en Asie (+ 426 %), en Afrique (+ 130 %), en Amérique du Sud (+ 88 %) et en Océanie (+ 39 %), d'importantes diminutions ont été observées en parallèle en Europe (- 26,5 %) et aux États-Unis (- 49,5 %) durant la deuxième moitié du XXème siècle (Figure 2) (Potts *et al.*, 2010; vanEngelsdorp & Meixner, 2010; Levy, 2011).

Les pertes de colonies observées en Europe et aux États-Unis correspondent majoritairement à des colonies ne survivant pas aux rudes conditions hivernales puisqu'elles sont observées essentiellement à la sortie de l'hiver. De nombreuses études rapportent ainsi qu'en moyenne un tiers des colonies ne survit pas à la période hivernale mais ces pertes sont très variables en fonction de la région considérée et du rucher analysé (vanEngelsdorp *et al.*, 2008; Giray *et al.*, 2010). Par exemple, la mortalité hivernale moyenne observée à la fin de l'hiver 2007–2008 aux États-Unis était de 35,8 %, mais ces pertes fluctuaient entre 7,3 à 58,2 % en fonction de l'état fédéral considéré (Figure 3) (vanEngelsdorp *et al.*, 2008). Certains apiculteurs peuvent même perdre jusqu'à 90 % de leurs colonies durant certains hivers sans symptômes apparents imputables à un agent pathogène connu (Ellis *et al.*, 2010). Aux États-Unis, une partie des pertes observées présentent toutefois des symptômes bien particuliers qui ont été regroupés sous le terme « Colony Collapse Disorder » (CCD) ou syndrome d'effondrement des colonies. Ce syndrome se caractérise par une perte rapide des abeilles adultes d'une colonie avec très peu de cadavres retrouvés dans ou à proximité de la ruche. Ne persistent alors dans la colonie que la reine accompagnée de quelques jeunes adultes ainsi que du couvain operculé et de nombreuses réserves de nourriture (Cox-Foster *et al.*, 2007; vanEngelsdorp *et al.*, 2009; Ellis *et al.*, 2010). Il faut noter que le terme CCD n'est observé qu'aux États-Unis

(Neumann & Carreck, 2010), il ne reflète donc qu'une faible partie des pertes observées dans le monde. En France par exemple, les colonies retrouvées mortes à la sortie de l'hiver contiennent généralement de nombreuses abeilles mortes dans ou devant le corps de ruche et pas ou très peu de réserves de nourriture.

De nombreuses études scientifiques ont été menées pour identifier l'origine des pertes massives observées, notamment en étudiant la plupart du temps un à un les nombreux facteurs de stress auxquels l'abeille est soumise.

1.3. Origine multifactorielle des pertes de colonies

1.3.1. Climat, paysages et ressources

Le changement climatique implique des variations complexes et simultanées de plusieurs paramètres environnementaux, notamment de la température de l'air (Keller, 2007). Depuis plusieurs décennies, l'augmentation de la température ambiante s'accompagne d'une accumulation de CO₂ dans l'atmosphère, de bouleversements pluviométriques, d'un retrait de la calotte glaciaire et d'une plus grande fréquence d'évènements climatiques extrêmes (Robinet & Roques, 2010). Les paramètres climatiques sont connus pour avoir un impact direct sur la dynamique des populations d'insectes (Robinet & Roques, 2010). Le changement climatique pourrait donc affecter les populations d'abeilles en modifiant leur comportement ou le cycle de vie de la colonie (Le Conte & Navajas, 2008). Le climat influence également le développement des plantes à fleurs et par conséquent la production de pollen et de nectar (Le Conte & Navajas, 2008; González-Varo *et al.*, 2013). L'impact du climat sur la phénologie des plantes pourrait affecter la survie des abeilles puisque ces ressources sont directement liées à l'activité de butinage des abeilles domestiques et au développement de la colonie. *In fine*, le changement climatique pourrait modifier la distribution géographique des abeilles domestiques et donner lieu à de nouvelles compétitions entre sous-espèces ou entre espèces d'abeilles ou entre agents pathogènes (Le Conte & Navajas, 2008).

De plus, l'abeille mellifère est soumise aux modifications du paysage associées aux systèmes modernes de production agricole. Pour répondre à un souci de rendement et d'optimisation de la production par rapport à la surface cultivée, l'intensification agricole a entraîné une altération significative des paysages et de la biodiversité associée (McLaughlin & Mineau, 1995; Robinson & Sutherland, 2002). L'augmentation de la taille des parcelles cultivées et l'homogénéisation des cultures en sont deux aspects essentiels. Ces modifications anthropogéniques altèrent la fragmentation des habitats, c'est-à-dire la taille, la configuration spatiale et la connectivité des parcelles (Hadley & Betts, 2012). L'altération de la fragmentation des habitats peut influencer la

pollinisation en modifiant la densité florale, la densité en pollinisateurs ainsi que le comportement de ces derniers, notamment leurs mouvements (Hadley & Betts, 2012). Par exemple, dans les zones de culture intensive et plus encore dans les paysages de monocultures, la place laissée aux plantes entomophiles est généralement très limitée, réduisant drastiquement la diversité des ressources alimentaires de certaines espèces. Bien que certaines cultures mellifères représentent des ressources intéressantes et attractives pour les abeilles, leur floraison reste généralement limitée dans le temps menant à des périodes pauvres en ressources alimentaires (Holzschuh *et al.*, 2007).

1.3.2. Contaminations anthropogéniques

Parallèlement à la modification profonde des paysages qui a conduit à un premier bouleversement majeur de l'environnement apicole, l'utilisation massive de pesticides a impacté et impacte encore la santé des abeilles (Regnault-Roger *et al.*, 2005; Barnett *et al.*, 2007). Les traitements phytosanitaires peuvent entraîner une intoxication des abeilles par contact lors de leur activité de butinage ou par voie orale lors de la contamination des ressources alimentaires qu'elles récoltent. L'exposition des abeilles à des pesticides peut également avoir lieu au sein même de la ruche lorsque les apiculteurs appliquent des acaricides sur les cadres de la ruche, pour lutter contre l'acarien *Varroa destructor*, un parasite majeur de l'abeille (Martel *et al.*, 2007). Les abeilles sont également exposées à d'autres types de xénobiotiques anthropogéniques tels que les hydrocarbures aromatiques polycycliques (Perugini *et al.*, 2011; Lambert *et al.*, 2012b) et les éléments-traces métalliques (Lambert *et al.*, 2012a; Satta *et al.*, 2012).

1.3.3. Agents pathogènes

L'abeille doit faire face à différents facteurs de stress d'origine biotique parmi lesquels de nombreux agents pathogènes influençant fortement la santé des colonies (Genersch, 2010a; Evans & Schwarz, 2011). Ainsi, les colonies atteintes du CCD aux États-Unis ou subissant de fortes pertes hivernales présentent une incidence plus élevée d'agents pathogènes connus par rapport aux colonies non affectées (Cox-Foster *et al.*, 2007; Cornman *et al.*, 2012; Ravoet *et al.*, 2013), ce qui suggère un lien important entre les agents pathogènes et les déclinés de populations d'abeilles.

Le parasite *Varroa destructor*

Varroa destructor est un acarien ectoparasite ayant pour hôte originel l'abeille asiatique *Apis cerana*. Or, depuis sa récente apparition chez *A. mellifera* au cours des années 1970 (Boecking & Genersch, 2008), *V. destructor* n'a cessé de conquérir les colonies d'abeilles mellifères et représente à ce jour la plus grande menace pour l'apiculture. Le cycle de vie de *V. destructor* est fortement

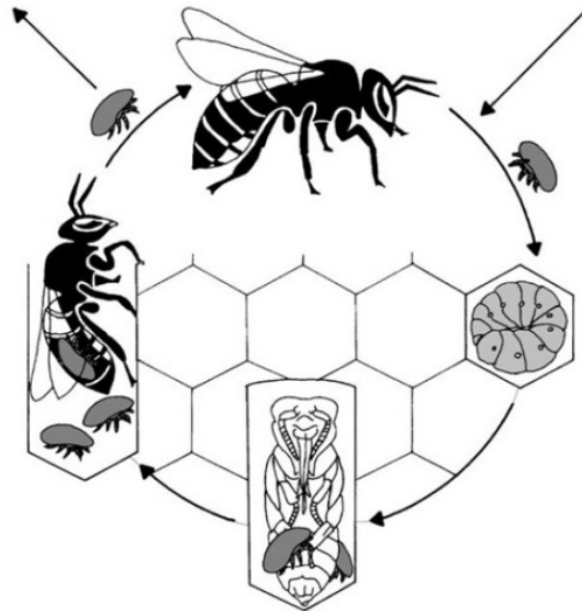


Figure 4. Représentation schématique du cycle de vie de *Varroa destructor* chez son hôte *A. mellifera* (d'après Boecking & Genersch, 2008).

L'adulte *Varroa* femelle est transporté de colonies en colonies par les abeilles adultes. Dans une nouvelle colonie, la prolifération du parasite se déroule dans les cellules operculées du couvain. La femelle envahit une de ces cellules juste avant son operculation puis se nourrit de l'hémolymphe de la nymphe en développement avant de pondre ses premiers oeufs. De cette façon, l'acarien parasite synchronise sa reproduction sur le développement de l'abeille. L'acarien femelle et sa progéniture sortent de la cellule lors de l'émergence de l'abeille adulte.

adapté au développement de son hôte puisque le parasite se reproduit à l'intérieur du couvain operculé et se nourrit de l'hémolymphe de la larve et de la puppe en développement puis de l'abeille adulte (Figure 4). La perte d'hémolymphe durant le développement de la puppe réduit significativement la taille et le poids de l'imago (Duay *et al.*, 2003). Le parasite seul contribue donc à la malformation et à l'affaiblissement des abeilles mais il peut aussi être associé à de multiples infections virales en tant que vecteur d'au moins 5 virus différents : DWV (deformed wing virus), ABPV (acute bee paralysis virus), IAPV (Israel acute paralysis virus), KBV (Kashmir bee virus) et SBV (sacbrood virus) (Boecking & Genersch, 2008).

Bactéries et virus

Parmi les agents pathogènes de l'abeille connus, deux bactéries peuvent infecter les larves, *Paenibacillus larvae* et *Melissococcus plutonius*, respectivement agents de la loque américaine et de la loque européenne (Forsgren, 2010; Genersch, 2010b). L'abeille peut aussi être porteuse d'une vingtaine de virus dont la majorité correspond à des virus à ARN simple brin positif (Evans & Schwarz, 2011). Les virus affectent la morphologie, la physiologie et le comportement des abeilles et ont été largement associés à des colonies faibles ou effondrées. Lors de leur développement, les pupes infectées par le DWV vont produire des adultes avec les ailes gravement déformées et un abdomen plus court et décoloré qui ne survivent généralement que quelques jours après leur émergence (de Miranda & Genersch, 2010). Il est important de noter que l'infection de la puppe par le DWV implique nécessairement la transmission du virus par le parasite *V. destructor*.

Autres parasites

La pathosphère de l'abeille mellifère regroupe plusieurs autres parasites parmi lesquels des protozoaires tels que le trypanosome *Crithidia mellifica* ou l'amibe *Malpighamoeba mellifica*, ou des parasites apparentés au phylum des champignons tels que *Ascosphaera apis* et les microsporidies *Nosema ceranae* et *Nosema apis* (Evans & Schwarz, 2011). Ces deux espèces microsporidiennes se développent dans les cellules de l'intestin moyen de l'abeille adulte et peuvent augmenter les exigences nutritionnelles et la mortalité de l'hôte. Malgré de nombreuses études scientifiques portant sur *N. ceranae* et *N. apis*, le rôle de ces deux espèces dans les récentes pertes de colonies d'abeilles reste encore difficile à déterminer.

1.3.4. Un nouveau prédateur

L'abeille européenne doit également faire face à un nouveau prédateur originaire de l'Asie de l'Est et introduit en France depuis 2004, le frelon à pattes jaunes (*Vespa velutina*) (Villemant *et al.*,

2006). La croissance rapide des colonies de *V. velutina* et sa répartition géographique en constante expansion montrent que cette espèce est parfaitement adaptée à son nouvel environnement (Rortais *et al.*, 2010). *V. velutina* est un prédateur redoutable s'attaquant principalement aux Hyménoptères sociaux et plus particulièrement aux abeilles domestiques dans le but de se nourrir des larves du couvain et de collecter du miel. En Europe, les observations montrent qu'*A. mellifera* ne possède pas encore de stratégie de défense efficace pour limiter les attaques de ce nouveau prédateur.

1.3.5. Interactions entre facteurs de stress

L'abeille est exposée à de nombreux facteurs de stress d'origine abiotique ou biotique. Toutefois, la recherche d'un agent causal responsable des pertes de colonies d'abeilles a été un objectif poursuivi par de nombreux chercheurs, et il devient clair à présent qu'un agent causal unique est difficile à incriminer et que les causes de ces déclin seraient plutôt le résultat d'interactions entre multiples facteurs de stress (vanEngelsdorp *et al.*, 2009, 2010; Neumann & Carreck, 2010; Potts *et al.*, 2010). En effet, les facteurs de stress peuvent être interdépendants et avoir des conséquences plus néfastes lorsqu'ils agissent ensemble (Johnson *et al.*, 2009; Locke *et al.*, 2012) en entraînant parfois une mortalité significativement plus élevée (Colin & Belzunces, 1992; Alaux *et al.*, 2010a; Nazzi *et al.*, 2012). Parmi les facteurs de stress touchant l'abeille, il semblerait que les pesticides et les agents pathogènes soient ceux ayant le plus d'influence sur les pertes de colonies d'abeilles (Neumann & Carreck, 2010). Plusieurs études ont mis en évidence la multiplicité des agents pathogènes (Cox-Foster *et al.*, 2007; Hedtke *et al.*, 2011; Dainat *et al.*, 2012) et des pesticides (Chauzat *et al.*, 2009; Mullin *et al.*, 2010; Lambert *et al.*, 2013) retrouvés au sein des colonies, suggérant que des interactions pourraient avoir lieu entre agents pathogènes et/ou pesticides. Or, la multitude de combinaisons possibles complique l'évaluation de l'impact de ces interactions pour les scientifiques, les apiculteurs et les autorités de régulation.

Quelques études ont déjà pu montrer que l'interaction entre pesticides ou entre agents pathogènes peut avoir un effet synergique sur la mortalité des abeilles et donc potentiellement affecter la santé des colonies d'abeilles. La synergie est définie lorsque l'effet de deux facteurs est supérieur à la somme des effets de ces mêmes facteurs pris individuellement (Holmstrup *et al.*, 2010). Ainsi, l'association entre certains pesticides comme (i) l'insecticide deltaméthrine et le fongicide prochloraze (Colin & Belzunces, 1992) ou (ii) les acaricides coumaphos et τ -fluvalinate (Johnson *et al.*, 2009) entraîne un effet synergique sur la mortalité des abeilles. Une synergie pourrait également avoir lieu lorsque l'abeille est exposée à deux agents pathogènes, l'acarien *V. destructor* et le virus DWV (Nazzi *et al.*, 2012). Enfin, les interactions entre agents pathogènes et insecticides peuvent également avoir des effets néfastes sur la santé de certains pollinisateurs (González-Varo *et al.*, 2013)

et les premières études évaluant leur impact chez *A. mellifera* ont été réalisées de façon concomitante à ces travaux de thèse. En effet, l'intensité des infections liées aux parasites microsporidiens du genre *Nosema* (*N. apis* et *N. ceranae*) est significativement plus forte chez les abeilles provenant de colonies contaminées par l'insecticide imidaclopride (Pettis *et al.*, 2012) suggérant un impact de cette molécule sur le développement parasitaire. De plus, l'exposition simultanée à l'imidaclopride et à des spores de *Nosema* entraîne un effet synergique sur la mortalité des abeilles (Alaux *et al.*, 2010a).

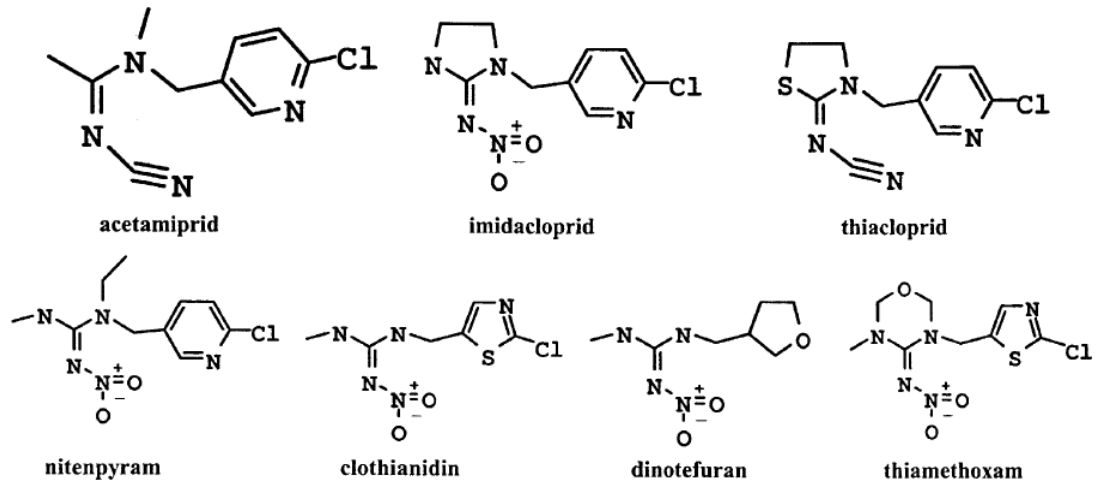
Les travaux de cette thèse s'inscrivent dans ce contexte puisqu'ils portent sur l'interaction entre différents facteurs de stress auxquels l'abeille mellifère est fréquemment exposée. Il s'agit plus précisément d'étudier l'association entre des molécules insecticides neurotoxiques et le parasite microsporidien *N. ceranae* chez *A. mellifera*. L'effet synergique démontré par Alaux *et al.* en 2010 (Alaux *et al.*, 2010a) peut-il être observé en considérant les spores de l'espèce *N. ceranae* seule et de faibles doses d'insecticides appartenant à différentes familles chimiques ? La synergie est-elle dépendante de l'ordre d'exposition des abeilles aux deux facteurs de stress ? Enfin, comment varie l'expression des gènes de l'abeille en réponse à ces facteurs appliqués seuls ou en combinaison ?

2. Exposition des abeilles à des insecticides neurotoxiques

2.1. Nouvelles classes d'insecticides neurotoxiques

Les pesticides appartenant aux familles des organochlorés (par ex. le dichlorodiphényltrichloroéthane ou DDT), des organophosphorés ou des carbamates connurent un essor considérable au milieu du XX^{ème} siècle lors du développement de la chimie organique de synthèse et suite aux recherches de nouveaux gaz de combat lors des deux guerres mondiales. Ces insecticides ont considérablement modifié l'agriculture et amélioré l'état sanitaire de la population humaine en permettant une lutte contre les insectes vecteurs de maladies. Ils ont donc été employés de façon intensive (Casida & Quistad, 1998). À partir des années 1970, l'utilisation de certains composés, notamment des organochlorés, fut interdite dans de nombreux pays en raison de risques toxicologiques et de contaminations environnementales. De nouvelles molécules appartenant à 3 grands familles d'insecticides furent alors développées, les pyréthriinoïdes, les néonicotinoïdes et les phénylpyrazoles, qui sont beaucoup plus efficaces à faibles doses et possèdent des propriétés de diffusion à travers les tissus végétaux (Casida & Quistad, 1998; Regnault-Roger *et al.*, 2005). La

A.



B.

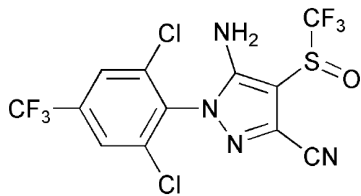


Figure 5. Structure primaire (A) des principaux insecticides néonicotinoïdes (Isawa *et al.*, 2004) et (B) du phénylpyrazole fipronil (Nauen & Bretschneider, 2002).

toxicité de ces nouvelles familles d'insecticides est plus sélective car basée sur des sites d'action spécifiques des familles d'organismes visées.

La plupart des insecticides couramment utilisées aujourd'hui sont des neurotoxiques agissant sur le système nerveux des organismes cibles. Parmi les quelques insecticides ne ciblant pas le système nerveux figurent des régulateurs de croissance, tels que les inhibiteurs de synthèse de chitine, ou des molécules agissant sur le système respiratoire. Les insecticides neurotoxiques sont classés en différentes familles chimiques et agissent sur divers récepteurs spécifiques. Les travaux de cette thèse porteront sur des molécules chimiques appartenant aux familles des néonicotinoïdes (thiaclopride et imidaclopride) et des phénylpyrazoles (fipronil).

2.1.1. La classe des néonicotinoïdes

Les néonicotinoïdes sont parmi les insecticides les plus efficaces pour le contrôle des insectes nuisibles sur les cultures de coton, maïs, betterave, colza et de certaines céréales (Elbert *et al.*, 2008). En 2010, les néonicotinoïdes représentaient 24 % du marché global des insecticides soit une valeur d'environ 1,5 milliard d'euros (Jeschke *et al.*, 2011). Cette classe d'insecticides inclut des molécules introduites sur le marché depuis le début des années 1990 tels que l'imidaclopride, le thiaclopride, le thiaméthoxame, la clothianidine et l'acétamipride (Figure 5.A.) et aujourd'hui utilisées dans plus de 120 pays (Jeschke *et al.*, 2011). L'imidaclopride, première molécule néonicotinoïde synthétisée, est devenu l'un des insecticides les plus employés dans le monde (Decourtye & Devillers, 2010). Ce dernier est en effet utilisé dans plusieurs formulations commerciales, dont la plus connue est le Gaucho® (Bayer CropScience), visant à protéger les cultures de tournesol, de maïs, de riz et de certains légumes et céréales contre les organismes nuisibles. De nombreuses études scientifiques se sont portées sur l'imidaclopride dans le but d'évaluer l'impact des néonicotinoïdes sur des organismes non cibles tels que l'abeille domestique. En 2013, l'EFSA a considéré que trois molécules néonicotinoïdes, l'imidaclopride, le thiaméthoxame et la clothianidine, présentaient un risque élevé pour les abeilles sur la base des données scientifiques disponibles (European Food Safety Authority, 2013a, 2013b, 2013c). Suite à cette constatation, la Commission Européenne a voté l'interdiction de la mise sur le marché de formulations commerciales contenant ces trois insecticides néonicotinoïdes ainsi que leur utilisation pour le traitement des semences de cultures mellifères (The European Commission, 2013). Toutefois, leur utilisation reste autorisée pour le traitement de cultures dont la croissance a lieu durant l'hiver ou sous serres.

Les néonicotinoïdes sont des molécules synthétiques modélisées à partir de la nicotine, insecticide naturel produit par certaines plantes. Les néonicotinoïdes induisent une hyperstimulation du système nerveux central en se liant aux récepteurs nicotiques à l'acétylcholine (nAChR) situés

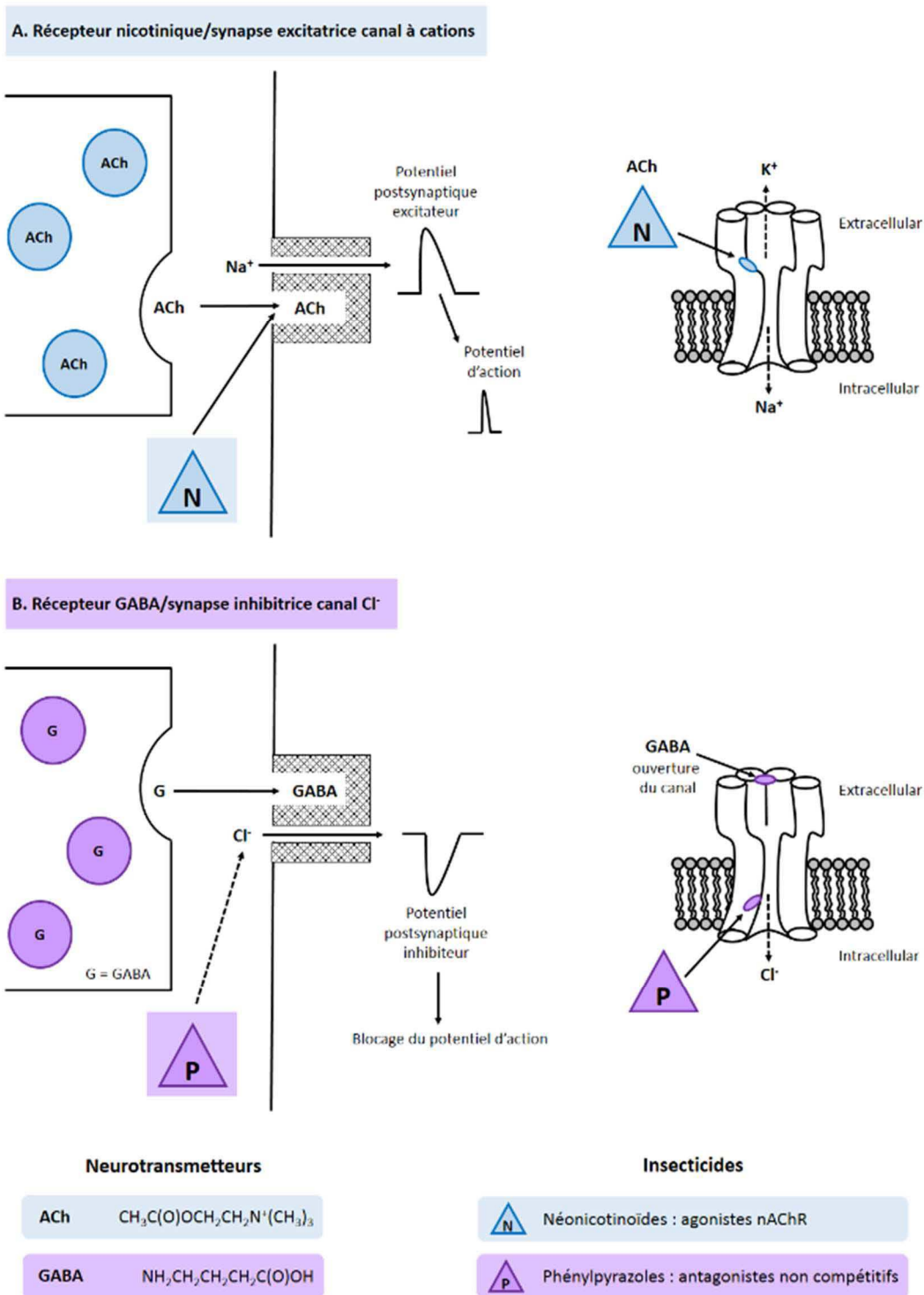


Figure 6. Sites d'action des insecticides neurotoxiques (A) néonicotinoïdes et (B) phénylpyrazoles localisés sur les cellules postsynaptiques (adapté d'après Casida & Durkin, 2013).

(A) En conditions normales, le neurotransmetteur acétylcholine (ACh) se lie à son récepteur nicotinique (nAChR) pour une durée très brève de l'ordre de quelques millisecondes. Le changement de conformation du récepteur subséquent permet l'ouverture du canal et l'influx d'ions Na^+ extracellulaires résultant en une stimulation nerveuse courte et contrôlée. Les néonicotinoïdes sont des molécules agonistes qui se fixent au nAChR durant des périodes beaucoup plus longues, généralement plusieurs minutes, entraînant ainsi une hyperstimulation nerveuse. (B) En conditions normales, l'acide γ -amino-butérique (GABA), principal neurotransmetteur inhibiteur, se fixe sur son récepteur et permet l'ouverture du canal transmembranaire pentamérique et le passage des ions Cl^- . L'influx d'ions Cl^- a pour fonction de limiter et contrebalancer l'activité électrique dans les neurones post-synaptiques. La liaison d'une molécule antagoniste phénylpyrazole sur le récepteur GABA inhibe l'entrée d'ions Cl^- et donc l'apparition du potentiel postsynaptique inhibiteur. Les phénylpyrazoles entraînent donc indirectement une hyperexcitation du système nerveux central en empêchant l'effet inhibiteur du neurotransmetteur GABA.

sur les neurones postsynaptiques (Figure 6.A.) (Jeschke *et al.*, 2011). Ces insecticides agissent sur de multiples sous-types de récepteurs à l'acétylcholine, avec une sélectivité différentielle entre insectes et mammifères conférée uniquement par des changements structuraux mineurs (Casida & Durkin, 2013). Dans l'organisme, les insecticides peuvent être transformés en métabolites secondaires. L'imidaclopride ingéré par des abeilles a une demi-vie d'environ 4 à 5 h ; il est rapidement métabolisé pour former l'olefin et le 5-hydroxy-imidaclopride qui peuvent persister plus de 48 h et donc causer des effets à plus long terme (Suchail *et al.*, 2004).

2.1.2. La classe des phénylpyrazoles

Parmi les phénylpyrazoles, la molécule la plus utilisée est le fipronil, mise sur le marché pour la première fois en Europe au début des années 1990 (Figure 5.B.). Dans certains pays d'Europe, le fipronil constitue la substance active de formulations commerciales telles que le Régent® (BASF), autorisées pour le traitement du maïs, du tournesol et de différentes plantes potagères (chou-fleur, chou de Bruxelles, brocoli, poireau, oignon, échalote) (European Food Safety Authority, 2013*d*). Toutefois, le fipronil a fait l'objet en 2004 d'importantes restrictions pour son utilisation en protection des cultures en France. En 2013, le fipronil présente selon l'EFSA un risque aigu pour les abeilles lorsqu'il est utilisé en traitement des semences de maïs (European Food Safety Authority, 2013*d*), l'Union Européenne a ainsi voté l'interdiction de l'utilisation de cette molécule sur les cultures de tournesol et de maïs dans tous les états membres.

Cet insecticide contrôle un large spectre d'arthropodes incluant les blattes, les moustiques, les criquets, les tiques et les puces aux stades larvaire et adulte. De plus, il est efficace contre les insectes devenus résistants à des classes d'insecticides antérieures telles que les carbamates ou les organophosphorés (Gunasekara *et al.*, 2007).

Les molécules appartenant à la classe des phénylpyrazoles se lient aux canaux chlorures du récepteur à l'acide γ -amino-butérique (GABA) et induisent indirectement une hyperexcitation du système nerveux central (Figure 6.B.) (Cole *et al.*, 1993). Les récepteurs GABA des insectes existent en différents sous-types et forment une classe distincte des récepteurs GABA rencontrés chez les vertébrés (Casida & Durkin, 2013).

2.2. Exposition de l'abeille mellifère : de la plante à la ruche

Les pesticides peuvent avoir des effets néfastes sur l'environnement. Ces effets indésirables sont pour certains bien connus : (i) la pollution de l'air par des pesticides volatils, (ii) les contaminations du sol lors du traitement des cultures et (iii) de l'eau après lessivage des sols, et (iv) l'apparition d'effets toxiques sur des organismes non cibles (Damalas & Eleftherohorinos, 2011). De

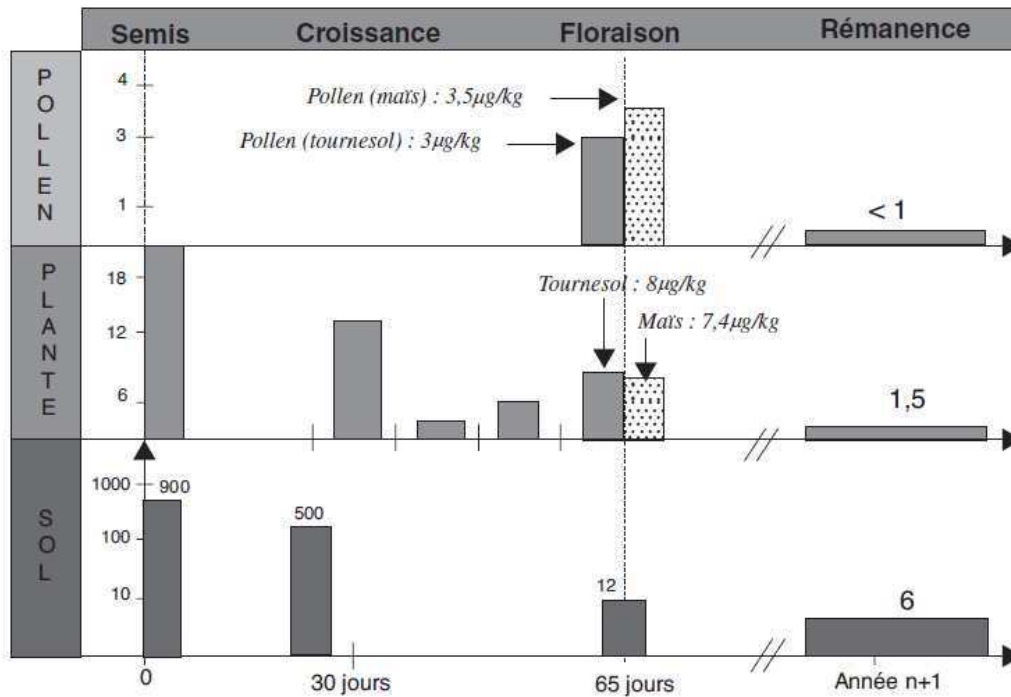


Figure 7. Quantités moyennes de l'insecticide systémique imidaclopride ($\mu\text{g}/\text{kg}$) dans chaque matrice en fonction du temps écoulé après le semis de la culture enrobée (Charvet *et al.*, 2004).

plus, de par leur action sur le système nerveux central des insectes, les insecticides neurotoxiques peuvent s'avérer toxiques pour des arthropodes non ciblés tels que l'abeille mellifère.

Les abeilles vivant et butinant à proximité de cultures agricoles peuvent être exposées aux insecticides, notamment durant le printemps et l'été. La période de plantation soumet les abeilles à un fort risque d'exposition car une fraction du traitement insecticide épandu est directement dispersée dans l'environnement proche sous forme de poussières et de particules volatiles contenant de fortes concentrations de la molécule chimique (Krupke *et al.*, 2012). Les abeilles sont également exposées aux insecticides dits systémiques lors de la période de floraison des plants traités.

2.2.1. Des pesticides présents dans l'ensemble de la plante

Certains insecticides comme les néonicotinoïdes sont dits systémiques car ils sont détectés dans l'ensemble de la plante traitée grâce à des propriétés de diffusion à travers les tissus végétaux. Ils sont souvent utilisés en « enrobage », une dose prédéfinie d'insecticide étant appliquée autour des semences pour les protéger. Durant la croissance, l'insecticide est distribué *via* la sève, dans toute la plante, assurant ainsi une protection de tous les tissus contre les insectes ravageurs dits piqueurs-suceurs. Cette technique a pour buts (i) de concentrer le produit utilisé vers les parties de la plante où les insectes nuisibles sont les plus abondants, et (ii) de réduire les risques d'exposition des organismes non ciblés en comparaison avec les applications par pulvérisation (Charvet *et al.*, 2004; Thompson, 2010). Cependant, leur diffusion dans tous les tissus de la plante fait que ces insecticides sont également retrouvés dans les matrices récolées par les abeilles comme le pollen et le nectar (Figure 7). L'exposition des abeilles butineuses à ces insecticides est alors possible si les molécules utilisées sont persistantes et si les plantes traitées sont des variétés attirant les butineuses comme le maïs et le tournesol (Thompson, 2010).

Les abeilles butineuses peuvent collecter des gouttelettes d'eau sur les feuilles des plantes issues du phénomène de guttation, c'est-à-dire la formation de gouttelettes d'eau aux extrémités des feuilles des plantes vasculaires (Girolami *et al.*, 2009; Thompson, 2010). Lorsque les semences ont été enrobées avec des néonicotinoïdes, il est possible de détecter les molécules actives dans les gouttelettes de guttation. Des concentrations moyennes de 47 mg/L d'imidaclopride, 23 mg/L de clothianidine et 12 mg/L de thiaméthoxame ont ainsi pu être détectées dans des gouttelettes d'eau récolées sur des plants de maïs dont les semences avaient été traitées avec ces trois néonicotinoïdes (Girolami *et al.*, 2009). L'accumulation de ces molécules dans les gouttelettes est parfois bien plus importante avec des concentrations maximales détectées de 346 mg/L d'imidaclopride, 102 mg/L de clothianidine et 146 mg/L de thiaméthoxame (Tapparo *et al.*, 2011). Ces concentrations diminuent progressivement durant les deux premières semaines suivant l'émergence du plant hors du sol.

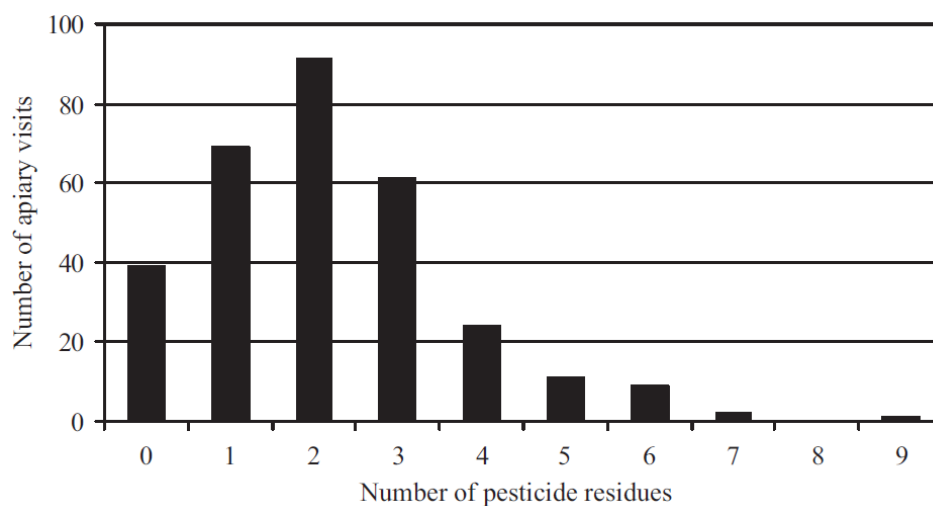


Figure 8. Distribution des fréquences de détection des résidus de pesticides dans différentes matrices (pollen, miel, cire, abeille) d'un même rucher (Chauzat *et al.*, 2009).

Les fréquences sont calculées à partir d'échantillons collectés au cours de 307 visites cliniques effectuées dans 25 ruchers entre 2002 et 2005 en France.

Plusieurs études réalisées sur des cultures de tournesol ou de maïs dont les semences avaient été traitées avec l'imidaclopride ont montré que l'insecticide peut être détecté dans les fleurs à hauteur de 5 à 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, et plus précisément dans le pollen (entre 2,1 et 3,9 $\mu\text{g}/\text{kg}$) et le nectar ($\approx 2 \mu\text{g}/\text{kg}$) récoltés par les butineuses (Schmuck *et al.*, 2001; Bonmatin *et al.*, 2003, 2005). Ces données montrent que la translocation de l'insecticide depuis la semence et son accumulation jusque dans les fleurs ou dans les gouttelettes de guttation sont relativement efficaces.

À ce jour, il n'existe pas d'évidence claire de propriétés systémiques pour le phénylpyrazole fipronil (European Food Safety Authority, 2013*d*). En 2011, Tapparo *et al.* (Tapparo *et al.*, 2011) n'ont pu détecter le fipronil dans des gouttelettes de guttation. Toutefois, il est important de noter que les limites de détection et de quantification de la méthode utilisée pour le fipronil, 5,1 $\mu\text{g}/\text{L}$ et 16 $\mu\text{g}/\text{L}$ respectivement, étaient relativement élevées. De plus, quelques données suggèrent l'absorption de cette molécule et/ou de ses métabolites par la plante (European Food Safety Authority, 2013*d*). D'autres analyses ont ainsi pu détecter des résidus de fipronil (entre 0,8 et 2,1 $\mu\text{g}/\text{kg}$) dans des gouttelettes issues de maïs traité. Bien que beaucoup plus faibles que celles détectées pour les néonicotinoïdes, ces concentrations de fipronil détectées attestent d'une absorption et d'un transport de la molécule dans la plante. L'insecticide fipronil semble être également absorbé par les racines du tournesol, et distribué dans la plante *via* le xylème (Aajoud *et al.*, 2006, 2008). Les taux de résidus accumulés dans l'inflorescence semblent relativement faibles au regard de la quantité de fipronil appliquée lors du traitement puisque, 83 jours après la mise en culture, seul 0,06 % de la quantité initiale de fipronil est détectée au niveau des fleurs (Aajoud *et al.*, 2008). De façon générale, la translocation de fipronil radioactif après traitement de diverses semences (tournesol, maïs, coton, blé, betterave sucrière) semble être relativement faible puisque seulement 0,8 à 4,5 % du traceur appliqué est absorbé et retrouvé dans les parties aériennes de la plante (European Food Safety Authority, 2013*d*). Toutefois, la présence de faibles concentrations de l'insecticide dans le pollen ou le nectar ne peut pas être exclue.

2.2.2. Contamination des matrices de la ruche

Les matrices récoltées par les abeilles lors de leur activité de butinage sont rapportées à l'intérieur de la colonie et constituent la base de l'alimentation de la colonie. En effet, le pollen, aliment riche en protéines et en lipides est directement stocké dans les alvéoles puis consommé par les larves en développement et par les ouvrières. Le nectar, très riche en glucides, sert à l'élaboration de miel qui est stocké puis consommé par les abeilles adultes. Ces matrices servent également à l'élaboration de la gelée royale sécrétée par les glandes hypopharyngées des nourrices. La gelée

Tableau 1. Fréquences de détection du phénylpyrazole fipronil, des néonicotinoïdes imidaclopride et thiaclopride et de certains de leurs métabolites et concentrations moyennes retrouvées dans les matrices des colonies selon différentes études.

¹Chauzat *et al.*, 2006 France, ²Mullin *et al.*, 2010 États-Unis, ³Bernal *et al.*, 2010 Espagne (échantillons collectés au printemps seulement), ⁴Chauzat *et al.*, 2009 France, ⁵Pareja *et al.*, 2011 Uruguay, ⁶Lambert *et al.*, 2013 France.



POLLEN



MIEL



CIRE



ABEILLE

Molécule	Réf.	POLLEN		MIEL		CIRE		ABEILLE	
		échant. positifs (%)	concentration moy. (µg/kg)	échant. positifs (%)	concentration moy. (µg/kg)	échant. positifs (%)	concentration moy. (µg/kg)	échant. positifs (%)	concentration moy. (µg/kg)
Fipronil	1	12,4 (n=81)	1,2						
	2	0,3 (n=350)	28,5			1,4 (n=208)	12,8	1,4 (n=140)	1535
	3	3,7 (n=845)	2						
	4	12,4 (n=185)	1,2					9,1 (n=187)	0,5
	5			6,5 (n=31)	70			non précisé	160
métabolite sulfone	1	3,7 (n=81)	1,2						
	4	12,4 (n=185)	1,7					9,1 (n=187)	0,4
métabolite désulfinyl	1	11,1 (n=81)	1,3						
	4	12,4 (n=185)	1					9,1 (n=187)	1,2
Imidaclopride	1	49,4 (n=81)	1,2						
	2	2,9 (n=350)	39						
	4	57,3 (n=185)	0,9	29,7 (n=239)	0,7	1 (n=208)	8	26,2 (n=187)	1,2
	3					50 (n=6)	377		
	6	0,8 (n=128)	1,35	2,1 (n=141)	0,14				
métabolite acide 6-chloronicotinique	1	44,4 (n=81)	1,2						
	4	57,3 (n=185)	1,2	29,7 (n=239)	1,2			26,2 (n=187)	1
métabolite oléfin	2	0,3 (n=350)	554						
métabolite 5-hydroxy-imidaclopride	2	0,3 (n=350)	152						
Thiaclopride	2	5,4 (n=350)	23,8			1,9 (n=208)	5,4		

royale est consommée par les larves durant les premiers jours de leur développement et par les reines tout au long de leur stade larvaire (Tautz, 2009).

L'utilisation de technologies analytiques sensibles est essentielle pour rechercher des résidus de molécules insecticides dans les matrices de la colonie. De faibles concentrations de pesticides de l'ordre du $\mu\text{g}/\text{kg}$ peuvent désormais être détectées grâce à deux techniques de chromatographie aux limites de détection très basses : la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) et la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC/MS-MS) (Johnson *et al.*, 2010; Mullin *et al.*, 2010).

2.2.2.1. Contamination par de multiples résidus

En France, un suivi des résidus de pesticides présents dans différentes matrices (pollen, cire, miel et abeille) récoltées dans 125 colonies a été effectué entre 2002 et 2005. Seuls 12 % des échantillons étaient négatifs pour les 41 molécules recherchées et les échantillons positifs contenaient de 1 à 9 molécules insecticides différentes (Figure 8) (Chauzat *et al.*, 2009), attestant de la présence possible de multiples molécules. Parmi les insecticides les plus fréquemment détectés dans le pollen se trouvent l'imidaclopride, retrouvé dans un échantillon sur deux, le fipronil et leurs métabolites respectifs (Tableau 1) (Chauzat *et al.*, 2006, 2009). L'imidaclopride et son métabolite, l'acide 6-chloronicotinique, ont également été fréquemment retrouvés dans le miel (29.7 %) et dans les abeilles (26.2 %) à des concentrations de l'ordre de $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ (Tableau 1) (Chauzat *et al.*, 2009). Une étude française plus récente a confirmé la présence de multiples résidus de pesticides dans le miel, le pollen et les abeilles prélevés à l'intérieur des colonies (Lambert *et al.*, 2013).

Aux États-Unis, plus de 120 pesticides et métabolites différents ont pu être détectés dans près de 900 échantillons correspondant à diverses matrices prélevées dans les colonies (Mullin *et al.*, 2010). La moitié des échantillons (49,9 %) contenaient au moins un pesticide systémique et la quasi-totalité des échantillons (92,3 %) étaient contaminés par deux pesticides ou plus. En considérant les matrices pollen et cire, les analyses ont mis en évidence la présence de deux pesticides ou plus dans 98,4 % des 609 échantillons, trois ou plus dans 91 %, des échantillons et quatre ou plus dans 80 % des échantillons. Dans la matrice pollen, en moyenne sept molécules différentes ont été détectées au sein d'un même échantillon avec un maximum de 31 molécules. Les molécules les plus fréquemment rencontrées dans cette matrice sont des insecticides appartenant aux classes des pyréthrinoïdes, des organophosphorés, ainsi que des herbicides ou encore des fongicides. Ce taux élevé de contaminants relativement divers dans la nourriture souligne le risque que ces molécules interagissent et affectent sévèrement la santé des abeilles. Les néonicotinoïdes et les phénylpyrazoles ont été globalement détectés dans un faible nombre d'échantillons. Parmi les néonicotinoïdes, le thiaclopride a été le plus

fréquemment retrouvé dans le pollen (5,4 % des échantillons) à une concentration moyenne de 24 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Les insecticides neurotoxiques imidaclopride et fipronil ont été détectés dans le pollen à des concentrations légèrement plus élevées, 39 $\mu\text{g}/\text{kg}$ et 28,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ respectivement. Les échantillons d'abeilles contenaient généralement moins de résidus de pesticides que le pollen, cependant, de très fortes concentrations de l'insecticide fipronil ont été mesurées, atteignant en moyenne des valeurs de plus de 1500 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

2.2.2.2. Contamination et pratiques agricoles

En Uruguay, des colonies présentant un effondrement de leur population d'abeilles localisées à proximité de cultures de soja ayant été traitées avec du fipronil par pulvérisation se sont révélées être contaminées par de fortes concentrations de cet insecticide (Pareja *et al.*, 2011). Les échantillons d'abeilles récoltés dans ces colonies contenaient en moyenne 160 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de fipronil. Le fipronil n'a été détecté que dans 6 % des échantillons de miel mais à des concentrations relativement élevées, atteignant en moyenne 70 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Dans cette étude, des matrices prélevées dans des colonies effondrées proches de cultures de tournesol traitées à l'imidaclopride étaient également fortement contaminées par ce néonicotinoïde. Ainsi, des concentrations d'imidaclopride de 377 $\mu\text{g}/\text{kg}$ et de 60 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en moyenne ont été mesurées dans la cire et la propolis respectivement. Toutefois, la molécule n'a pu être détectée dans les échantillons d'abeilles et de miel de ces colonies.

Une étude française a pour la première fois relié la contamination des matrices apicoles à la fois au contexte paysager environnant les colonies mais également à la période de prélèvement (Lambert *et al.*, 2013). Les résultats ont ainsi montré que les ruchers situés dans des paysages de grandes cultures étaient les plus contaminés, toutefois aucune différence significative n'a pu être détectée. Les plus fortes contaminations ont été constatées au printemps qui correspond à une période de traitement intense des cultures et à une forte activité de butinage. De la même façon, une étude réalisée en Espagne en 2010, a permis de mettre en évidence du fipronil dans seulement 3,7 % des échantillons de pollen collectés au printemps et jamais dans ceux collectés en hiver (Bernal *et al.*, 2010). La contamination des matrices de la ruche par les insecticides semble donc fluctuer en fonction de la saison considérée.

Même si l'ampleur de la contamination par les insecticides peut varier en fonction de la saison ou du paysage considéré, il apparaît que les différentes matrices apicoles sont toutes susceptibles de contenir une multitude de molécules contaminantes. Dans ce contexte, l'ensemble des stades de développement et des castes présents au sein de la colonie est constamment exposé aux insecticides, que ce soit par contact (cire) ou par voie orale (pollen, miel). De plus, de nombreuses études montrent

Tableau 2. Toxicité aiguë du fipronil, du thiaclopride, de l'imidaclopride et de ses métabolites envers *A. mellifera* suite à une administration orale ou topique (doses létales 50 %, DL50 en ng/abeille).

Le moment où la mortalité a été mesurée (24 ou 48 h après traitement) est indiqué lorsque précisé dans la littérature. ¹EFSA, 2013b, ²Decourtye *et al.*, 2005, ³Schmuck *et al.*, 2001, ⁴Decourtye *et al.*, 2003, ⁵Nauen *et al.*, 2001, ⁶Suchail *et al.*, 2001, ⁷Iwasa *et al.*, 2004, ⁸Kievits & Bruneau, 2009.

Molécule	Référence	DL50 voie orale (ng/abeille)	DL50 voie topique (ng/abeille)
Fipronil	1	4,17	5,93
	2	6 (48 h)	
Imidaclopride	3	3,7 – 40,9 (48 h)	59,7 – 242,6 (48 h)
	4	30,6 (48 h)	
	5	41	
	6	57 (48 h)	
métabolite oléfin	7		17,9 (24 h)
	6	28 (48 h)	
métabolite 5-hydroxy-imidaclopride	5	> 36	
	4	153 (48 h)	
	5	159	
Thiaclopride	6	258 (48 h)	
	8	17 320 (48 h)	
	7		14 600 (24 h)

que les insecticides sont détectés en concentrations très variables. Il semble nécessaire de connaître l'impact de ces insecticides sur l'abeille mellifère, en fonction du mode d'administration et de la concentration des molécules.

2.3. Impact des insecticides neurotoxiques sur l'abeille

Les pesticides sont introduits dans l'environnement dans le but d'éliminer des organismes nuisibles. Cependant, des organismes non cibles peuvent également rentrer en contact avec de telles molécules pouvant causer leur mort ou les affecter négativement. Il apparaît nécessaire de connaître au mieux la toxicité des pesticides envers ces organismes non cibles lorsqu'ils y sont exposés. Pour cela, de nombreuses études ont été réalisées chez des organismes aquatiques et/ou terrestres, tels que les daphnies (Martínez-Jerónimo *et al.*, 2013), les amphibiens (Brühl *et al.*, 2013; Stefani Margarido *et al.*, 2013), les annélides (Velki & Hackenberger, 2013) ou divers arthropodes (Chaton *et al.*, 2002).

2.3.1. Évaluation de la toxicité des pesticides envers l'abeille domestique

L'évaluation de la toxicité des produits phytosanitaires vis-à-vis de l'environnement, et plus particulièrement des abeilles, est nécessaire avant leur mise sur le marché. En Europe, cette évaluation est réglementée par la Directive 91/414/CEE consolidée par des normes rédigées par l'Organisation Européenne et Méditerranéenne pour la Protection des Plantes (OEPP) apportant des lignes directrices supplémentaires dans le but d'harmoniser les tests. Ces normes ont été modifiées en 2010 et incluent dorénavant l'évaluation des risques présentés par les pesticides systémiques tels les néonicotinoïdes dont les résidus peuvent être présents dans le nectar ou le pollen (European and Mediterranean Plant Protection Organization, 2010a). Des premiers tests réalisés en laboratoire visent à évaluer la toxicité aiguë du produit envers des abeilles ouvrières en fonction du mode d'administration, par voie orale ou topique. Ces tests déterminent les doses létales 50 % (DL50) correspondant à la quantité de produit qui, administrée en une seule fois, par ingestion ou par contact, entraîne la mort de 50 % des individus après 24 ou 48 h (Tableau 2). Les valeurs de DL50 pour les néonicotinoïdes, notamment l'imidaclopride, et pour le fipronil sont faibles comparé aux anciennes classes d'insecticides telles que les organophosphorés, les pyréthrianoïdes et les carbamates. Ces nouvelles classes d'insecticides peuvent donc être considérées comme fortement toxiques envers les abeilles (Decourtye & Devillers, 2010). Les valeurs de DL50 pour l'imidaclopride déterminées lors de différentes études varient fortement chez l'abeille, allant de 3,7 à 57 ng/abeille pour la toxicité aiguë orale (Tableau 2). La détermination de ces valeurs pourrait être biaisée selon différents facteurs qui ne sont pas tous standardisés dans les tests de toxicité : âge des abeilles testées, sous-espèce, colonie (Decourtye & Devillers, 2010). Les métabolites de certains insecticides peuvent également

contribuer à la toxicité aiguë induite chez l'abeille. Quelques données montrent par exemple que le métabolite oléfin possède une DL50 relativement proche de celle de l'imidaclopride, suggérant qu'il serait tout aussi toxique pour l'abeille que sa molécule mère (Tableau 2).

Si les premiers tests effectués en laboratoire indiquent une toxicité aiguë non négligeable pour l'abeille, des tests « plus réalistes » sont alors engagés avec des études de semi-terrain ou de terrain (European and Mediterranean Plant Protection Organization, 2010b). Lors d'études dites de « semi-terrain », de petites colonies d'abeilles appelées *nuclei* exposées à la molécule testée sont placées sous tunnel ce qui permet de prendre en compte l'impact du pesticide sur une population entière et certaines activités importantes comme le butinage. Lors des études de terrain, des colonies d'abeilles d'au moins 10 000 individus ne sont plus confinées dans des enceintes telles que des tunnels, les butineuses sont donc libres de se déplacer où elles le souhaitent. Ceci permet un suivi, sur une longue période, de différents paramètres tels que la mortalité au sein des colonies ou les comportements (vol, retour à la ruche, butinage) des butineuses.

Contrairement à d'autres insecticides utilisés en spray et ayant une action à court terme sur les plantes, les molécules systémiques sont persistantes. De plus, détectés à de faibles concentrations dans le pollen et le nectar des plantes traitées, ces insecticides sont plus susceptibles d'affecter les abeilles par des intoxications aiguës, chroniques et sublétales plutôt que par des intoxications aiguës seulement (Halm *et al.*, 2006). Alors que les réglementations et normes actuelles proposent des méthodes pour évaluer la toxicité aiguë, il n'y a pour l'heure aucun test standardisé pour étudier les toxicités chronique et sublétale des insecticides envers les abeilles. Cependant, des études scientifiques réalisées en conditions de laboratoire ou de terrain ont déjà apporté quelques réponses quant à l'impact de ce type d'intoxication chez l'abeille.

2.3.2. Effets des insecticides sur la cognition des abeilles

La cognition regroupe les processus neuronaux impliqués dans la mémoire et dans l'acquisition du savoir, la perception, le traitement de l'information et l'interprétation, et la résolution des problèmes. La cognition est impliquée dans de nombreux types de comportement et s'avère fondamentale pour la cohésion sociale de la colonie. Elle peut être perturbée par l'interaction directe des molécules chimiques avec leurs récepteurs neuronaux, les canaux ioniques, les voies de signalisation cellulaires ou par des modifications dans le métabolisme neuronal (Belzunces *et al.*, 2012). Chez les insectes, les récepteurs nicotiques à l'acétylcholine, cibles des néonicotinoïdes, ainsi que les récepteurs GABA, cibles des phénylpyrazoles, sont exprimés dans les aires du cerveau associées aux processus visuels et olfactifs, à l'apprentissage et à la mémoire (Harrison *et al.*, 1996; Bicker, 1999; Gauthier, 2010).

La capacité des abeilles à intégrer, distinguer et répondre à une large gamme de stimuli environnementaux est bien documentée. En conditions expérimentales, elles peuvent être entraînées à différencier différents *stimuli* olfactifs, visuels ou tactiles. Lorsque l'antenne d'une abeille entre en contact avec du sucrose ou du pollen, celle-ci a immédiatement le réflexe d'étendre le proboscis pour se nourrir (proboscis extension reflex, PER), ce qui permet d'évaluer l'apprentissage et la mémoire. Les abeilles peuvent être entraînées à recevoir un stimulus de conditionnement (CS, conditioned stimulus), souvent olfactif, immédiatement suivi d'une stimulation de l'antenne par du sucrose (US, unconditioned stimulus) évoquant la réponse innée d'extension du proboscis (Frost *et al.*, 2012). L'apparition du PER est aussitôt récompensée par l'absorption de la solution de sucrose. À la suite de la phase de conditionnement, la phase de test consiste en l'application du CS qui doit, si l'apprentissage associatif n'est pas entravé, éliciter à lui seul l'apparition du PER. Tester la capacité de l'insecte à enregistrer et à retrouver l'association CS-US après un certain intervalle de temps permet d'évaluer sa mémoire. Cette méthode a été utilisée pour évaluer l'impact de l'imidaclopride et du fipronil sur les capacités d'apprentissage et de mémoire des abeilles.

Imidaclopride

L'habituation est la forme la plus simple d'apprentissage non associatif caractérisée par un déclin de la réponse comportementale PER à une stimulation antennaire répétée. L'habituation des abeilles est âge-dépendante puisqu'un nombre significativement plus important de répétitions est nécessaire pour obtenir l'habituation chez les abeilles plus âgées (de 8 à 10 jours) que chez les jeunes adultes (de 4 à 7 jours) (Guez *et al.*, 2001). L'insecticide imidaclopride appliqué sur le thorax modifie ce comportement en augmentant le nombre de répétitions chez les jeunes abeilles et en le diminuant chez celles âgées de plus de 8 jours (Guez *et al.*, 2001). Ce changement de comportement serait plus précisément dû aux métabolites de l'imidaclopride ; l'olefin et le 5-hydroxy-imidaclopride entraîneraient des effets contraires en agissant spécifiquement sur deux sous-types distincts de nAChR exprimés à différents temps au cours du développement des abeilles adultes (Guez *et al.*, 2003).

Des effets sublétaux peuvent également apparaître sur la mémoire des abeilles à la suite d'une exposition chronique à une nourriture contaminée par l'imidaclopride (de 12 à 96 µg/kg). La mémoire des abeilles exposées à de telles concentrations est significativement altérée ; cet effet sublétaux étant plus prononcé chez les abeilles prélevées en été que chez celles prélevées en hiver (Decourtye *et al.*, 2003). Une dose sublétaux d'imidaclopride (12 ng/abeille) induit plus précisément un effet négatif sur la mémoire à moyen terme (quelques heures) plutôt que sur la mémoire à court terme (quelques minutes) ou à plus long terme (plus de 24 h) (Decourtye *et al.*, 2004a). L'imidaclopride affecterait

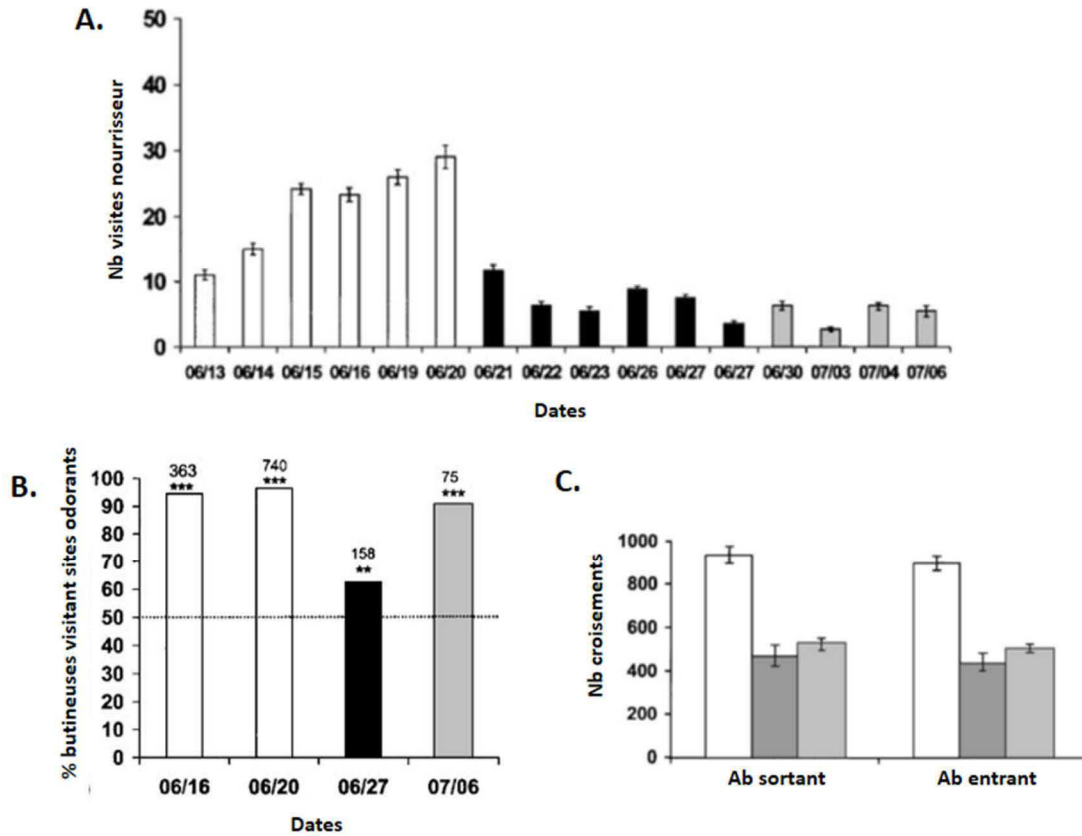


Figure 9. Effet de l'imidaclopride sur (A) l'activité de butinage des abeilles, (B) la performance d'apprentissage olfactif des butineuses et (C) l'activité de vol de la colonie (adapté d'après Decourtye *et al.*, 2004).

(A) Nombre moyen (\pm ESM) de butineuses détectées au nourrisseur. (B) Pourcentage de butineuses visitant les sites odorants du nourrisseur ; le nombre total de butineuses est indiqué au-dessus des barres ; les nombres de visites observés ont été comparés à la probabilité de se poser aléatoirement sur les sites odorants ou sur les sites non odorants (ligne à 50 %) ; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. (C) Nombre moyen (\pm ESM) de croisements enregistrés par le compteur placé à l'entrée de la colonie. Barres blanches : dates précédant l'exposition à l'imidaclopride ; barres noires/gris foncé : exposition chronique à 24 $\mu\text{g}/\text{kg}$ d'imidaclopride ; barres gris clair : dates suivant l'exposition.

spécifiquement l'action des cellules de Kenyon localisées au niveau du corps pédonculé, structure du système nerveux central de l'insecte où s'établit la mémoire à moyen terme.

Fipronil

La réponse des abeilles au sucrose (capacité à induire le PER suite à la présentation d'une solution de sucrose) est significativement réduite à la suite d'une exposition aiguë au fipronil (1 ng/abeille) appliqué par contact (El Hassani *et al.*, 2005). La perception de faibles concentrations de sucrose est donc diminuée ce qui peut avoir un impact lors de la recherche de ressources alimentaires chez les butineuses. De plus, l'application du fipronil à une dose plus faible (0,5 ng/abeille) perturbe significativement l'apprentissage et la mémoire des abeilles (El Hassani *et al.*, 2005; Bernadou *et al.*, 2009).

En revanche, l'impact de faibles doses de fipronil administrées par voie orale sur les capacités d'apprentissage et de mémoire n'est pas très clair. Plusieurs études n'ont détecté aucun effet de l'insecticide sur ces paramètres (Decourtye *et al.*, 2005; El Hassani *et al.*, 2005; Aliouane *et al.*, 2009). Cependant, une exposition orale durant 11 jours entraîne une perte de la réponse PER suite à un stimulus de conditionnement (Decourtye *et al.*, 2005) et une perturbation de la spécificité de la réponse olfactive, les abeilles traitées répondant de la même façon à une odeur apprise et à une nouvelle odeur (Aliouane *et al.*, 2009).

2.3.3. Effets des insecticides sur l'activité de butinage

L'efficacité du butinage des abeilles dépend de leur capacité à apprendre, mémoriser, et communiquer le type et la localisation des ressources alimentaires. Les insecticides neurotoxiques peuvent donc également avoir un impact profond sur la capacité des abeilles à accomplir avec succès leur activité de butinage.

Imidaclopride

La réponse au sucrose influence le butinage puisqu'elle détermine si l'abeille considère une source de nectar comme intéressante. Cette réponse se trouve significativement réduite chez des butineuses dans l'heure suivant une intoxication aiguë par voie orale à des doses sublétales d'imidaclopride (0,21 ou 2,16 ng/abeille) (Eiri & Nieh, 2012). Après 24 h, les butineuses exécutent significativement moins de cycles de danse. Ces danses en rond permettent à des butineuses d'indiquer à leurs « coéquipières » la présence d'une source de nourriture intéressante proche (Tautz, 2009). Une réduction de l'exécution de ces danses pourrait donc entraîner une baisse des ressources alimentaires stockées et ainsi affaiblir la colonie. Un autre néonicotinoïde, le thiaméthoxame, réduit

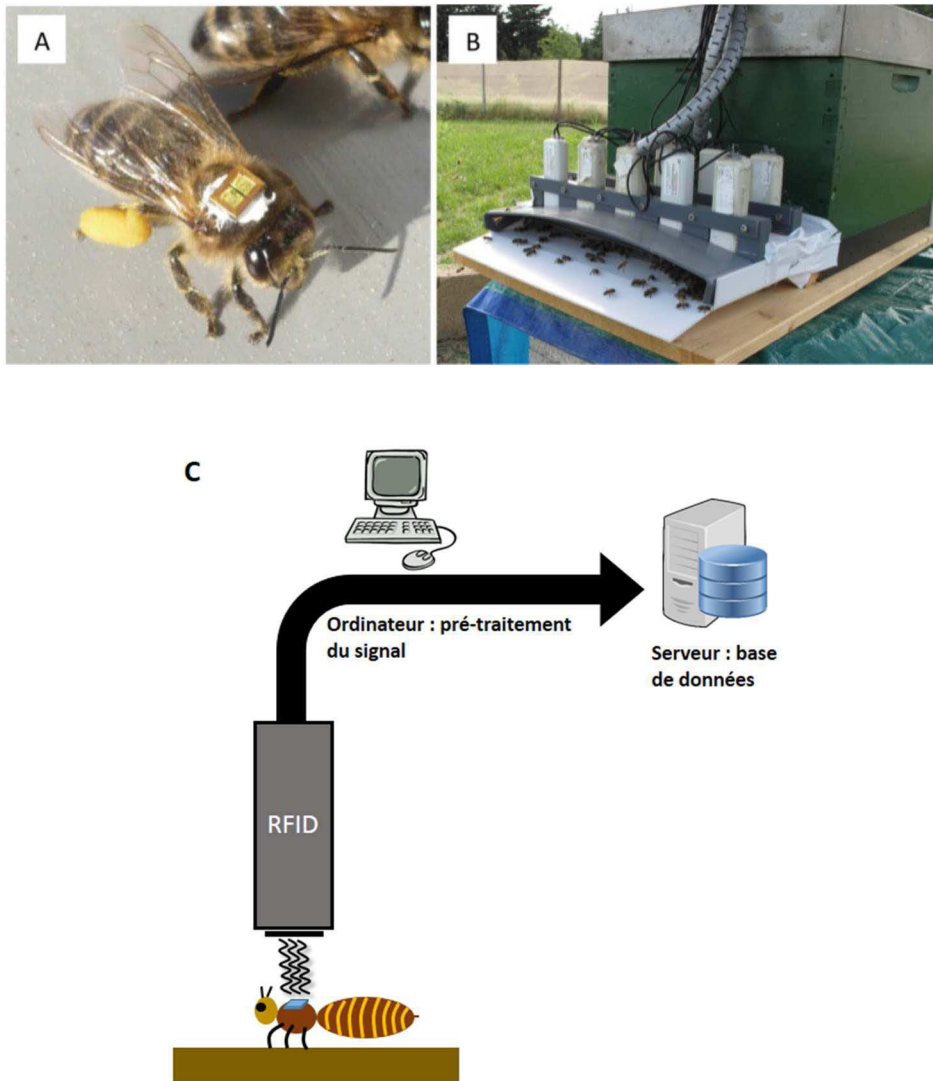


Figure 10. Étude de l'activité de vol des butineuses grâce à l'identification par radio fréquence à l'entrée de la colonie (adapté d'après Streit *et al.*, 2003 ; Henry *et al.*, 2012).

(A) Les balises placées sur le thorax des insectes présentent l'avantage de ne pas modifier le comportement des individus qui les portent grâce à leur taille (1,6 x 1,0 x 0,3 mm) et à leur poids (≤ 3 mg) relativement faibles. (B) Chaque balise est programmée avec un numéro d'identification unique et peut être lue en moins de 50 msec par le lecteur placé à un endroit choisi par le manipulateur, par exemple à l'entrée d'une colonie. (C) Le logiciel de lecture enregistre alors le numéro d'identification, la vitesse et la direction du mouvement, et le temps exact de l'évènement sur une base de données.

aussi la réponse au sucrose lorsque les abeilles absorbent approximativement 1 ng/jour d'insecticide dans le cadre d'une exposition chronique (Aliouane *et al.*, 2009).

Les études visant à déterminer l'impact de pesticides à l'échelle de la colonie sont bien moins nombreuses que celles réalisées à l'échelle individuelle mais certains résultats ont été confirmés à plus grande échelle. Des études de semi-terrain autorisant les butineuses à voler librement sous tunnel ont mis en évidence l'effet sur l'activité de butinage d'une exposition chronique durant 7 jours à l'imidaclopride (24 µg/kg de nourriture) administré par voie orale. Ce traitement diminue significativement l'activité de vol des abeilles (nombre d'abeilles entrant et sortant de la colonie), leur activité de butinage jusqu'au nourrisseur et leur performance d'apprentissage olfactif *via* une étude de discrimination des odeurs (Figure 9) (Decourtye *et al.*, 2004b). L'exposition durant 5 jours à une concentration plus faible d'imidaclopride induit, quant à elle, une diminution nette de la proportion de butineuses actives (Colin *et al.*, 2004).

La technique d'identification par radio fréquence (Radio Frequency IDentification, RFID) permet d'optimiser les études comportementales réalisées sur les insectes en permettant la localisation et l'identification automatiques d'un très grand nombre d'individus (Figure 10) (Streit *et al.*, 2003). Cette technique a montré qu'une intoxication orale aiguë à l'imidaclopride à une dose de 6 ng/abeille a un impact significatif sur le vol de retour à la ruche puisque 25 % des abeilles ne retournent pas à la colonie (Schneider *et al.*, 2012). Ces abeilles désorientées présentent une réduction de leur mobilité avec des tremblements occasionnels. Des doses plus faibles (1,5 et 3 ng/abeille) entraînent une augmentation significative de la durée des vols de butinage, du temps nécessaire pour rejoindre une source de nourriture et de celui nécessaire au retour à la ruche. Ces résultats permettent de montrer l'efficacité de la méthode RFID pour détecter des modifications de l'activité de butinage d'abeilles soumises à de faibles doses d'insecticide.

Fipronil

Le fipronil (0,01 ng/abeille) appliqué de façon chronique sur le thorax des abeilles affecte significativement leur activité locomotrice (Aliouane *et al.*, 2009), ce qui n'avait pas été observé lors d'une application aiguë (El Hassani *et al.*, 2005).

D'après des études de semi-terrain réalisées sous tunnels, l'exposition orale et chronique à une concentration de 2 µg/kg de fipronil, similaire aux quantités parfois détectées à l'intérieur de la colonie (Tableau 1), diminue significativement la proportion de butineuses actives et leur fréquentation de la source de nourriture (Colin *et al.*, 2004). Lorsqu'elles volent, les butineuses associent des signes visuels à une récompense sucrée et elles peuvent utiliser cet apprentissage associatif pour repérer un chemin dans un labyrinthe complexe. Or, l'exposition orale durant 24 h au fipronil (1 µg/kg) aurait un impact important sur ces capacités d'orientation en diminuant

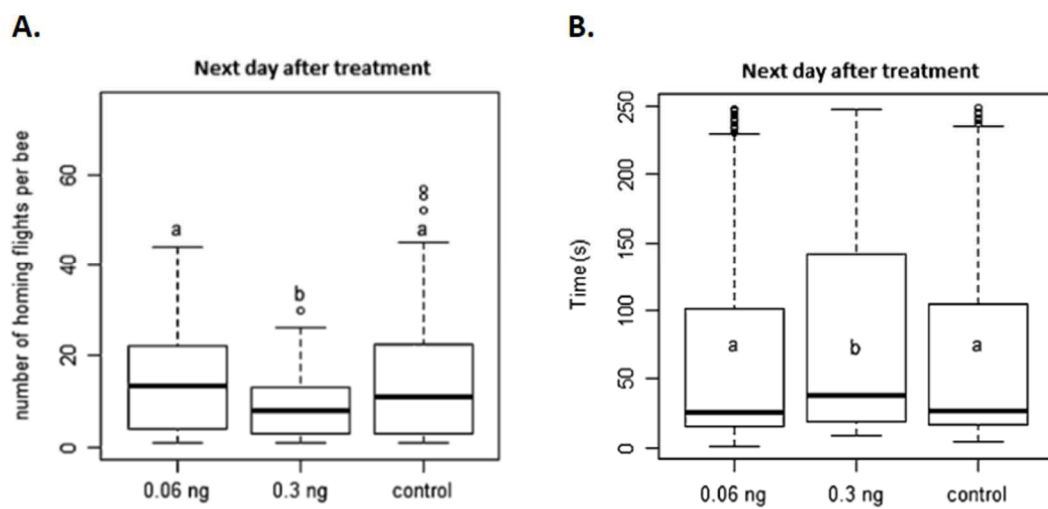


Figure 11. Effet d’une intoxication orale et aiguë au fipronil (0,06 ou 0,3 ng/abeille) sur l’activité de butinage des abeilles 24 h après traitement (d’après Decourtye *et al.*, 2011).

(A) Nombre de vols de butinage par abeille (nombre d’abeilles n= 103, 122, 105). (B) Durée des vols de retour à la ruche (s) (n= 1537, 1791, 891). Des lettres différentes indiquent des différences significatives ($p < 0,025$).

significativement le nombre d'abeilles rentrant dans le labyrinthe pour chercher de la nourriture et en augmentant le taux d'abeilles ne retrouvant pas le bon chemin (Decourtye *et al.*, 2009). Les abeilles traitées sont alors moins nombreuses à retrouver directement le bon chemin vers la récompense et elles mettent significativement plus de temps pour y parvenir.

Une approche de suivi du vol par RFID a également pu être utilisée dans une étude de semi-terrain pour déterminer l'impact d'une intoxication aiguë au fipronil (30 µg/kg soit 0,3 ng/abeille), montrant une réduction significative du nombre de vols effectués par les butineuses (Figure 11.A) (Decourtye *et al.*, 2011). Ce traitement n'a pas d'effet sur le nombre d'abeilles retournant à la ruche mais augmente significativement la durée du vol de retour (Figure 11.B).

2.3.4. Effets des insecticides sur la physiologie de l'abeille

Les pesticides peuvent perturber certaines fonctions physiologiques chez l'abeille, notamment la thermorégulation et l'activité musculaire (Belzunces *et al.*, 2012). La thermorégulation (contrôle de la température corporelle) implique la thermogénèse, par contraction tétanique de muscles alaires, et la thermolyse, par battements des ailes et évaporation de la chaleur, deux processus exercés à l'échelle individuelle et à l'échelle de la colonie (Belzunces *et al.*, 2012). Certains insecticides comme les pyréthriinoïdes peuvent agir sur la thermogénèse. Par exemple, l'exposition à des doses sublétales de deltaméthrine entraîne une hypothermie drastique qui perdure durant plus de 4 h (Vandame & Belzunces, 1998). Cette perturbation de la thermogénèse a également pu être observée avec des pesticides organophosphorés (Belzunces *et al.*, 2012). Les effets des pesticides sur l'activité musculaire des insectes, en particulier des abeilles, sont encore relativement peu étudiés. Pour ce qui est des insecticides, l'association entre la deltaméthrine et le fongicide prochloraze a pour conséquence une rapide diminution de la fréquence et de la force des contractions musculaires d'un cœur d'abeille semi-isolé (Papaefthmiou & Theophilidis, 2001).

2.3.5. Effets des insecticides sur le développement larvaire

De nombreuses études se sont intéressées aux effets des insecticides sur les abeilles adultes mais une toxicité sur le couvain pourrait avoir des conséquences bien plus néfastes sur la survie d'une colonie. Des altérations morphologiques peuvent apparaître, principalement au niveau intestinal, à la suite de l'exposition orale à un insecticide, révélant ainsi l'action d'une molécule neurotoxique sur un organe qui ne constitue pas sa cible principale. Les cellules intestinales de larves traitées durant 6 jours avec une concentration de 1 µg/g de fipronil présentent une vacuolisation de leur cytoplasme, un réticulum endoplasmique dilaté et fragmenté, et des noyaux pycnotiques indiquant une activité transcriptionnelle faible. L'ensemble de ces éléments, ainsi que le détachement important de cellules

entières dans la lumière de l'intestin, suggèrent des processus de nécrose et d'apoptose (da Silva Cruz *et al.*, 2010). Le rôle d'autres pesticides, parmi lesquels l'imidaclopride, dans l'induction de l'apoptose chez des larves traitées a été confirmé (Gregorc & Ellis, 2011).

Les néonicotinoïdes peuvent également agir sur le temps de développement larvaire. Ainsi, le temps nécessaire à l'émergence de larves nourries avec de la nourriture contaminée à l'imidaclopride (5 µg/kg) est significativement allongé (Decourtye & Devillers, 2010; Blacquièrre *et al.*, 2012). Un tel retard de développement a été confirmé chez des larves de l'abeille solitaire *Osmia lignaria* exposées à l'imidaclopride (30 – 300 µg/kg) (Abbott *et al.*, 2008). De plus, l'exposition à du sirop (10 µg/kg d'imidaclopride) et à du pollen (6 µg/kg d'imidaclopride) contaminés réduit le nombre de larves produites dans les colonies du bourdon *Bombus terrestris* (Tasei *et al.*, 2001).

2.3.6. Immunotoxicité des pesticides

L'immunotoxicité peut être définie comme un effet négatif sur des composants du système immunitaire, qu'il en résulte ou non une altération de la résistance de l'hôte (Galloway & Handy, 2003). L'immunotoxicité induite par les pesticides est classiquement étudiée chez l'Homme et dans une moindre mesure chez les poissons. En revanche, peu de données sont actuellement disponibles chez les invertébrés. L'exposition de certaines espèces d'annélides du genre *Eisenia* à des pesticides utilisés en agriculture (organosphosphates et carbamates) a pour conséquence une diminution de l'activité immunitaire (Galloway & Depledge, 2001). Par exemple, le carbamate carbaryl inhibe l'activité lysozymale et la phagocytose chez *Eisenia fetida andrei*.

Certains pesticides peuvent également agir sur le système immunitaire des insectes en augmentant ou en diminuant leurs capacités de défense (Desneux *et al.*, 2007; Garrido *et al.*, 2013). Chez les abeilles, les études sont peu nombreuses et aucune n'a été réalisée sur l'effet des néonicotinoïdes ou des phénylpyrazoles. L'exposition de larves à des fongicides (myclobutanil ou chlorothalonil) a pour conséquence une diminution de l'expression du gène codant pour une enzyme activant la prophénoloxydase, enzyme clé de la réaction de mélanisation (Gregorc *et al.*, 2012). Certaines molécules acaricides ajoutées dans les colonies pour lutter contre *V. destructor* peuvent également modifier l'expression de certains gènes impliqués dans l'immunité cellulaire (ex : prophénoloxydase) ou humorale (ex : peptides antimicrobiens) (Boncristiani *et al.*, 2012; Garrido *et al.*, 2013). De tels effets sur l'expression de gènes impliqués dans l'immunité de l'abeille pourraient avoir un impact indirect sur sa santé, notamment en augmentant sa sensibilité à de nombreux agents pathogènes.

2.3.7. Impact de doses considérées comme sublétales sur la mortalité des abeilles

De faibles doses, considérées comme sublétales par des études antérieures, peuvent cependant entraîner une mortalité non négligeable des individus après une exposition de longue durée. Ainsi, l'exposition orale durant 11 jours à des concentrations de fipronil comprises entre 2,2 µg/L et 9 µg/L de sucrose augmente significativement la mortalité des abeilles par rapport aux individus non exposés, jusqu'à un taux de 91,1 % pour la concentration la plus forte (Decourtye *et al.*, 2005). Ces concentrations correspondent pourtant à des doses journalières ingurgitées au moins 20 fois inférieures à la DL50 du fipronil. D'après une étude plus récente, l'exposition chronique à une dose de 0,1 ng/abeille (DL50/50) de fipronil entraîne une mortalité de 100 % en seulement 7 jours (Aliouane *et al.*, 2009). Dans les études de toxicité orale et chronique, le néonicotinoïde imidaclopride produit le même effet léthal que des intoxications aiguës mais à des doses 60 à 6000 fois inférieures (Suchail *et al.*, 2001). Par conséquent, certaines concentrations d'insecticides peuvent devenir létales en fonction du mode d'administration et surtout de la durée d'exposition. L'absence d'effets létaux lors des tests réglementaires n'indiquerait donc pas l'absence d'effets potentiellement létaux de doses plus faibles lors d'exposition à plus long terme.

Des doses de pesticides, supposées sublétales, peuvent aussi avoir un effet léthal non négligeable lors de l'exposition combinée à plusieurs molécules. Ainsi, la pulvérisation simultanée de doses considérées comme sublétales de l'insecticide deltaméthrine et du fongicide prochloraz produit un effet synergique sur la mortalité des abeilles (Colin & Belzunces, 1992). L'effet synergique sur la mortalité des abeilles a également été observé avec deux molécules acaricides, le coumaphos et le τ-fluvalinate (Johnson *et al.*, 2009). Il apparaît dès lors important de considérer l'impact potentiel de faibles doses d'insecticides en combinaison avec d'autres molécules chimiques au cours des tests de réglementation, notamment dans le contexte réaliste de l'exposition des abeilles à de nombreux composés au sein des colonies (→ 2.2.2.).

Les effets toxiques des insecticides sur l'abeille mellifère cités précédemment ne sont pas exhaustifs. Toutefois, ils nous permettent d'affirmer que le degré de sensibilité des abeilles aux insecticides dépend de nombreux facteurs parmi lesquels la dose d'insecticide testée (da Silva Cruz *et al.*, 2010; Schneider *et al.*, 2012), la voie d'administration (Tableau 2) (El Hassani *et al.*, 2005; Aliouane *et al.*, 2009), le facteur temporel (Decourtye *et al.*, 2004a; Yang *et al.*, 2008), l'âge de l'abeille (Guez *et al.*, 2001), la saison considérée (Decourtye *et al.*, 2003), mais aussi le nombre de molécules considérées (Colin & Belzunces, 1992). La toxicité des pesticides dépend également des mécanismes de défense que l'organisme met en place lorsqu'il subit une intoxication.

Tableau 3. Nombre d'enzymes appartenant aux superfamilles des glutathion-S-transférases (GST), cytochromes P450 monooxygénases (CYP) et carboxyl/cholinestérases (CCE) chez les insectes à partir des génomes de *Drosophila melanogaster* (drosophile), *Anopheles gambiae* (moustique) et *Apis mellifera* (abeille). (d'après Claudianos *et al.*, 2006).

Superfamille	<i>D. melanogaster</i>	<i>A. gambiae</i>	<i>A. mellifera</i>
GST	38	31	10
CYP	85	106	46
CCE	35	51	24
Total	158	188	80

2.4. Mécanismes de détoxification chez l'abeille domestique

2.4.1. Les trois phases de la détoxification

La capacité des organismes à métaboliser et dégrader des molécules toxiques est d'une importance considérable pour leur survie dans un environnement chimique défavorable. Le métabolisme des xénobiotiques est souvent divisé en 3 phases : modification, conjugaison et excrétion (Jeffery, 2007; Croom, 2012). Les enzymes impliquées dans la détoxification sont nombreuses, rapidement inductibles, et possèdent des spécificités de substrats croisées.

La phase I de la détoxification implique des modifications chimiques aux xénobiotiques (oxydation, réduction, hydrolyse, ...) qui modifient leur activité et donc leur toxicité. Des acteurs majeurs de la phase I sont les cytochromes P450 (CYP), des oxydases retrouvées dans l'ensemble du vivant (Terriere, 1984; Jeffery, 2007). Certaines enzymes CYP peuvent être responsables de la bioactivation de xénobiotiques en composés plus toxiques, avec des conséquences nuisibles pour l'organisme.

Cette biotransformation est suivie de la conjugaison (phase II) au cours de laquelle la molécule chimique est conjuguée avec un composé endogène, ce qui rend la substance généralement plus hydrophile et facilite son excrétion (Terriere, 1984; Jancova *et al.*, 2010; Croom, 2012). Les voies majeures de la phase II sont la glucuronidation, la sulfatation, la conjugaison avec le glutathion, l'acétylation et la méthylation (Jeffery, 2007). La majorité des enzymes impliquées dans la phase II correspond à des transférases : glutathion-S-transférases (GST), sulfotransférases, N-acétyltransférases, méthyltransférases et UDP-glucuronosyltransférases (Jancova *et al.*, 2010).

L'excrétion des métabolites produits (phase III) est réalisée par des protéines inductibles telles que les multidrug resistance-associated proteins (MRP) qui sont des protéines transmembranaires faisant partie de la superfamille des transporteurs à ATP (ATP binding cassette, ABC) (Jeffery, 2007).

2.4.2. La détoxification chez l'abeille

Les protéines associées aux phases I et II présentées précédemment sont directement impliquées dans le métabolisme des xénobiotiques chez les insectes et l'altération de leur taux et/ou de leur activité dans l'organisme contribue à la grande majorité des mutations conférant la résistance aux insecticides chimiques (Hemingway *et al.*, 2004). D'après une étude de génomique comparative, il y a significativement moins de gènes codant pour les enzymes des superfamilles GST, CYP, et carboxyl/cholinestérases (CCE, des enzymes de phase I) chez l'abeille que chez la drosophile (*Drosophila melanogaster*) ou le moustique (*Anopheles gambiae*) (Tableau 3) (Claudianos *et al.*, 2006). Par exemple, les gènes codant pour les CYP sont environ deux fois moins nombreux dans le

génomique d'*A. mellifera* que dans ceux de *D. melanogaster* et *A. gambiae*. De plus, les enzymes sont regroupées en clades n'ayant pas les mêmes fonctions biologiques au sein de ces superfamilles et il est très probable que le nombre d'enzymes réellement impliquées dans la détoxification soit encore plus limité chez l'abeille (Claudianos *et al.*, 2006). Ce déficit en enzymes GST, CYP et CCE chez l'abeille pourrait traduire des capacités de détoxification moindres.

Quelques données suggèrent que les CYP jouent un rôle important dans la détoxification de certains pesticides chez l'abeille (Iwasa *et al.*, 2004). La moindre toxicité de certains néonicotinoïdes comme l'acétamipride et le thiaclopride par rapport à d'autres molécules comme l'imidaclopride serait due aux CYP qui métaboliseraient plus efficacement ces deux insecticides (Iwasa *et al.*, 2004). Une autre étude montre que les enzymes de la sous-famille des CYP9Q sont responsables du métabolisme des acaricides τ -fluvalinate et coumaphos et que différents pesticides entraînent des inductions différentielles de ces mêmes enzymes (Mao *et al.*, 2011). Les facteurs génétiques et environnementaux peuvent moduler le métabolisme des xénobiotiques (Jeffery, 2007) et le régime alimentaire de l'abeille pourrait jouer un rôle sur sa capacité de détoxification, puisque les enzymes CYP peuvent être induites par certains constituants du miel et du pollen (Mao *et al.*, 2011, 2013). Plusieurs facteurs environnementaux pourraient donc interagir et moduler les capacités de détoxification de l'abeille.

3. Le parasite microsporidien *Nosema ceranae*

3.1. Les microsporidies

Les microsporidies sont des eucaryotes unicellulaires à très large spectre d'hôtes, considérés comme ubiquitaires, infectant les animaux et connues pour être responsables de maladies humaines (Vávra & Lukeš, 2013). Ces parasites infectent notamment certaines espèces animales d'importances économique et commerciale majeures comme l'abeille domestique (avec *Nosema ceranae* et *Nosema apis*), le ver à soie (*Nosema bombycis*), le saumon (*Paranucleospora theridion*) et certains mammifères domestiques (Keeling, 2009). C'est chez les insectes et les poissons que les microsporidies ont été le plus souvent observées et par conséquent étudiées. À ce jour, plus de 1300 espèces ont été décrites et répertoriées dans 187 genres (Vávra & Lukeš, 2013).

Dans certains cas, une altération des défenses immunitaires de l'hôte peut conduire à une forte colonisation de l'hôte par un parasite opportuniste associée à des conséquences délétères. Le caractère

opportuniste des microsporidies est notamment documenté chez les humains atteints du SIDA (syndrome de l'immunodéficience acquise) ou sévèrement immunodéprimés chez qui des infections mineures peuvent très rapidement s'aggraver et devenir mortelles (Didier, 2005; Didier & Weiss, 2008; Vávra & Lukeš, 2013). Certaines espèces microsporidiennes peuvent également se comporter en parasites opportunistes en infectant des hôtes atypiques, différents de leur hôte d'origine (Vávra & Lukeš, 2013). Ces espèces possèdent des spectres d'hôtes variables puisqu'elles sont capables d'infecter des organismes sensiblement différents. Ainsi, près d'une dizaine d'espèces infectant l'homme ne serait pas spécifique des mammifères mais plutôt acquise par l'homme à partir d'autres hôtes, notamment des insectes (Vávra & Lukeš, 2013). À titre d'exemple, *N. ceranae* est capable d'infecter l'abeille européenne *A. mellifera* mais également d'autres espèces d'abeilles (*Apis cerana*, *Apis florea*, *Apis dorsata*, *Apis koschevnikovi*) (Suwannapong *et al.*, 2010; Botías *et al.*, 2012a; Chaimanee *et al.*, 2013) et certaines espèces de bourdons (*Bombus atratus*, *Bombus morio*, *Bombus bellicosus*, *Bombus terrestris*) (Plischuk *et al.*, 2009; Graystock *et al.*, 2013).

3.1.1. Une phylogénie encore controversée

Les caractères structuraux et la biologie des microsporidies étant uniques, leur parenté phylogénétique avec d'autres organismes a été continuellement débattue depuis leur découverte. Après avoir été assimilées à des levures lors de leur découverte en 1857, les microsporidies furent considérées comme des eucaryotes primitifs car dépourvues d'organites (mitochondries, peroxyosomes) considérés comme quasi-universels chez les eucaryotes (Didier & Weiss, 2006; Keeling, 2009). Si les premières phylogénies moléculaires ont d'abord étayé cette origine ancienne, la prise en compte d'un plus grand nombre de gènes a permis l'émergence d'une nouvelle hypothèse : celle de la parenté des microsporidies avec les champignons (Didier & Weiss, 2006; Keeling, 2009). Bien que cette parenté soit généralement acceptée, la nature exacte de la relation entre microsporidies et champignons reste à préciser : les microsporidies sont-elles des champignons *sensu stricto*, dérivent-elles d'un groupe fongique spécifique, ou s'agit-il d'un groupe frère des champignons (Vávra & Lukeš, 2013) ?

3.1.2. Cycle de vie

Assez peu de données sont disponibles quant au cycle de vie de *N. ceranae* chez son hôte. De nombreuses parts d'ombre persistent et il est nécessaire de s'appuyer sur les caractéristiques connues chez d'autres espèces microsporidiennes pour comprendre le cycle de vie de ce parasite.

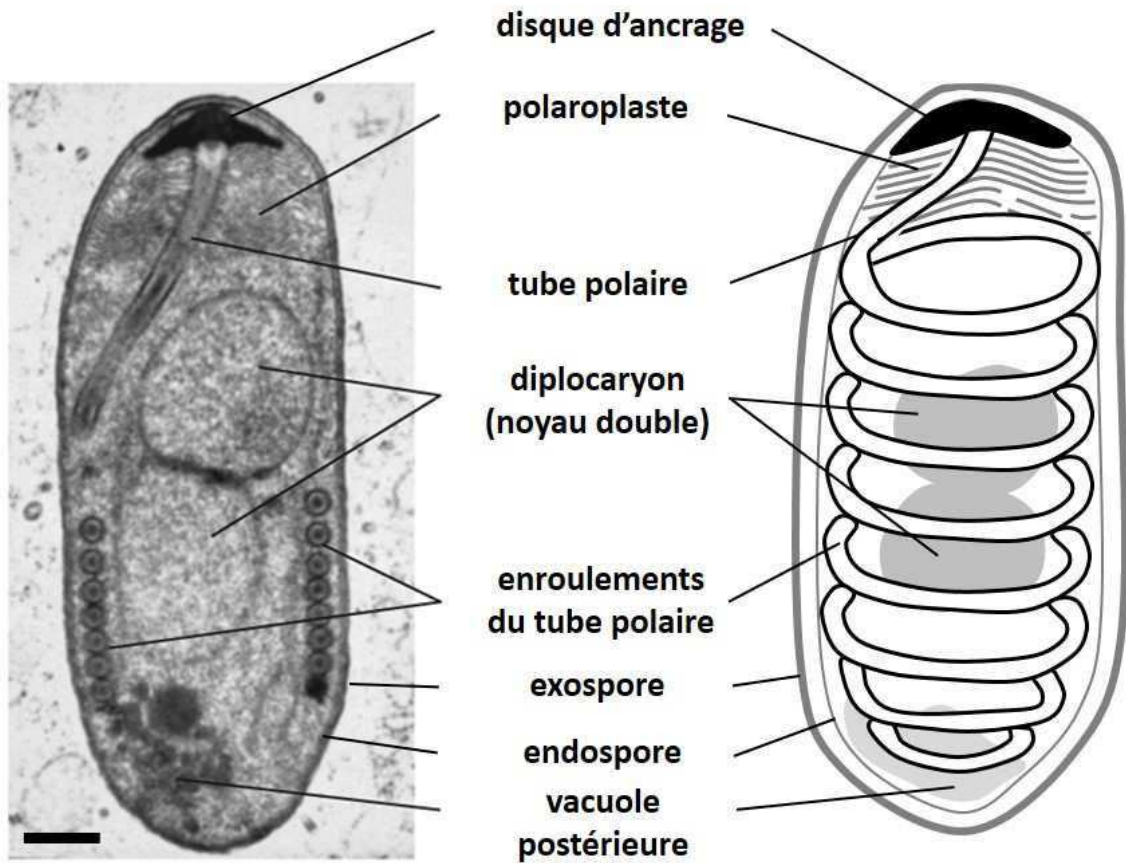


Figure 12. Structure d'une spore de *N. ceranae*.

Photographie d'une spore en microscopie électronique à transmission (à gauche, barre = 0,5 μm ; Solter, 2010) et schéma (à droite) montrant les différents organites et structures constituant une spore de *N. ceranae*.

Les microsporidies survivent dans l'environnement sous la forme de spores particulièrement résistantes. Grâce à leurs spores, ces parasites résistent durant de longues périodes aux variations de nombreux paramètres physico-chimiques comme la température (Amigó *et al.*, 1996; Fayer, 2004). La viabilité des spores de *N. ceranae* est par exemple maintenue lors de traitements à 35 et à 60 °C suggérant une bonne résistance à de fortes températures (Fenoy *et al.*, 2009). Toutefois, des traitements à de très basses températures telles que la congélation à -20 °C peuvent réduire significativement la viabilité des spores (Fenoy *et al.*, 2009). Les spores des microsporidies sont de différentes tailles en fonction de l'espèce, de 1 µm pour *Enterocytozoon bieneusi* à 40 µm pour *Bacillidium filiferum*, et de différentes formes bien que la plupart soient ovales (Keeling & Fast, 2002). Les spores des microsporidies infectant l'abeille mellifère sont ovales et relativement petites, celles de *N. apis* (6 x 3 µm) étant légèrement plus grandes que celles de *N. ceranae* (4,4 x 2,2 µm) (Fries *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 2009). La spore est entourée d'une membrane et d'une paroi extracellulaire rigide composée de deux couches : l'exospore, matrice glycoprotéique et fibreuse dense, et l'endospore, matrice mince protéique principalement composée de chitine (Figure 12).

L'intérieur de la spore renferme le sporoplasme (cytoplasme de la spore) qui correspond au matériel infectieux des microsporidies (Keeling & Fast, 2002). Le sporoplasme des microsporidies contient un noyau mais certaines espèces comme *N. apis* et *N. ceranae* possèdent deux noyaux étroitement associés en diplocaryon (Fries *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 2009). Le sporoplasme est également constitué du polaroplasme (structure membranaire située dans la partie antérieure de la spore), d'une vacuole postérieure et d'un tube polaire (Figure 12) (Vávra & Lukeš, 2013). Structure caractéristique de l'ensemble des microsporidies, le tube polaire est une structure de nature glycoprotéique, attaché à l'apex de la spore par le disque d'ancrage puis enroulé en hélices dans le sporoplasme. Le nombre d'enroulements (20-23 pour *N. ceranae*, plus de 30 pour *N. apis*), leur disposition ainsi que leur angle d'inclinaison sont bien conservés au sein d'une même espèce et constituent des caractères taxonomiques (Fries *et al.*, 1996; Keeling & Fast, 2002).

Les microsporidies sont des parasites intracellulaires obligatoires mais de nombreuses questions restent encore sans réponse quant à leur distribution au sein de leur hôte et à leur spécificité tissulaire (Vávra & Lukeš, 2013). Dans le cas de l'infection par *N. ceranae*, l'abeille adulte se contamine en ingérant des spores puis le parasite effectue son cycle de développement dans l'intestin moyen, à l'intérieur même des cellules épithéliales (Higes *et al.*, 2010). La présence de *N. ceranae* a également été détectée par PCR dans d'autres tissus des ouvrières : les glandes hypopharyngées, mandibulaires et salivaires, les tubes de Malpighi, le corps gras et le sac à venin (Chen *et al.*, 2009; Copley & Jabaji, 2012). Toutefois, malgré la détection moléculaire du parasite dans différents tissus,

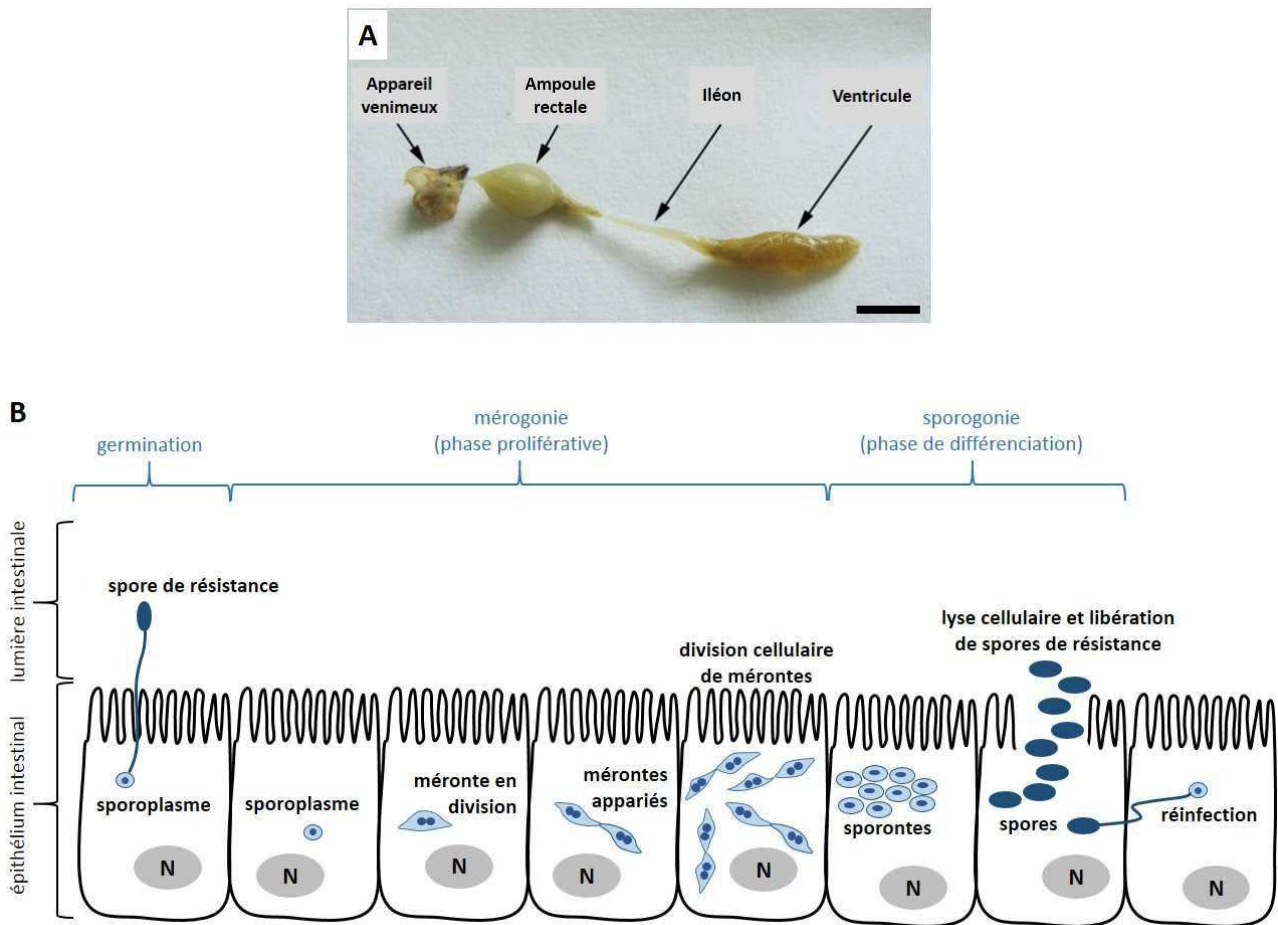


Figure 13. Cycle de vie hypothétique de *N. ceranae* à l'intérieur des cellules épithéliales de l'abeille.

(A) Après avoir migré vers la partie postérieure du tractus digestif de l'abeille, le parasite *N. ceranae* se multiplie dans les cellules du ventricule, également appelé intestin moyen (barre = 2 mm ; Dade, 2009). (B) Le cycle de vie est divisé en trois phases distinctes : la germination (phase infectieuse) caractérisée par la dévagination du tube polaire et l'injection du sporoplasme dans le cytoplasme de la cellule hôte ; la mérogonie (phase proliférative) où les mérontes se multiplient ; et la sporogonie (phase de différenciation) où les mérontes se différencient en sporoblastes, en sporontes et enfin en spores matures. En ce qui concerne l'espèce *N. ceranae*, le développement intracellulaire a lieu en contact direct avec le cytoplasme de la cellule hôte.

des analyses microscopiques n'ont pas confirmé la présence de spores ou de stades de développement intracellulaires dans d'autres tissus que le tractus digestif (Huang & Solter, 2013).

Le processus d'invasion débute par une phase de germination au cours de laquelle la spore microsporidienne dévagine son tube polaire ce qui permet le transfert du matériel infectieux, le sporoplasme, jusqu'au cytoplasme de la cellule cible (Figure 13). L'initiation du processus de germination est encore mal connue mais serait induite par des conditions environnementales particulières (modification du pH, concentration en anions et en cations...). Suite à l'un de ces stimuli, l'augmentation de la pression osmotique à l'intérieur de la spore suivie par un influx rapide d'eau grâce à des aquaporines de la membrane cellulaire permettrait la dévagination du tube polaire et le transfert du sporoplasme dans la cellule hôte (Keeling & Fast, 2002; Williams, 2009; Texier *et al.*, 2010). Ces deux processus sont extrêmement rapides et quasi impossibles à observer en temps réel. Le mécanisme par lequel le tube polaire pénètre la cellule hôte n'est pas clair. Selon l'hypothèse privilégiée, le tube polaire percerait la membrane de la cellule hôte à la manière d'une seringue pour injecter le sporoplasme dans le cytoplasme de celle-ci (Franzen, 2005). Cependant, d'autres études suggèrent que l'invasion des cellules s'effectuerait par endocytose ou phagocytose de la spore et que la dévagination du tube polaire permettrait ensuite au parasite d'échapper aux phagosomes (Figure 14).

Le cycle de multiplication intracellulaire peut être divisé en deux phases distinctes, la première étant une phase de prolifération, appelée mérogonie, suivie d'une phase de différenciation ou phase de formation de spores, la sporogonie (Figure 13). Au cours de la mérogonie, les parasites se multiplient soit au contact direct du cytoplasme de la cellule hôte, ce qui est par exemple le cas de *N. ceranae*, soit à l'intérieur d'un compartiment appelé vacuole parasitophore (Higes *et al.*, 2010; Vávra & Lukeš, 2013). À ce stade, le parasite est appelé méronte et prend une forme allongée de ruban qui se divise par fission cytoplasmique. Des mérontes appariés se forment alors et continuent à se diviser de la même façon. Le nombre de cycles de division peut varier et reste à déterminer chez *N. ceranae* (Fries *et al.*, 1996; Higes *et al.*, 2010). Lors de cette phase, le parasite induit des changements significatifs de réorganisation dans la cellule hôte qui commence à s'élargir. Dans la cellule hôte, les mérontes en multiplication sont alors entourés de nombreuses mitochondries, ces dernières étant une source d'ATP pour les parasites qui sont justement dépourvus d'organites producteurs d'énergie (Keeling & Fast, 2002; Higes *et al.*, 2007).

Au cours de la sporogonie, les parasites, nommés sporontes, se différencient en sporoblastes à la suite d'une ultime division. Les différentes structures impliquées dans le mécanisme de germination, le tube polaire, le polaroplaste et la vacuole postérieure, sont alors formées. L'épaississement progressif de la membrane des sporoblastes avec le développement de l'endospore riche en chitine indique la formation de spores matures (Keeling & Fast, 2002). Quelques espèces

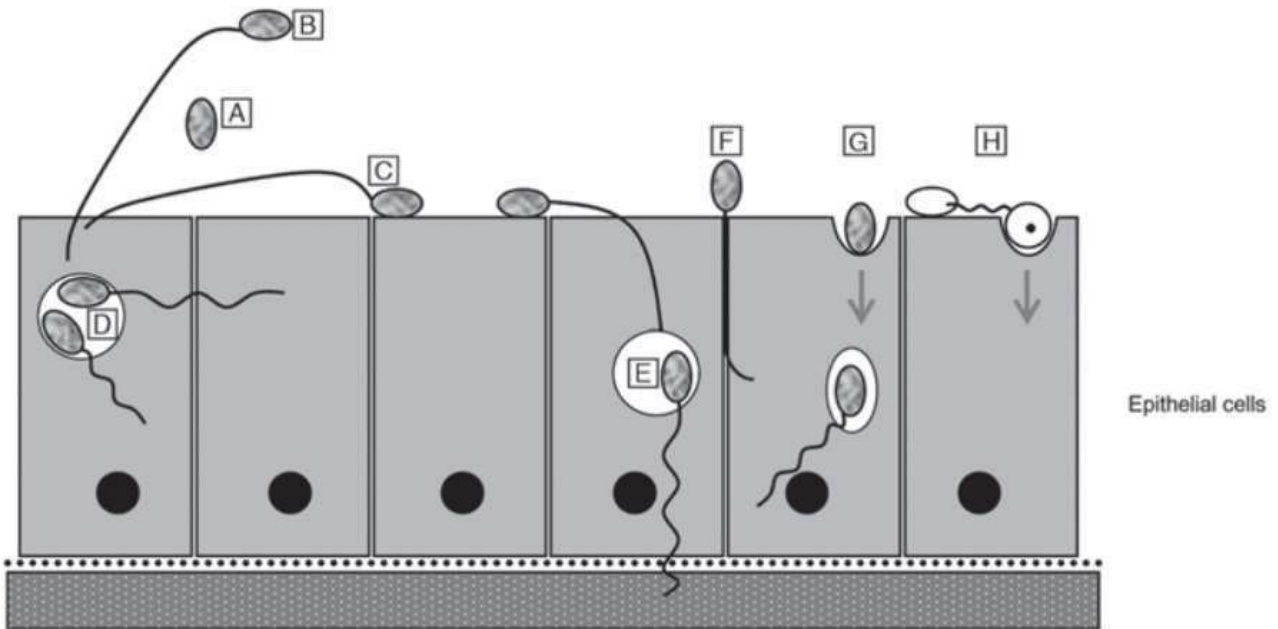


Figure 14. Mécanismes hypothétiques d'invasion cellulaire chez les microsporidies (d'après Delbac et Polonais, 2008).

A. Spore microsporidienne libre avant dévagination. B. Perforation de la membrane de la cellule hôte par le tube polaire et injection du sporoplasme directement dans le cytoplasme de la cellule. C. Interaction entre la spore microsporidienne et la membrane cellulaire, extrusion du tube polaire, et injection du sporoplasme dans la cellule hôte. D. Infection secondaire de la même cellule ou d'une cellule adjacente à parti d'une vacuole parasitophore. E. Infection secondaire d'une cellule ou d'un tissu sous-jacent. F. Pénétration basolatérale impliquant le passage au travers des jonctions intercellulaires. G. Phagocytose d'une spore suivie de la dévagination du tube polaire et de la libération du sporoplasme pour échapper au phagosome avant sa maturation en lysosome. H. Phagocytose du sporoplasme extracellulaire préalablement libéré.

microsporidiennes, parmi lesquelles *N. ceranae* et *N. apis*, produisent des spores auto-infectieuses, capables de germination intracellulaire permettant la transmission horizontale entre cellules épithéliales voisines (Figure 13) (Higes *et al.*, 2007, 2010). Ce mode de germination favoriserait la dissémination intra-tissulaire du parasite. Plus couramment, des spores matures sont libérées dans la lumière de l'intestin à la lyse de la cellule hôte puis dans l'environnement via les fèces de l'abeille (Figure 13). L'observation de spores matures de *N. ceranae* dans les cellules intestinales de l'abeille 3 jours après infection suggère un développement rapide du parasite, finalisé en seulement 72 h (Higes *et al.*, 2007). L'infection naturelle par *N. ceranae* conduit souvent à la production de plusieurs millions voire plusieurs dizaines de millions de spores matures au sein d'un même individu (Paxton *et al.*, 2007; Higes *et al.*, 2008a; Mulholland *et al.*, 2012; Smart & Sheppard, 2012).

3.1.3. Les génomes microsporidiens reflètent une forte dépendance envers leur hôte

La simplification structurale des cellules microsporidiennes se reflète également dans la réduction et la compaction à l'échelle moléculaire, évidentes au niveau des génomes. Les microsporidies ont d'ailleurs été adoptées par les scientifiques comme modèles d'étude de génomes eucaryotes extrêmement réduits. Le génome (2,9 Mb) d'une microsporidie infectant l'Homme, *Encephalitozoon cuniculi*, a notamment été le premier génome d'un eucaryote parasite entièrement séquencé (Katinka *et al.*, 2001). Les génomes des microsporidies sont le plus souvent de taille réduite, avec un minimum de 2,3 Mb pour l'espèce *Encephalitozoon intestinalis* (environ 2000 protéines codées), une taille inférieure à celle de nombreux génomes bactériens. Ces génomes sont généralement très compacts, contiennent des régions intergéniques courtes et très peu de séquences répétées (Keeling, 2009). Les séquences des gènes codants sont elles-mêmes relativement courtes et possèdent peu voire pas d'introns. La forte promiscuité des gènes semble même avoir un effet sur la transcription puisque de nombreux transcrits chevauchants des gènes voisins ont pu être identifiés dans différents génomes microsporidiens. Ainsi, un ARNm peut correspondre aux séquences de plus d'un gène, bien qu'un seul n'apparaisse réellement traduit (Keeling, 2009). Certains génomes microsporidiens font figure d'exception avec des tailles beaucoup plus grandes, jusqu'à 24 Mb pour *Hamiltosporidium tvaerminnensis* et *Octosporea bayeri* (Corradi *et al.*, 2009; Williams, 2009; Peyretailade *et al.*, 2012; Vávra & Lukeš, 2013). Ces derniers ne contiennent pas nécessairement plus de gènes codants que les génomes plus réduits. Cette variation en taille serait majoritairement attribuable à des régions intergéniques aux longueurs variables et aux nombres de séquences répétées et d'éléments transposables (Peyretailade *et al.*, 2012).

Le séquençage récent des génomes d'une dizaine d'espèces microsporidiennes a permis d'améliorer les connaissances sur la physiologie, la biochimie et l'évolution des microsporidies.

D'après les données génomiques, le métabolisme du carbone chez les microsporidies serait limité à la glycolyse, à la voie des pentoses phosphate et à la synthèse/dégradation du tréhalose (Keeling & Corradi, 2011). Les microsporidies possèdent des mitosomes, comparables à des reliquats de mitochondries, avec un peu moins de 20 protéines mitosomales actuellement identifiées. Les mitosomes ne contiennent pas de génome et aucune protéine impliquée dans le cycle de Krebs ou dans la phosphorylation oxydative (Keeling, 2009; Vávra & Lukeš, 2013). Ils possèdent en revanche des protéines impliquées dans l'assemblage des complexes Fe-S, qui interviennent dans des réactions d'oxydo-réductions (Vávra & Lukeš, 2013). L'identification et la localisation dans les mitosomes de protéines telles que des oxydases alternatives (AOX) et des glycérol-phosphate déshydrogénases (GDPH) suggèrent l'implication de ces organites dans la réoxydation de composés réduits produits par la glycolyse (Vávra & Lukeš, 2013).

Du point de vue évolutif, il est probable que des pertes de gènes responsables de la relative pauvreté des génomes microsporidiens soient la conséquence du parasitisme intracellulaire. Cependant, l'évolution de ces génomes n'a pas été seulement marquée par des pertes et des réductions, car certains gènes ou familles protéiques d'intérêt pour le parasite auraient pu être acquis par transfert horizontal de gènes à partir de procaryotes ou dans de plus rares cas à partir d'hôtes animaux (Vávra & Lukeš, 2013).

Les petits génomes microsporidiens suggèrent un fort degré de dépendance envers la cellule hôte en termes de besoins énergétique et métabolique ; ils codent par exemple pour divers transporteurs membranaires. En plus des aquaporines et des transporteurs d'ATP précédemment mentionnés, les génomes microsporidiens codent pour des protéines impliquées dans le transport d'ions, de sucres, d'acides aminés, d'oligopeptides et de phospho-amino-lipides ainsi que des transporteurs ABC (Williams, 2009; Peyretailade *et al.*, 2012). De plus, des données récentes suggèrent que les gènes codant pour des hexokinases, enzymes catalysant la conversion du glucose en glucose-6-phosphate, contiendraient des signaux de sécrétion chez plusieurs espèces microsporidiennes dont *N. ceranae* (Cuomo *et al.*, 2012). Ainsi, durant l'infection ces enzymes pourraient être sécrétées dans le cytoplasme de la cellule hôte où elles seraient idéalement situées pour amplifier la production cellulaire de métabolites pouvant être utilisés par le parasite en développement.

Les génomes de *N. ceranae* (7,7 Mb) et de *N. apis* (8,5 Mb) contiennent respectivement 2342 et 2771 gènes codants ainsi que de faibles pourcentages en bases GC (respectivement 26 et 19 %), cette dernière caractéristique étant retrouvée chez d'autres espèces microsporidiennes (Cornman *et al.*, 2009; Peyretailade *et al.*, 2012; Pan *et al.*, 2013). Les génomes du genre *Nosema* semblent être beaucoup moins compacts que ceux d'autres espèces microsporidiennes comme celles du genre *Encephalitozoon* (Pan *et al.*, 2013). Une large fraction du génome de *N. ceranae* correspondrait à des

catégories de gènes liés à la croissance du parasite tandis qu'une fraction plus réduite serait consacrée au transport et à la réponse au stimuli chimiques (Cornman *et al.*, 2009). Au sein du protéome prédit, 89 protéines présenteraient des peptides signaux faisant d'elles des protéines potentiellement sécrétées pouvant interagir avec l'hôte (Cornman *et al.*, 2009). Près de la moitié des gènes codants présentent de fortes similarités avec le génome d'*E. cuniculi* (Cornman *et al.*, 2009). De plus, les nombreux groupes de protéines orthologues partagés par *N. ceranae* et *N. apis* ainsi que les voies biochimiques similaires codées par les génomes suggèrent l'existence de fonctions conservées au sein du genre *Nosema* (Pan *et al.*, 2013). Toutefois, les enzymes clés impliquées dans le transport lié aux besoins énergétiques et dans les processus métaboliques sont plus représentées chez *N. ceranae* que chez *N. apis*, de même que les protéines liées à la réponse au stress (Pan *et al.*, 2013).

Du point de vue du parasitisme et de la biologie de l'évolution, les microsporidies représentent des modèles fascinants pour mieux comprendre divers aspects tels que la manipulation de la cellule hôte, les interactions moléculaires hôte-parasite ou encore l'adaptation extrême à un environnement intracellulaire. Malheureusement, les microsporidies se montrent récalcitrantes aux techniques de manipulation génétique, ce qui limite leur étude, notamment l'investigation de fonctions de gènes spécifiques (Williams, 2009). De plus, certaines espèces comme *N. ceranae* et *N. apis* sont encore difficilement maintenues en culture cellulaire, ce qui freine leur étude *in vitro*.

3.2. L'infection des colonies d'*Apis mellifera* par *N. ceranae*

3.2.1. Deux espèces microsporidiennes, N. ceranae et N. apis, infectent l'abeille

L'espèce microsporidienne *N. apis* est connue pour infecter l'abeille européenne *A. mellifera* depuis plus d'un siècle (Zander, 1909). En 2005, des échantillonnages en Espagne et à Taiwan ont montré que cette espèce d'abeille peut être infectée par une seconde espèce microsporidienne, *N. ceranae* (Higes *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2007). Des études ultérieures ont suggéré que *N. ceranae* était présente dans des échantillons d'*A. mellifera* plus anciens, depuis au moins 1998 en Europe (Paxton *et al.*, 2007), 1995 aux États-Unis (Chen *et al.*, 2008), et même 1990 en Uruguay (Invernizzi *et al.*, 2009). L'espèce *N. ceranae* a initialement été décrite en Chine chez l'abeille asiatique *Apis cerana* (Fries *et al.*, 1996). *N. ceranae* aurait récemment effectué un saut d'espèce de l'abeille asiatique vers l'abeille européenne (Botías *et al.*, 2012a). Ce changement d'hôte pourrait être un phénomène récurrent chez les microsporidies puisque certaines espèces infectant les moustiques auraient effectué des changements d'hôtes en réponse à l'indisponibilité temporaire de ceux-ci (Andreadis *et al.*, 2012). En ce qui concerne *N. ceranae*, le changement d'hôte a pu être facilité par

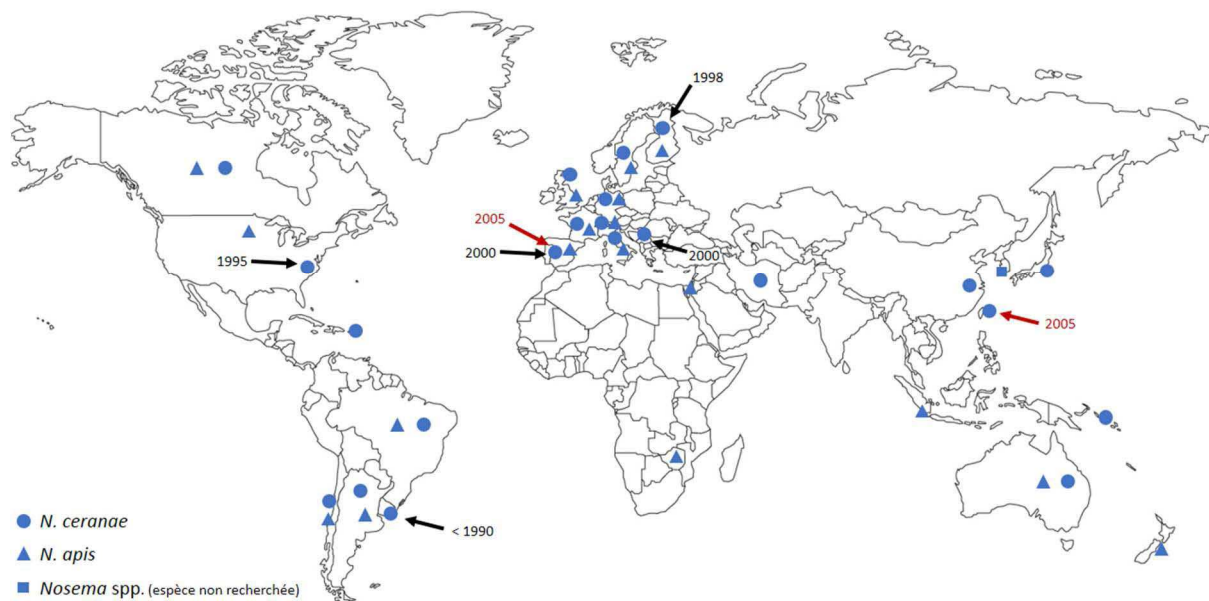


Figure 15. Distribution géographique de *N. ceranae* et *N. apis* dans les colonies d'*A. mellifera*.

Les flèches rouges indiquent l'année et le lieu de la première détection de *N. ceranae* chez *A. mellifera* ; les noires indiquent l'année et le lieu des détections de *N. ceranae* datées d'avant 2005 (adapté d'après Huang *et al.*, 2007 ; Klee *et al.*, 2007 ; Chen *et al.*, 2008 ; Invernizzi *et al.*, 2009 ; Gisder *et al.*, 2010 ; Stevanovic *et al.*, 2010 ; Hong *et al.*, 2011 ; Nabian *et al.*, 2011 ; Bolland *et al.*, 2013 ; Botías *et al.*, 2011 ; Martínez *et al.*, 2012 ; Morimoto *et al.*, 2013 ; Yang *et al.*, 2013).

l'entrée en contact d'*A. cerana* et d'*A. mellifera*, notamment due aux échanges commerciaux (Botías *et al.*, 2012a).

3.2.2. *N. ceranae* est désormais l'espèce microsporidienne prédominante dans les colonies d'*A. mellifera*

Les échanges commerciaux ayant facilité le changement d'hôte ont également pu considérablement et rapidement accroître la distribution géographique de *N. ceranae* au sein des colonies d'*A. mellifera*. En effet, cette espèce est aujourd'hui très répandue dans le monde (Figure 15) (Klee *et al.*, 2007).

En plus de sa large distribution géographique, *N. ceranae* semble aujourd'hui présenter une prévalence (pourcentage d'individus infectés dans un même échantillon) bien plus élevée que celle de *N. apis* au sein des colonies (Chen *et al.*, 2009; Chaimanee *et al.*, 2010; Stevanovic *et al.*, 2010; Botías *et al.*, 2012b). Un remplacement de *N. apis* par *N. ceranae* chez *A. mellifera* a d'ailleurs été suggéré par différentes études (Botías *et al.*, 2012a; Chen *et al.*, 2012 p.201; Martínez *et al.*, 2012). Toutefois, dans de rares régions plus septentrionales comme l'Allemagne (Gisder *et al.*, 2010) ou la Suède (Forsgren & Fries, 2012), les deux espèces sont encore fréquemment retrouvées avec *N. apis* présentant des prévalences plus élevées que *N. ceranae*. Le fait que les spores de *N. ceranae* soient plus sensibles à de faibles températures (Fenoy *et al.*, 2009; Fries, 2010) et que leur germination soit significativement diminuée après traitement à 4 °C (Gisder *et al.*, 2010) pourrait entraver le pouvoir infectieux et la propagation de cette espèce dans les régions climatiques caractérisées par des hivers plus froids. Hormis ces exceptions, l'espèce *N. ceranae* semble dominer en terme de prévalence dans les nombreuses régions aux climats plus chauds (Fries, 2010; Higes *et al.*, 2010, 2013b). La large distribution de *N. ceranae* et sa très forte prévalence observées depuis déjà une dizaine d'années justifient les nombreuses études portant aujourd'hui sur ce parasite pour tenter d'en déterminer les voies de transmission et les éventuels signes cliniques au sein des colonies.

3.2.3. Les voies de transmission de *N. ceranae* chez *A. mellifera*

Les infections naturelles d'*A. mellifera* par *N. ceranae* ont été d'abord détectées dans la caste des ouvrières (Higes *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2007), et plus récemment chez les faux-bourçons (Traver & Fell, 2011) et chez les reines (Traver & Fell, 2012).

Deux grands modes de transmission des pathogènes sont connus : la transmission horizontale et la transmission verticale. *N. ceranae* se transmet horizontalement, c'est-à-dire entre individus d'une même génération. Des spores du parasite libérées dans l'environnement lors de vols de nettoyage peuvent être accidentellement apportées dans les colonies par les abeilles butineuses. La transmission

de l'agent pathogène est de type féco-orale : l'infection a lieu lors de l'ingestion de spores par exemple au cours des activités de nettoyage de la ruche caractéristiques des jeunes abeilles adultes qui les exposent à des fèces pouvant être contaminées (Higes *et al.*, 2010). La trophallaxie, comportement impliquant l'échange de nourriture entre les individus, peut également être un autre vecteur de contamination (Smith, 2012). Les nourrices qui ont pour rôle de nourrir le couvain de la colonie pourraient de cette façon transmettre le parasite aux individus en développement. Le miel et le pollen peuvent enfin constituer des réservoirs de spores et contribuer à leur transmission (Higes *et al.*, 2008b; Botías *et al.*, 2012b).

La détection récente de spores de *N. ceranae* dans différents tissus prélevés chez des reines, notamment dans leurs ovaires, suggère une possible transmission verticale du parasite entre individus de générations successives (Traver & Fell, 2012).

3.2.4. Facteurs influençant le développement de l'infection par *N. ceranae* dans la colonie

Le développement de l'infection par *N. ceranae* dans les colonies d'abeilles pourrait être influencé par la température et le climat. Des variations de prévalence peuvent apparaître au sein des colonies au cours d'une année, notamment dans les régions aux climats tempérés. Aux États-Unis, des pics de prévalence de *N. ceranae* sont observés durant le printemps et/ou durant l'été (Runckel *et al.*, 2011; Traver *et al.*, 2012). Les données sont moins homogènes en Europe où des pics de prévalence de *N. ceranae* apparaissent lors de certains printemps mais ne sont toutefois pas observés chaque année (Gisder *et al.*, 2010). De plus, plusieurs études réalisées en Espagne suggèrent quant à elles une absence de saisonnalité dans la prévalence de *N. ceranae* (Martín-Hernández *et al.*, 2007, 2011a). Dans les régions au climat tropical ou sub-tropical, l'intensité d'infection ou charge parasitaire présente un seul pic annuel durant l'hiver et est négativement corrélée avec la température moyenne mesurée (Chen *et al.*, 2012).

Il est à noter que ces profils d'infection sont issus de méthodes de mesure bien distinctes pouvant, au moins en partie, expliquer les différences observées. En effet, certaines études s'appuient sur la prévalence du parasite (pourcentage d'individus infectés) (Martín-Hernández *et al.*, 2007) alors que d'autres mesurent l'intensité d'infection (charge parasitaire : numération du nombre de spores) (Chen *et al.*, 2012). De même, ces paramètres sont en majorité mesurés à l'échelle d'un pool d'abeilles prélevées sur les cadres (Gisder *et al.*, 2010) ou d'un pool de butineuses (Chen *et al.*, 2012), soit dans l'intestin moyen (Chen *et al.*, 2012) soit dans l'abdomen entier (Martín-Hernández *et al.*, 2007; Gisder *et al.*, 2010; Traver *et al.*, 2012) voire dans l'individu entier (Runckel *et al.*, 2011).

Il apparaît donc difficile de prédire le développement de l'infection par *N. ceranae* au sein des colonies au vu des profils distincts observés dans des régions géographiques lointaines mais

également dans des régions géographiques plus proches (Allemagne-Espagne). La variation de température ne semble donc pas être le seul facteur influençant les profils observés (Chen *et al.*, 2012). Il est possible que le développement de l'infection soit également influencé par la dynamique de population au sein des colonies et par les changements physiologiques et comportementaux ayant lieu au cours d'une année, notamment avant l'hiver.

3.2.5. Traitement contre la nosérose

La question du traitement de l'infection par *N. ceranae* est délicate étant donnée la difficulté à détecter des signes cliniques liés à la nosérose. De plus, les moyens de lutte contre *N. ceranae* sont relativement limités. Toutefois, l'infection des colonies d'abeilles par *N. ceranae* peut être contrôlée par l'utilisation d'une molécule antiparasitaire appelée fumagilline. La fumagilline est un antibiotique originellement produit par *Aspergillus fumigatus*, efficace contre différentes espèces de microsporidies. Cette molécule aurait pour cible l'enzyme méthionine aminopeptidase 2 qui est une protéase, retrouvée chez la plupart des eucaryotes, ayant pour fonction le clivage de la méthionine en position N-terminale lors de la maturation des protéines (Didier *et al.*, 2006).

Le traitement par la fumagilline durant l'automne de colonies infectées par *N. ceranae* réduit significativement l'intensité de l'infection (charge parasitaire) lors du printemps suivant (Williams *et al.*, 2008). De plus, le traitement des colonies par la fumagilline réduirait significativement le risque de dépeuplement sans pour autant empêcher les réinfections ultérieures (Higes *et al.*, 2008a). Ce risque de réinfection ultérieure est un problème sérieux puisque de faibles concentrations de fumagilline, persistant durant plusieurs mois après le traitement, auraient un impact négatif en entraînant une hyperprolifération de *N. ceranae* chez les abeilles traitées (Huang *et al.*, 2013). De nombreux pays dans le monde utilisent toujours la fumagilline pour contrôler l'infection des colonies par *N. ceranae*. Cependant, le traitement des colonies d'abeilles avec cet antibiotique est interdit dans l'Union Européenne à cause de l'absence d'autorisation de mise sur le marché et de l'absence de limite maximale de résidus définie dans le miel (Fries, 2010; Higes *et al.*, 2010). Il apparaît donc important de développer des traitements alternatifs et de confirmer leur efficacité en réalisant des études de terrain sur des colonies d'abeilles.

De façon alternative, une bonne gestion de l'activité apicole pourrait dans certains cas prévenir l'évolution de la nosérose à travers, par exemple, le remplacement des cadres et des reines de colonies infectées (Higes *et al.*, 2010). Ainsi, le remplacement de la reine d'une colonie infectée par une reine plus jeune entraîne une diminution significative du nombre d'abeilles infectées au sein de la colonie permettant sa survie (Botías *et al.*, 2011).

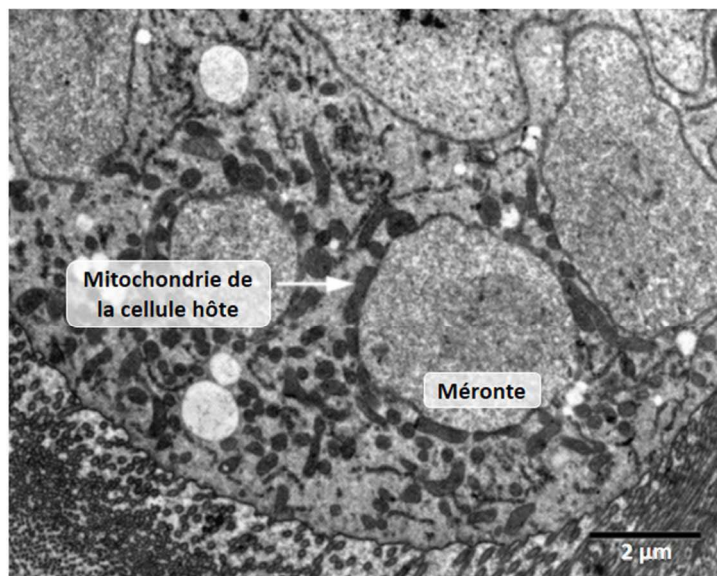


Figure 16. Méronte de *N. ceranae* dans une cellule épithéliale d'abeille infectée trois jours auparavant entourée de mitochondries de la cellule hôte (Observation au microscope électronique à transmission, d'après Higes *et al.*, 2007).

3.3. Effet de l'infection par *N. ceranae* sur l'abeille domestique

De nombreuses études ont été réalisées depuis une dizaine d'années à l'échelle de l'individu en conditions de laboratoire (sur des cohortes isolées en cagettes) et à l'échelle de colonies en étude de semi-terrain pour identifier les effets de l'infection sur le comportement, la physiologie ou encore la survie de l'abeille.

3.3.1. Effet sur l'état nutritionnel et énergétique de l'abeille

Durant leur cycle de vie, l'activité énergétique des microsporidies dépend fortement de la cellule hôte et *N. ceranae* ne déroge pas à la règle puisque ce parasite utilise des ressources de l'hôte pour son métabolisme. En effet, il a été montré que les mérontes se développant au sein de l'épithélium intestinal de l'abeille infectée trois jours auparavant sont entourés par de nombreuses mitochondries de la cellule hôte (Figure 16) (Higes *et al.*, 2007). Cette observation suggère un recrutement des mitochondries de la cellule hôte par le parasite pour l'acquisition du pool d'ATP nécessaire à son développement. En plus d'obtenir de l'ATP à partir des mitochondries présentes dans la cellule hôte, le parasite serait capable de produire de l'ATP en métabolisant des hydrates de carbone de l'hôte grâce à la voie de la glycolyse (Williams, 2009; Aliferis *et al.*, 2012).

L'utilisation des ressources de l'hôte s'accompagne naturellement d'un déséquilibre en molécules énergétiques dans l'hémolymphe de l'hôte. L'analyse de métabolites présents dans l'hémolymphe confirme l'induction de stress nutritionnel et énergétique par le parasite. La majorité des acides aminés libres de l'hémolymphe est présente en plus faibles concentrations chez les abeilles parasitées (Aliferis *et al.*, 2012). Cette hypoaminoacidémie reflète une activité de biosynthèse réduite pouvant provenir (i) de changements de l'activité physiologique de l'hôte (ex : mécanismes de défense) ou (ii) de l'utilisation des ressources par le parasite. L'infection se traduit également par une diminution significative des taux de nombreux hydrates de carbone, ces molécules étant la principale source d'énergie chez l'abeille (Aliferis *et al.*, 2012). Par exemple, les butineuses infectées par *N. ceranae* présentent dans leur hémolymphe une concentration en tréhalose, disaccharide composé de deux molécules de glucose, au moins deux fois inférieure à celle des individus non infectés (Mayack & Naug, 2010). De plus, le fait que les abeilles infectées et non infectées présentent des taux de glucose similaires malgré des taux de tréhalose différents suggère que le taux de glucose est maintenu aux dépens du tréhalose. Ainsi, lorsque la demande énergétique est accrue chez l'abeille infectée, le niveau de synthèse du tréhalose dans le corps gras ne semble pas se maintenir au niveau auquel la molécule est dégradée en glucose (Mayack & Naug, 2010). D'après des données moléculaires, l'expression des gènes codant pour l' α -glucosidase (enzyme hydrolysant le saccharose en glucose et en fructose) et plusieurs transporteurs d'hydrates de carbone est significativement augmentée dans

l'intestin d'abeilles infectées par *N. ceranae* (Dussaubat *et al.*, 2012). L'augmentation des besoins énergétiques de l'abeille parasitée pourrait expliquer l'induction de l'expression de ces gènes.

À l'échelle de l'individu, le stress énergétique imposé par *N. ceranae* semble se traduire par une augmentation de l'appétit chez l'hôte, les abeilles consommant plus de sucrose lorsqu'elles sont infectées (Mayack & Naug, 2009; Alaux *et al.*, 2010a; Martín-Hernández *et al.*, 2011b). La faim accrue des abeilles parasitées entraînerait aussi une altération du comportement de trophallaxie les rendant moins enclines à partager la nourriture qu'elles ont pu obtenir (Naug & Gibbs, 2009). L'espérance de vie des abeilles infectées est significativement réduite lorsqu'elles sont nourries avec des quantités limitées de sucrose mais n'est pas modifiée lorsqu'elles peuvent se nourrir à volonté. Ces observations suggèrent que la survie ne serait affectée que dans le cas où les abeilles ne parviendraient pas à contrebalancer le stress énergétique induit par le parasite (Mayack & Naug, 2009).

3.3.2. Effet sur l'activité de butinage

Les effets de *N. ceranae* sur l'état énergétique de son hôte peuvent entraîner des conséquences sur le comportement de celui-ci, notamment au niveau de l'activité de vol. En effet, les plus faibles concentrations en hydrates de carbone, principale source énergétique pour les muscles alaires, détectées dans l'hémolymphe des abeilles infectées sont susceptibles d'affecter leur capacité de vol (Mayack & Naug, 2010).

D'après une étude de terrain, les abeilles infectées par *N. ceranae* retournent significativement moins à la colonie et celles qui y parviennent mettent en moyenne deux fois plus de temps que les abeilles non infectées (Kralj & Fuchs, 2010). *N. ceranae* pourrait donc augmenter l'état d'épuisement de l'hôte ou perturber son orientation. Toutefois, l'incapacité des abeilles infectées à réintégrer la colonie pourrait également refléter une adaptation de l'hôte : la réduction du développement de l'infection au sein de la colonie via le non retour à la ruche des individus infectés serait ainsi un mécanisme de préservation de la santé de la colonie (→ 3.5.2.).

L'infection par *N. ceranae* rendrait également les abeilles plus actives, ce qui se traduit par un grand nombre de sorties par abeille et par jour (Dussaubat *et al.*, 2013a). Cette augmentation de l'activité de vol des abeilles parasitées peut être interprétée de différentes façons. Le plus grand nombre de vols permettrait aux abeilles infectées (i) d'assouvir leurs forts besoins en nourriture, (ii) de compenser un butinage inefficace dû aux faibles capacités de vol, (iii) d'éliminer les spores contenues dans leur rectum en effectuant de nombreux vols de nettoyage ou (iv) de préserver la survie de la colonie en l'abandonnant (Dussaubat *et al.*, 2013a).

3.3.3. Effet sur la production d'hormones et de phéromones chez l'abeille

Les abeilles domestiques sont caractérisées par le polyéthisme d'âge (division temporelle des tâches selon l'âge) ; elles adaptent la répartition des tâches au sein de la colonie en réponse aux conditions environnementales (Winston, 1987). Le passage d'une tâche à l'autre implique un changement physiologique lié au processus de maturation de l'abeille. Ainsi, certaines tâches sont réalisées à l'intérieur de la ruche par les plus jeunes abeilles (nourrices, bâtisseuses et nettoyeuses) tandis que les activités à l'extérieur sont réalisées par des abeilles plus âgées (butineuses, gardiennes). Cependant, il existe une plasticité importante permettant aux abeilles de reprendre une tâche déjà effectuée malgré son âge plus avancé ou, à l'inverse, de démarrer plus rapidement une tâche future (Winston, 1987). Les changements physiologiques à la base du polyéthisme d'âge sont gérés par des hormones au niveau individuel et des phéromones au niveau social.

L'hormone juvénile III (JH : juvenile hormone), produite par des glandes situées près du cerveau, est impliquée dans la transition de nourrice à butineuse. La vitellogénine (Vg) est également impliquée dans cette transition. Produite par le corps gras de l'abeille, elle participe à l'inhibition de la maturation des ouvrières. La production de JH inhibe la synthèse de Vg ; ainsi, au fur et à mesure que les ouvrières vieillissent, le taux de Vg dans l'hémolymphe diminue alors que celui de JH augmente (Huang *et al.*, 1994; Amdam & Omholt, 2003). Une perturbation de ces taux d'hormones pourrait être à l'origine des changements de comportements.

L'hémolymphe des abeilles infectées par *N. ceranae* ou par *N. apis* contient une plus forte concentration en JH que celle des abeilles non infectées (Ares *et al.*, 2012), l'augmentation du taux de cette hormone étant plus prononcée lorsque les abeilles sont parasitées par *N. ceranae*. Le gène codant pour la Vg est de plus significativement moins exprimé chez les abeilles infectées par *N. ceranae* après 7 jours d'infection (Antúnez *et al.*, 2009). L'infection par *N. ceranae* a pour conséquence des taux de transcrits Vg plus faibles et une concentration en JH plus élevée chez des nourrices, ce profil étant l'inverse de ce qui est normalement attendu chez des abeilles aussi jeunes (Goblirsch *et al.*, 2013). *N. ceranae* accélérerait donc le développement comportemental de l'abeille en modifiant les concentrations en hormones impliquées dans le polyéthisme d'âge. Les abeilles parasitées deviendraient matures plus rapidement car elles sont deux fois plus nombreuses que les abeilles non infectées à démarrer une activité de butinage précoce (Goblirsch *et al.*, 2013).

L'oléate d'éthyl, une phéromone, est également impliqué dans la maturation des abeilles. Produite en très forte quantité chez les abeilles les plus âgées, cette phéromone agit sur les plus jeunes abeilles en retardant leur activité de butinage (Leoncini *et al.*, 2004). Une étude récente indique que l'intensité de l'infection par *N. ceranae* est positivement corrélée avec la concentration en oléate d'éthyl chez l'abeille (Dussaubat *et al.*, 2010). Cette concentration anormalement élevée en

oléate d'éthyl chez les jeunes abeilles infectées pourrait accélérer leur maturation en abeilles butineuses tout en retardant la maturation des jeunes abeilles non infectées (Dussaubat *et al.*, 2013a).

L'infection par *N. ceranae* modifierait également la production de phéromones de la reine, qui régulent la cohésion de la colonie. Des reines expérimentalement infectées produisent en effet de plus grandes quantités de phéromones (9-ODA et 9-HDA) que les individus témoins (Alaux *et al.*, 2011). Toutefois, l'impact précis de cette augmentation sur les interactions entre reine et ouvrières reste encore à élucider.

3.3.4. Effet sur l'épithélium intestinal de l'abeille

L'épithélium intestinal des insectes possède une forte capacité de régénération permettant de compenser une destruction cellulaire partielle via les cellules basales qui, une fois différenciées, migrent vers la lumière de l'intestin (Sahai-Hernandez *et al.*, 2012). Or, le parasite *N. ceranae* se développe au sein des cellules épithéliales, et notamment des cellules basales (Higes *et al.*, 2007; García-Palencia *et al.*, 2010), et peut ainsi avoir un impact sur la structure et l'intégrité de l'intestin. Des infections expérimentales révèlent que les intestins d'abeilles parasitées apparaissent plus blanchâtres et rachitiques que ceux des abeilles témoins (Higes *et al.*, 2007). Après plusieurs jours d'infection, l'observation en microscopie électronique permet d'identifier de nombreuses cellules épithéliales élargies en état de dégénérescence présentant des vacuoles dans leur cytoplasme, des membranes cellulaires rompues et des noyaux pycnotiques (de petite taille et contenant de la chromatine très condensée) (Higes *et al.*, 2007; García-Palencia *et al.*, 2010). La membrane péritrophique, structure semi-perméable entourant le bol alimentaire dans l'intestin des insectes peut être fragmentée voire détruite (García-Palencia *et al.*, 2010; Dussaubat *et al.*, 2012). Les lésions des cellules hôtes entraînent une destruction progressive et irréversible de l'épithélium de l'intestin et donc un possible dysfonctionnement de l'activité digestive (García-Palencia *et al.*, 2010).

Chez les insectes, le renouvellement des cellules épithéliales est contrôlé par la voie de signalisation Wingless (Wg) (García-Palencia *et al.*, 2010) et l'expression de quatre des principaux gènes impliqués dans la voie Wg est significativement diminuée dans l'intestin des abeilles parasitées (Dussaubat *et al.*, 2012). Les données moléculaires montrent que la pathologie induite par *N. ceranae* est également caractérisée par une perturbation du système nerveux entérique régulant notamment le péristaltisme (Dussaubat *et al.*, 2012).

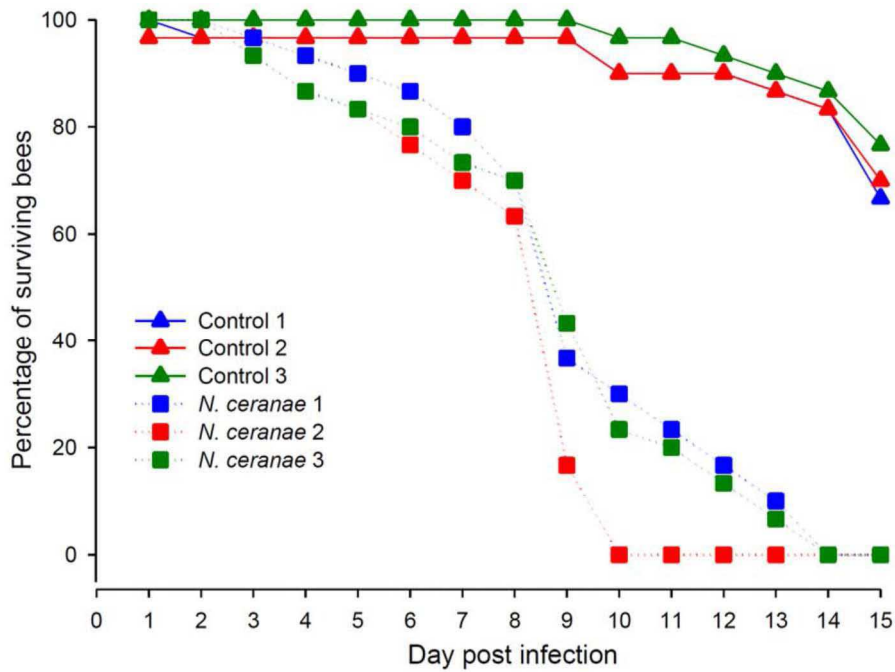


Figure 17. Mortalité accrue des abeilles induite par *N. ceranae* (d'après Dussaubat *et al.*, 2012).

Le graphique montre le pourcentage d'abeilles survivantes pour chaque réplique (n = 3, 3x30 abeilles/traitement) et en fonction du nombre de jours post infection. Les abeilles ont été individuellement infectées par voie orale à l'âge de 7 jours avec une solution contenant 100000 spores de *N. ceranae*. Cette dose correspond à un nombre de spores couramment retrouvé dans les abeilles naturellement infectées et est dix fois supérieure à la dose infectieuse minimale requise pour infecter la totalité d'un groupe d'abeilles. Les trois cagettes d'abeilles infectées présentent 100 % de mortalité 14 jours après infection, tandis que la mortalité des individus non infectés reste faible.

3.3.5. Effet sur la survie de l'abeille

De nombreuses données concernant l'impact de *N. ceranae* sur la survie d'*A. mellifera* ont été obtenues à partir d'études réalisées aussi bien sur des abeilles élevées en cagettes que sur des colonies. Elles mettent en évidence une grande disparité dans les taux de mortalité induits par l'infection.

Des études réalisées en Espagne indiquent des taux de mortalité très importants, d'au moins 93 %, 7 jours seulement après que les abeilles ont été infectées avec une dose de 100 000 ou 125 000 spores (Higes *et al.*, 2007; Martín-Hernández *et al.*, 2011*b*). Dans certains cas, toutes les abeilles infectées meurent durant les deux à trois semaines suivant l'infection (Figure 17) (Higes *et al.*, 2008*a*; Dussaubat *et al.*, 2012, 2013*b*). En revanche, d'autres études ayant utilisé les mêmes doses infectieuses (minimum 100 000 spores/abeille) ont mis en évidence des taux de mortalité beaucoup plus faibles, allant de 30 % (Alaux *et al.*, 2010*a*) à 44 % (Paxton *et al.*, 2007). L'interprétation des résultats obtenus à partir des diverses études est en réalité très difficile compte tenu des nombreuses différences dans les protocoles et le matériel biologique utilisés : doses infectieuses, origine des spores de *N. ceranae*, sous-espèce d'*A. mellifera*, historique des abeilles collectées (ressources, présence d'autres facteurs de stress, saison...), régime alimentaire de l'abeille lors de l'expérimentation, âge auquel elle est infectée, etc..... L'ensemble de ces facteurs est pourtant susceptible d'influencer fortement l'impact causé par l'infection.

Il semblerait que la survie des abeilles dépende de la dose infectieuse puisque le taux de mortalité des individus augmente avec celle-ci (Martín-Hernández *et al.*, 2011*b*; Forsgren & Fries, 2012). Toutefois, Porrini *et al.* (2011) n'ont pu observer cet effet dose-dépendant (Porrini *et al.*, 2011).

L'alimentation des abeilles serait un facteur influençant leurs capacités immunitaires (Alaux *et al.*, 2010*b*) et pourrait donc modifier leur sensibilité à *N. ceranae*. La qualité nutritionnelle et la diversité florale des pollens seraient des facteurs importants pour la survie des abeilles infectées par *N. ceranae*. En effet, l'addition de pollen dans le régime alimentaire d'abeilles infectées par *N. ceranae* augmente significativement leur survie (Porrini *et al.*, 2011; Di Pasquale *et al.*, 2013). De plus, des abeilles parasitées et nourries avec un pollen polyfloral survivent plus longtemps que leurs congénères nourries avec un pollen monofloral (Di Pasquale *et al.*, 2013).

L'origine géographique de l'inoculum de *N. ceranae* pourrait également jouer un rôle sur la virulence du parasite. Une étude thaïlandaise récente suggère que des isolats de *N. ceranae* provenant du Canada et de Thaïlande auraient des pouvoirs infectieux significativement différents, l'isolat asiatique entraînant une prolifération parasitaire accrue (Chaimanee *et al.*, 2013). Toutefois, le transport des spores provenant du Canada aurait pu contribuer à leur plus faible pouvoir infectieux, la viabilité des spores n'ayant pas été analysée avant inoculation. De plus, les auteurs n'ont pas

analysé l'impact des différents isolats sur la mortalité de l'hôte. D'après une autre étude réalisée avec des isolats de *N. ceranae* provenant de France et d'Espagne, l'origine géographique de l'inoculum ne semble pas influencer la mortalité des abeilles (Dussaubat *et al.*, 2013b). Ceci est cohérent avec le fait que plusieurs études n'ont pas réussi à identifier de variants génétiques parmi différents isolats de *N. ceranae*, suggérant que la même « souche » de *N. ceranae* est présente partout dans le monde (Huang *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2009; Dussaubat *et al.*, 2013b; Roudel *et al.*, 2013).

L'intensité de l'infection par l'espèce *N. apis* ne semble pas être influencée par la sous-espèce d'*A. mellifera* considérée (aucune différence entre *A. m. ligustica* et *A. m. mellifera*) (Malone & Stefanovic, 1999) mais l'influence de la sous-espèce d'hôte n'a pas encore été étudiée vis-à-vis de l'infection par *N. ceranae*. Des premières données tendent toutefois à montrer que des abeilles provenant de colonies différentes n'auraient pas le même degré de sensibilité à *N. ceranae* et que cet « effet colonie » serait plus important que l'effet dû au fond génétique de l'abeille (Fontbonne *et al.*, 2013).

Même si les études réalisées jusqu'à ce jour n'expliquent pas vraiment les différents taux de mortalité observés, il apparaît que sous certaines conditions, le parasite *N. ceranae* peut entraîner une mortalité accrue chez son hôte *A. mellifera*. Se pose alors la question du rôle exact de ce parasite dans le phénomène d'effondrement des colonies.

3.4. Rôle de *N. ceranae* dans l'effondrement des colonies d'abeilles

***N. ceranae* et effondrement des colonies**

À ce jour, les quelques données disponibles quant à la virulence de *N. ceranae* à l'échelle de la colonie sont contradictoires. Ceci est probablement dû à (i) la difficulté d'identifier clairement les signes cliniques de la nosébose, maladie causée par *N. ceranae* ainsi qu'au (ii) choix du paramètre utilisé pour évaluer l'impact de la maladie. Ainsi, la majorité des études de terrain ne considère que le lien entre la présence du parasite et la perte ou l'effondrement des colonies (Higes *et al.*, 2013b).

La dynamique de population d'une colonie dépend fortement de l'espérance de vie des ouvrières qui peut être fortement affectée par l'infection par *N. ceranae* (Higes *et al.*, 2007; Paxton *et al.*, 2007; Martín-Hernández *et al.*, 2011b) (→ 3.3.5). Au sein des colonies, un fort taux de mortalité des butineuses dû au parasite aurait pour conséquence directe une entrée précoce dans l'activité de butinage des jeunes adultes pour compenser la perte de butineuses, modifiant ainsi le profil de répartition des tâches (Higes *et al.*, 2010, 2013b). Une hypothèse est que lorsque la colonie ne peut plus maintenir une production de couvain suffisante pour contrebalancer la perte des abeilles adultes, le déclin de la colonie s'accélère conduisant à l'effondrement, seul signe évident de l'infection par *N. ceranae* (Higes *et al.*, 2013b). Plusieurs études réalisées essentiellement en Espagne

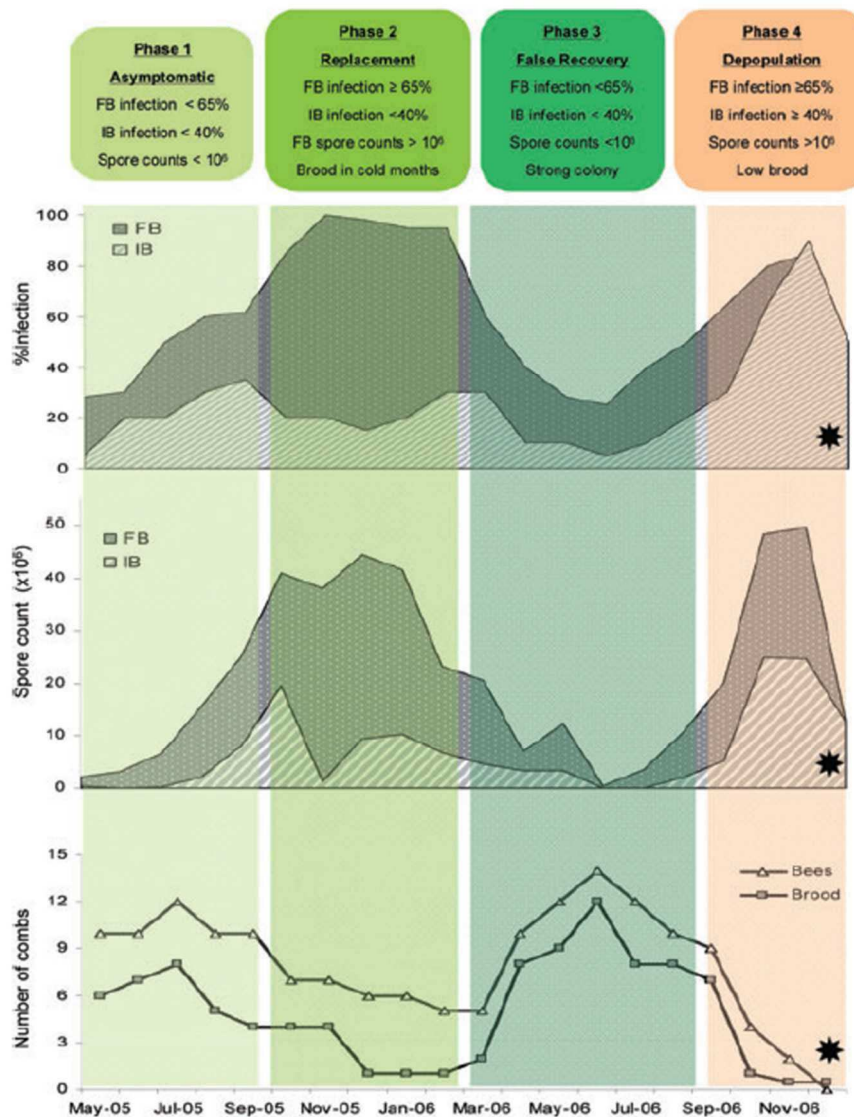


Figure 18. Dynamique d'une infection naturelle par *N. ceranae* dans une colonie d'*A. mellifera* (d'après Higes *et al.*, 2008).

Le pourcentage d'abeilles infectées ($n = 30$), le nombre moyen de spores par abeille ($n = 30$) et le nombre de cadres recouverts d'abeilles ou de couvain permettent de différencier 4 phases de l'infection naturelle par *N. ceranae*. Lors de la phase 1 « asymptotique » (printemps – automne) les colonies infectées semblent tout à fait similaires aux colonies non infectées, sans aucun signe de maladie. La phase 2 « de remplacement » est caractérisée par le comportement inhabituel de la reine qui continue à pondre des œufs durant les mois d'hiver. Au printemps suivant, la phase 3 ou « faux rétablissement » présente des colonies qui se développent rapidement : les reines pondent énormément d'œufs et les populations d'abeilles augmentent. À l'automne, un dépeuplement soudain * apparaît avec une chute du nombre d'abeilles adultes et une diminution drastique du couvain définissant la phase « d'effondrement ». Lors de cette ultime phase, plus de 80 % des abeilles adultes, qu'elles soient abeilles d'intérieur (IB) ou butineuses (FB), sont infectées par le parasite.

suggèrent une forte relation de cause à effet entre la présence de *N. ceranae* dans les colonies et l'effondrement de celles-ci (Martín-Hernández *et al.*, 2007; Higes *et al.*, 2008a, 2009). L'infection naturelle d'une colonie par *N. ceranae* serait d'abord caractérisée par une longue phase d'incubation asymptomatique au cours de laquelle les signes d'affaiblissement de la colonie ne sont pas évidents tant que la reine parvient à compenser la perte des abeilles infectées (Figure 18) (Higes *et al.*, 2008a). L'effondrement brutal de la colonie surviendrait lorsque plus de 80 % des abeilles adultes sont infectées et contiennent plusieurs dizaines de millions de spores. Toutefois, les signes cliniques caractéristiques de la nosémosse causée par *N. apis*, comme des abeilles rampantes et des traces de diarrhées dans la ruche, ne sont que rarement observées au sein des colonies infectées par *N. ceranae* (Higes *et al.*, 2008a, 2010).

Données contradictoires

Le lien entre *N. ceranae* et l'effondrement des colonies d'abeilles est loin d'être évident puisque de nombreuses études démontrent la présence du parasite dans des colonies en apparence saines, ne présentant aucun signe d'effondrement (Cox-Foster *et al.*, 2007; Martín-Hernández *et al.*, 2007; Gisder *et al.*, 2010; Stevanovic *et al.*, 2010). Aux États-Unis par exemple, les colonies présentent de très fortes prévalences de *N. ceranae*, qu'elles soient atteintes du CCD (prévalence de 100 %) ou non (prévalence de 85,7 %) (Cox-Foster *et al.*, 2007). De plus, une étude suisse a suggéré que les colonies présentant une plus forte charge parasitaire à l'automne aurait une probabilité de survie plus élevée au cours de la saison suivante (Dainat *et al.*, 2012). La présence possible de *N. ceranae* au sein des colonies en l'absence de signes cliniques ou d'effondrement suggère que d'autres facteurs pourraient être impliqués dans l'apparition d'un effondrement de colonies dû à ce parasite.

3.5. Les mécanismes de défense de l'abeille

3.5.1. La réponse immunitaire à l'échelle de l'individu

Les barrières physiques

Les insectes possèdent des barrières physiques efficaces contre l'entrée des agents pathogènes. La cuticule qui forme leur exosquelette est la première barrière physique ayant pour but d'empêcher les invasions microbiennes (Ferrandon, 2012). L'appareil respiratoire des insectes est constitué d'un réseau de trachées se ramifiant en tubes de plus en plus fins. Si ces trachées débouchent directement vers l'extérieur de l'organisme, elles sont protégées par les spiracles, sortes de valves musculaires régulant leur ouverture. De plus, les trachées sont recouvertes de cuticule qui protège les tissus de l'invasion par des agents pathogènes potentiellement présents dans leur lumière (Ferrandon, 2012).

Le tractus digestif des insectes est également presque entièrement recouvert de cuticule limitant la pénétration de microorganismes qui seraient présents dans le bol alimentaire. L'intestin moyen est la seule partie du tractus digestif qui n'est pas recouverte de cuticule et il constitue justement le site de développement du parasite *N. ceranae*. Cette partie de l'intestin est néanmoins tapissée d'une structure, appelée membrane péritrophique, protégeant les cellules épithéliales d'une invasion. Cette membrane est semi-perméable et permet le passage des nutriments contenus dans le bol alimentaire en transit dans la lumière intestinale (Ferrandon, 2012). Toutefois, ces barrières physiques peuvent dans certains cas être endommagées (ex : blessure transperçant l'exosquelette ou toxines produites par les agents pathogènes dégradant la cuticule) laissant ainsi le passage libre aux agents pathogènes. Les insectes disposent donc de différentes barrières physiques pour contrôler l'infection en cas d'invasion.

L'immunité humorale

Les très nombreuses études réalisées chez l'organisme modèle *Drosophila melanogaster* servent de base à la compréhension du système immunitaire des insectes. Ces derniers ne possèdent pas de réponse immunitaire acquise mais une réponse immunitaire innée permettant une réaction globale et rapide contre les agents pathogènes. Cette immunité innée repose sur des réponses immunitaires humorale et cellulaire. L'immunité dite humorale est caractérisée par des effecteurs antimicrobiens non cellulaires (Wilson-Rich *et al.*, 2009).

Les insectes sont capables d'établir une réponse systémique contre les agents pathogènes qui consiste en la production massive de plusieurs classes de peptides antimicrobiens (AMPs pour antimicrobial peptides) par le corps gras en réponse à l'intrusion d'une bactérie ou d'un champignon (Ferrandon *et al.*, 2007; Broderick *et al.*, 2009). Les AMP sont supposés agir au niveau de la membrane des agents pathogènes même si leur mode d'action précis n'est pas toujours connu. La régulation des gènes codant pour les AMP est prise en charge par deux voies, Toll et Imd, qui contrôlent les facteurs de transcription NF- κ B par différentes cascades de signalisation. La voie Toll est déclenchée par la fixation du ligand Spätzle préalablement clivé sur le récepteur Toll, ce qui entraîne l'activation des facteurs de transcription Rel, Dif et Dorsal. La translocation de ces facteurs du cytoplasme vers le noyau induit l'expression de nombreux gènes liés à l'immunité par fixation sur leurs promoteurs. Cette voie est généralement activée par les champignons et les bactéries Gram-positives. Au contraire, la voie Imd est plus connue pour répondre aux infections par des bactéries Gram-négatives. Cette voie contrôle l'expression des gènes codant pour les AMP via l'activation d'une protéine de reconnaissance du peptidoglycane (PGRP pour peptidoglycan-recognition protein), et le clivage d'un autre facteur de transcription Rel, Relish (Ferrandon *et al.*, 2007; Broderick *et al.*, 2009). Alors que les voies Toll et Imd sont les principaux régulateurs de la réponse immunitaire chez

les insectes, une troisième voie, JAK/STAT, régulant des gènes également liés à l'immunité a été identifiée. Cette voie, également activée par un récepteur (Domeless) situé sur les cellules du corps gras, ne régule pas l'expression des AMP mais serait associée à la réponse au stress et aux dommages causés aux tissus (Broderick *et al.*, 2009). Une quatrième voie, JNK, serait impliquée dans la régulation de processus cellulaires dont l'expression des gènes codant pour les AMP, mais sa contribution exacte dans les mécanismes de défense de l'hôte fait encore débat (Broderick *et al.*, 2009).

Une réponse immunitaire localisée peut avoir lieu dans l'intestin des insectes par la production d'AMP, mais également par la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS pour reactive oxygen species) tels que le peroxyde d'hydrogène, l'anion superoxyde, l'oxygène singulet, l'ozone et les peroxydes organiques (Broderick *et al.*, 2009). Ces molécules sont toxiques pour les agents pathogènes et participent donc à leur élimination (Nathan & Cunningham-Bussel, 2013). En revanche, une production des ROS inappropriée, de trop grande intensité ou durant une trop longue période par exemple, entraîne des effets indésirables cytotoxiques envers l'hôte lui-même (Nathan & Cunningham-Bussel, 2013).

La réponse immunitaire locale et la réponse immunitaire systémique du corps gras sont deux mécanismes indépendants, chacun étant sélectivement induit en fonction du mode d'infection (Broderick *et al.*, 2009). Cependant, certaines infections peuvent requérir la coordination des deux systèmes pour contrôler efficacement l'agent pathogène.

L'immunité cellulaire

Chez les insectes, l'immunité dite cellulaire est médiée par de nombreuses cellules présentes dans l'hémolymphe, les hémocytes. Ces hémocytes sont responsables de différents mécanismes de défense parmi lesquels la phagocytose, la nodulation, l'encapsulation et la mélanisation (Marmaras & Lampropoulou, 2009). La phagocytose est caractérisée par la reconnaissance, l'absorption et la destruction intracellulaire d'un agent pathogène ou d'une cellule apoptotique par les plasmocytes et les granulocytes présents dans l'hémolymphe. La nodulation a lieu lorsque des agrégats de plasmocytes piègent un grand nombre de bactéries. Les nodules formés peuvent être mélanisés ou non mélanisés (Marmaras & Lampropoulou, 2009; Wilson-Rich *et al.*, 2009). L'encapsulation quant à elle a lieu lorsque des hémocytes se lient à des cibles de plus grande taille telles que des champignons, des protozoaires ou des nématodes. Les plasmocytes se différencient alors en lamellocytes et forment une capsule multicouche autour du corps étranger qui est finalement détruite suite à la production de ROS (Marmaras & Lampropoulou, 2009; Wilson-Rich *et al.*, 2009). L'encapsulation est fortement associée à la réaction de mélanisation, voie spécifique conduisant à la formation de mélanine. La mélanisation tient un rôle central dans les mécanismes de défense des insectes en participant aussi

Tableau 4. Nombre de gènes appartenant à 17 familles différentes impliqués dans l'immunité des insectes (d'après Evans *et al.*, 2006).

Les nombres de gènes appartenant à *Anopheles gambiae* et *Drosophila melanogaster* proviennent de Christophides *et al.*, 2002 et Christophides *et al.*, 2004 et ceux appartenant à *Apis mellifera* proviennent de Evans *et al.*, 2006.

Gene family	<i>A. mellifera</i>	<i>A. gambiae</i>	<i>D. melanogaster</i>
Recognition			
PGRP-S	3	3	7
PGRP-L	1	4	6
B-glucan	2	6	3
Galectins	2	8	5
C-type lectins	10	22	35
Fibrinogen-domain	2	57	13
Signaling			
CLIP serin proteases	18	41	37
Serpin	7	14	28
Toll	5	11	9
Cactus	3	1	1
Dorsal	2	1	2
Relish	2	2	3
Effectors			
Prophenoloxidase	1	9	3
Defensins	2	4	1
Other immune peptides	4	5	19
Lysozyme	3	6	14
TEP	4	15	6
Total	71	209	196

bien à la cicatrisation des blessures qu'à la formation de nodules et de capsules. Au cours du processus de mélanisation, des phénols sont oxydés grâce à l'enzyme clé phénoloxydase (PO) en quinones toxiques, qui polymérisent ensuite pour former la mélanine entourant les agents pathogènes (Tang, 2009).

Un pool de gènes liés à l'immunité plus faible chez *A. mellifera*

L'abeille possède des effecteurs impliqués dans les quatre voies constituant la réponse immunitaire humorale, Imd, Toll, JNK et JAK/STAT ainsi que des effecteurs impliqués dans la réponse immunitaire cellulaire (Evans *et al.*, 2006). Mais globalement, les gènes impliqués dans l'immunité, qu'ils soient liés à la reconnaissance des microorganismes, aux voies de signalisation ou aux effecteurs, sont beaucoup moins représentés dans le génome d'*A. mellifera* que dans ceux de la drosophile (*D. melanogaster*) et du moustique (*A. gambiae*) (Tableau 4). Le répertoire de gènes impliqués dans l'immunité chez l'abeille ne représenterait que le tiers de ceux retrouvés chez la drosophile et le moustique. À titre d'exemple, l'abeille est capable de produire 6 AMP différents tandis que la drosophile et le moustique en produisent respectivement 20 et 9 (Evans *et al.*, 2006). Les abeilles possèderaient donc, en apparence, des capacités de défense contre les microorganismes relativement réduites par rapport à d'autres insectes. Ce plus faible répertoire de gènes liés à l'immunité innée chez *A. mellifera* pourrait s'expliquer par le fait que cet insecte social a développé d'autres mécanismes de défense, notamment à l'échelle de la colonie, efficaces dans la prévention des maladies (Evans *et al.*, 2006) (→ 3.5.2.).

Effet de l'infection par *N. ceranae* sur la réponse immunitaire à l'échelle de l'individu

Plusieurs études récentes se sont intéressées à l'effet de l'infection par *N. ceranae* sur les capacités immunitaires de l'abeille pour tenter d'expliquer les mortalités parfois accrues dues à ce parasite et d'analyser la réponse à un parasite émergent chez cet hôte.

Contrairement à *N. apis*, *N. ceranae* semble avoir un impact supprimeur sur les capacités immunitaires de l'abeille mellifère. Cet effet se traduit par une diminution significative de l'expression de plusieurs gènes de l'abeille impliqués dans les réponses humorale et cellulaire, notamment de plusieurs AMP, et ce moins d'une semaine après le début de l'infection (Antúnez *et al.*, 2009; Chaimanee *et al.*, 2012; Dussaubat *et al.*, 2012). Cet effet supprimeur pourrait s'estomper avec la durée de l'infection puisque l'expression de ces gènes n'est plus modifiée 12 jours après infection (Chaimanee *et al.*, 2012). En revanche, l'infection par *N. ceranae* ne semble pas influencer la réaction de mélanisation puisque l'expression du gène codant pour l'enzyme clé phénoloxydase ainsi que l'activité enzymatique de celle-ci ne sont pas modifiées (Antúnez *et al.*, 2009; Alaux *et al.*, 2010a). Les niveaux de transcription de plusieurs gènes liés à l'immunité (*défensine 1*, *glucose*

oxydase) et au contrôle du stress oxydant (*péroxydase*, *estérase*) sont par contre significativement augmentés dans le cerveau des abeilles 10 jours après infection (McDonnell *et al.*, 2013). Ceci mettrait en évidence l'impact d'une infection intestinale sur l'expression de gènes de défense au niveau cérébral. Toutefois, les auteurs ont détecté la présence de deux virus, le DWV et le *Varroa destructor* virus, dans les échantillons de cerveau prélevés (McDonnell *et al.*, 2013), ce qui remet en cause l'origine des modifications transcriptionnelles observées. L'infection par *N. ceranae* semble néanmoins bien déclencher un stress oxydant au niveau intestinal coïncidant avec la production d'enzymes antioxydantes. En effet, l'augmentation du niveau de transcription de gènes impliqués dans la génération de ROS a été observée dans des échantillons d'intestins infectés depuis 7 jours (Dussaubat *et al.*, 2012). L'expression de gènes codant pour des enzymes aux propriétés antioxydantes (glutathione peroxidase-like 2 et catalase) est également activée, certainement pour contrebalancer la production de ROS pouvant éventuellement devenir néfaste pour l'hôte (Dussaubat *et al.*, 2012). Il est important de noter que les modifications transcriptionnelles observées pour certains gènes ne coïncident pas toujours avec l'activité enzymatique des produits de ces gènes suggérant des contrôles post-traductionnels importants (Dussaubat *et al.*, 2012).

Parallèlement au développement des réponses immunitaires humorale et cellulaire, l'hôte peut utiliser d'autres stratégies de défense comme l'apoptose. L'apoptose, ou mort cellulaire programmée, est un processus régulé conduisant au suicide de la cellule qui tient un rôle critique dans le développement, l'homéostasie et l'intégrité des organismes pluricellulaires (Rodrigues *et al.*, 2012). L'apoptose est également un mécanisme efficace utilisé par l'hôte pour contrôler une infection et limiter la multiplication d'un parasite intracellulaire. Le parasite lui-même peut moduler ce processus, soit en l'inhibant pour maintenir l'intégrité de l'environnement cellulaire dont il a besoin pour se développer, soit en l'activant pour faciliter la dissémination de stades infectieux (Rodrigues *et al.*, 2012). Des données très récentes suggèrent que l'infection de l'intestin de l'abeille par *N. ceranae* inhibe la machinerie apoptotique des cellules hôtes permettant ainsi aux spores de se multiplier à l'intérieur de celles-ci (Higes *et al.*, 2013a). L'inhibition de l'apoptose pourrait être un mécanisme commun aux microsporidies puisqu'il a déjà été décrit dans plusieurs genres (Scanlon *et al.*, 1999; del Aguila *et al.*, 2006).

L'ensemble de ces données ne permet donc pas à ce jour d'appréhender clairement les mécanismes de défense mis en place en réponse à l'infection par *N. ceranae*; des études supplémentaires sont donc nécessaires.

3.5.2. La réponse immunitaire à l'échelle de la colonie

L'immunité sociale

Des études comportementales réalisées chez les abeilles mellifères et chez d'autres insectes eusociaux ont mis en évidence des stratégies visant à les protéger contre les maladies. Ces comportements spécifiques transforment la colonie en un environnement relativement stérile et ont pour conséquence une réduction drastique de l'exposition aux agents pathogènes. Cette défense collective contre les agents pathogènes résultant d'une coopération comportementale entre individus est appelée immunité sociale (Evans & Spivak, 2010).

Le toilettage est l'une des actions majeures réalisées par les abeilles dans le cadre de l'immunité sociale. Une abeille peut se toiletter elle-même, ou bien toiletter l'une de ses congénères. Ce comportement permet d'éliminer des particules indésirables et des parasites (Evans & Spivak, 2010). Chez l'abeille mellifère, le comportement hygiénique est une réponse collective des abeilles adultes à la présence de couvain malade ou parasité. Les larves ou les nymphes atteintes d'une maladie sont détectées d'une manière olfactive par les abeilles responsables du comportement hygiénique puis éliminées par ces dernières (Tautz, 2009; Wilson-Rich *et al.*, 2009; Evans & Spivak, 2010). Le comportement nécrophorique consiste en l'élimination de toute congénère morte en dehors de la colonie dans le but de stopper la dissémination d'une maladie contagieuse. L'organisation sociale de la colonie aboutit à la création de différentes catégories à l'intérieur de la population avec des risques de transmission d'agents pathogènes variables. Par exemple, le polyéthisme d'âge permet de n'exposer que les individus les plus âgés à l'environnement extérieur. Les butineuses possèdent ainsi le plus fort risque d'exposition à des agents pathogènes mais également le plus faible risque de transmission de maladies aux congénères puisqu'elles effectuent de nombreuses sorties par jour qui les éloignent de la colonie (Evans & Spivak, 2010). Enfin, les ouvrières malades seraient capables d'abandonner la colonie en faisant preuve de « suicide altruiste » afin de prévenir la dissémination d'un agent pathogène (Rueppell *et al.*, 2010).

D'autres comportements visent à limiter l'exposition aux agents pathogènes au travers de la modification de l'environnement de la colonie. Les abeilles mellifères ont la capacité de réguler efficacement la température interne de la ruche ; elles peuvent rafraîchir l'enceinte de la ruche par ventilation en battant des ailes ou la réchauffer par contraction des muscles thoraciques (Wilson-Rich *et al.*, 2009). Cette capacité de thermorégulation est également utilisée comme défense contre certaines menaces biologiques : les abeilles peuvent se regrouper en boule dans le but d'augmenter la température à au moins 45 °C autour d'un prédateur tel qu'une guêpe. Ce comportement appelé « fièvre comportementale » pourrait être également un moyen de prévenir le développement de certaines maladies touchant notamment le couvain (Evans & Spivak, 2010). Les abeilles protègent

aussi leur colonie en appliquant de la propolis dans chaque interstice du corps de la ruche. La propolis est un assemblage complexe provenant de diverses sécrétions de plantes qui aurait des propriétés antifongiques et antibactériennes (Tautz, 2009; Evans & Spivak, 2010). La propolis est également utilisée pour recouvrir les envahisseurs morts (souris, insectes) de trop grande taille pour être évacués de la ruche par les abeilles. Cette forme d'encapsulation à grande échelle montre la fascinante analogie existant entre l'immunité cellulaire à l'échelle de l'individu et l'immunité sociale à l'échelle de la colonie. Enfin, les nourrices sécrètent dans la nourriture utilisée pour élever le couvain (la gelée royale, le pollen puis le miel) des molécules aux propriétés antibactériennes, produites par des enzymes comme la glucose oxydase principalement localisées dans leurs glandes hypopharyngées (Wilson-Rich *et al.*, 2009).

Effet de l'infection par *N. ceranae* sur l'immunité sociale

Très peu d'études ont analysé l'impact de *N. ceranae* sur les capacités de l'abeille mellifère à mettre en place une immunité sociale. En conditions naturelles, l'infection par *N. ceranae* ne modifie pas certains comportements importants de l'immunité sociale comme l'auto-toilettage ou le toilettage entre individus chez les abeilles infectées (McDonnell *et al.*, 2013). De plus, les congénères non infectées ne montrent aucun comportement agressif envers les abeilles parasitées, suggérant qu'elles ne viseraient pas à les exclure de la colonie (McDonnell *et al.*, 2013). Au contraire, le démarrage précoce d'une activité de butinage chez les abeilles infectées et leur non-retour à la ruche (→ 3.3.2.) suggèrent plutôt un phénomène d'abandon volontaire de la ruche dans le but de préserver la survie du reste de la colonie. Toutefois, des études supplémentaires sont nécessaires pour confirmer l'existence d'un tel comportement altruiste chez les abeilles infectées par *N. ceranae*.

L'infection par *N. ceranae* ne semble pas perturber la sécrétion de molécules antiseptiques dans la nourriture. En effet, le taux de la molécule antiseptique 10-HDA dans la tête ne varie pas entre des abeilles infectées par *N. ceranae* et des abeilles témoins (McDonnell *et al.*, 2013). De plus, l'activité enzymatique de la glucose oxydase impliquée dans la sécrétion de ces molécules antiseptiques n'est pas modifiée dans la tête d'abeilles 10 jours après une infection par *N. ceranae* (Alaux *et al.*, 2010a). Seules les abeilles exposées conjointement au parasite et à l'insecticide imidaclopride présentent une diminution significative de l'activité glucose oxydase, ce qui suggère une perturbation de l'immunité sociale lorsque les abeilles sont soumises à plusieurs facteurs de stress.

Les colonies d'abeilles subissent des effondrements qui résulteraient de l'impact combiné de nombreux facteurs de stress environnementaux. L'abeille est fréquemment exposée à la fois à des insecticides neurotoxiques, très utilisés en traitement de cultures agricoles, et au parasite *N. ceranae*, dont la prévalence peut être très forte au sein des colonies. Lorsqu'ils sont considérés indépendamment, ces deux facteurs de stress sont susceptibles d'affecter sévèrement la santé de l'abeille. Il est alors logique de se demander quel pourrait être l'impact combiné de ces facteurs sur la survie des abeilles. Une première étude réalisée par Alaux *et al.* en 2010 a d'ailleurs mis en évidence un effet synergique sur la mortalité des abeilles exposées de façon chronique à l'imidaclopride (70 µg/kg) et à un mélange de spores des parasites *N. apis* et *N. ceranae* (Alaux *et al.*, 2010a). Il nous a paru intéressant d'approfondir nos connaissances relatives aux interactions entre *N. ceranae*, espèce microsporidienne prédominante chez l'abeille, et des insecticides de classes différentes, utilisés à des concentrations retrouvées au sein des colonies et considérées comme sublétales par les tests de toxicité aiguë.

CHAPITRE 2

IMPACT DE L'ASSOCIATION *NOSEMA CERANAE*-INSECTICIDE SUR LA SURVIE DE L'ABEILLE MELLIFÈRE

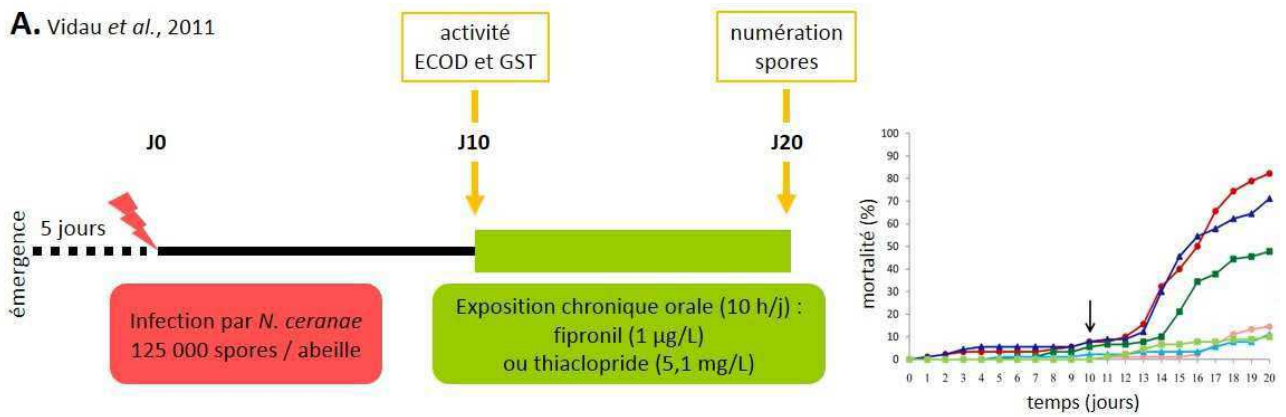
Introduction

Les êtres vivants sont constamment exposés à de multiples facteurs de stress environnementaux qu'ils soient de nature biotique comme les agents pathogènes ou abiotique comme les pesticides. Ces facteurs de stress interagissent souvent entre eux mais les effets interactifs qui en résultent sont encore peu connus. Si dans la majorité des études scientifiques chaque facteur de stress est étudié indépendamment des autres, l'analyse de l'impact combiné de stress multiples reçoit de plus en plus d'attention (Holmstrup *et al.*, 2010). Plus particulièrement, l'impact de l'interaction entre agents pathogènes et pesticides a été étudié chez des organismes aquatiques (Sures, 2008) comme les crustacés (Chang *et al.*, 2006; Coors *et al.*, 2008; Jansen *et al.*, 2011a, 2011b; Tumburu *et al.*, 2012), les amphibiens (Kiesecker, 2002), les mollusques (Morley, 2010) et les poissons (Eder *et al.*, 2007, 2008; Shelley *et al.*, 2009). Certaines études montrent que les facteurs de stress chimiques tels que les pesticides peuvent exacerber les effets néfastes d'une infection (Holmstrup *et al.*, 2010). À l'inverse, une forte sensibilité de l'agent pathogène aux xénobiotiques peut entraîner une diminution du taux d'infection chez l'hôte (Holmstrup *et al.*, 2010). Les xénobiotiques peuvent également avoir un effet direct sur le système immunitaire des invertébrés, en augmentant notamment la sensibilité de l'hôte à l'infection *via* un effet immunosuppresseur (Galloway & Depledge, 2001; Galloway & Handy, 2003). De plus, le parasitisme peut influencer la résistance des organismes aux pesticides (Agnew *et al.*, 2004).

La combinaison entre un agent pathogène et un pesticide peut s'avérer néfaste pour la survie des organismes et, dans de très nombreux cas, conduire à un effet synergique sur la mortalité de l'organisme étudié. La synergie est définie lorsque l'effet de deux facteurs combinés est supérieur à la somme des effets de ces mêmes facteurs pris individuellement (Holmstrup *et al.*, 2010). La synergie entre agent(s) pathogène(s) et pesticide(s) est d'ailleurs exploitée pour améliorer la lutte contre certaines espèces nuisibles dans le cadre de la gestion intégrée des nuisibles (ou integrated pest management, IPM) (Abrol & Shankar, 2012). Des champignons entomopathogènes sont en effet utilisés en association avec des insecticides chimiques pour contrôler la prolifération d'insectes nuisibles tels que des moustiques (Agnew *et al.*, 2004; Farenhorst *et al.*, 2009, 2010), ou des coléoptères (Koppenhöfer *et al.*, 2000a, 2000b, 2002; Morales-Rodriguez & Peck, 2009; Shapiro-Ilan *et al.*, 2011). Cette pratique permet d'améliorer l'efficacité des pesticides tout en diminuant les quantités utilisées et de contrer la résistance aux insecticides que développent les insectes nuisibles (Abrol & Shankar, 2012).

L'interaction entre parasites et insecticides pourrait également être néfaste à la survie d'autres insectes et il est important d'en déterminer l'impact, en particulier sur les espèces pollinisatrices

A. Vidau et al., 2011



B. Aufauvre et al., 2012

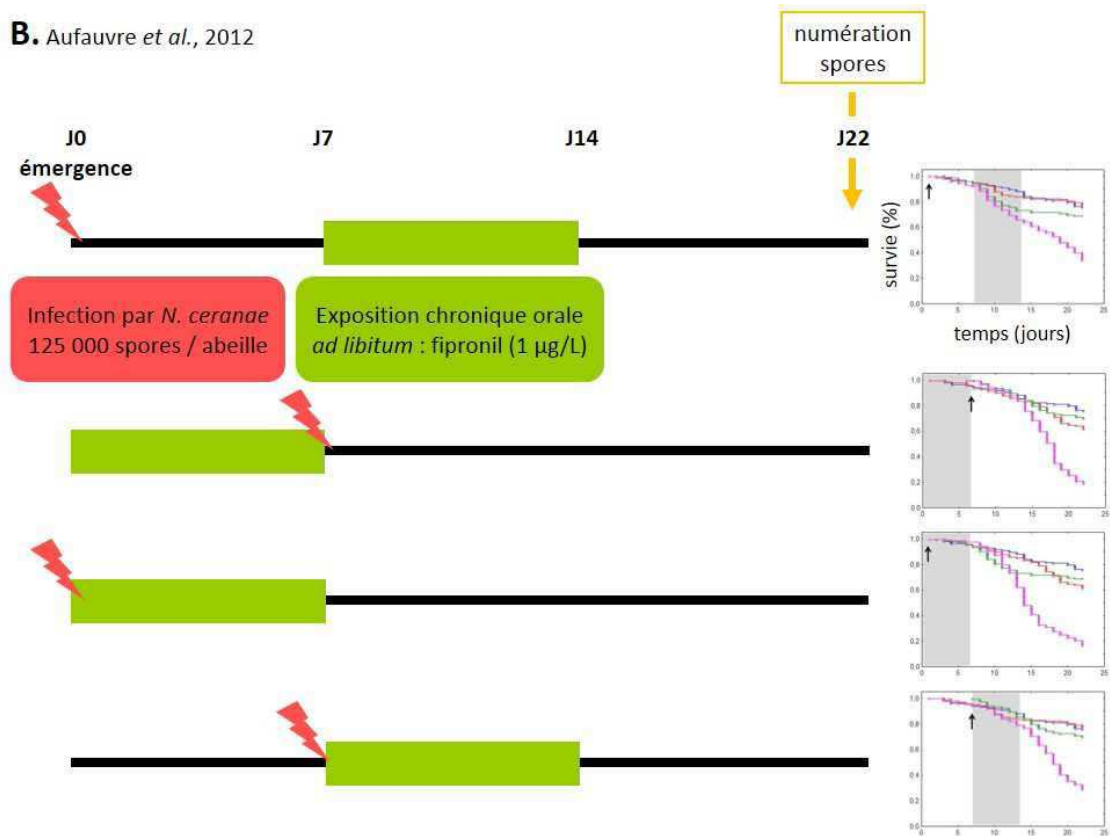


Figure 19. Protocoles d'exposition des abeilles à différentes combinaisons *N. ceranae*-insecticides utilisés lors des études (A) Vidau et al., 2011 et (B) Aufauvre et al., 2012.

comme l'abeille domestique (González-Varo *et al.*, 2013). De nombreuses études montrent que l'abeille domestique est très fréquemment exposée à de nombreux insecticides et agents pathogènes (Cox-Foster *et al.*, 2007; Mullin *et al.*, 2010; Cornman *et al.*, 2012; Lambert *et al.*, 2013). De plus, ces deux facteurs de stress sont très souvent incriminés dans les effondrements de colonies observés à l'échelle mondiale (Potts *et al.*, 2010; Ratnieks & Carreck, 2010; vanEngelsdorp & Meixner, 2010; vanEngelsdorp *et al.*, 2010).

Le premier objectif de cette thèse a été d'évaluer l'impact de l'association entre un parasite et des insecticides sur la survie de l'abeille domestique. Pour cela, nous avons choisi d'étudier le parasite *N. ceranae* et deux insecticides neurotoxiques : le thiaclopride et le fipronil qui appartiennent respectivement à 2 familles d'insecticides différentes, les néonicotinoïdes et les phénylpyrazoles. L'impact de ces insecticides sur la survie des abeilles semble dépendre de nombreux paramètres (molécule considérée, dose reçue lors du traitement, mode d'administration, etc...) et il est nécessaire d'évaluer spécifiquement l'effet d'expositions chroniques et orales à de faibles concentrations d'insecticides, potentiellement retrouvées au sein des colonies. Le parasite *N. ceranae* est, quant à lui, un agent pathogène prédominant au sein des colonies d'abeilles. Cependant, sa découverte chez *A. mellifera* est relativement récente et les données acquises à ce jour ne permettent pas d'appréhender son rôle exact dans les effondrements de colonies d'abeilles. Notre hypothèse est donc que ces deux facteurs de stress pourraient jouer un rôle important dans les surmortalités d'abeilles lorsqu'ils agissent en combinaison.

Nous avons dans un premier temps analysé l'impact de deux combinaisons différentes (*N. ceranae*-thiaclopride et *N. ceranae*-fipronil) sur la survie des abeilles en laboratoire (Figure 19.A). Cette étude a mis en évidence un effet synergique sur la mortalité d'abeilles exposées à l'une ou à l'autre de ces deux combinaisons. Nous avons de plus étudié l'impact de ces combinaisons sur le développement parasitaire et sur la consommation et les capacités de détoxification de l'hôte. Les résultats de cette première étude sont détaillés dans l'article publié en 2011 dans la revue PLoS ONE (Vidau *et al.*, 2011a).

Après avoir mis en évidence l'effet synergique de l'association *N. ceranae*-insecticide sur la mortalité des abeilles, nous avons évalué l'importance de l'ordre d'exposition aux facteurs de stress sur la synergie observée. En effet, dans leur habitat naturel, les abeilles peuvent être d'abord exposées au parasite puis à l'insecticide ou bien en ordre inverse. Nous avons donc émis l'hypothèse que différents ordres d'exposition pouvaient avoir des impacts contrastés sur la mortalité des abeilles, l'un des facteurs pouvant par exemple rendre l'hôte plus ou moins sensible à l'autre. Nous avons donc testé différents ordres de traitements (Figure 19.B) et montré que chaque scénario entraîne un effet synergique sur la mortalité des abeilles. De plus, nous avons pu mettre en évidence que l'impact de la combinaison *N. ceranae*-insecticide sur la survie de l'abeille est plus sévère lorsque les abeilles

sont exposées à ces facteurs de stress dès leur émergence. Ces résultats sont rapportés dans l'article publié en 2012 dans la revue *Scientific Reports* (Aufauvre *et al.*, 2012).

Exposure to Sublethal Doses of Fipronil and Thiacloprid Highly Increases Mortality of Honeybees Previously Infected by *Nosema ceranae*

Cyril Vidau^{1,2}, Marie Diogon^{1,2}, Julie Aufauvre^{1,2}, Régis Fontbonne^{1,2}, Bernard Viguès^{1,2}, Jean-Luc Brunet³, Catherine Texier², David G. Biron^{1,2}, Nicolas Blot^{1,2}, Hicham El Alaoui^{1,2}, Luc P. Belzunces³, Frédéric Delbac^{1,2*}

1 Clermont Université, Université Blaise Pascal, Laboratoire Microorganismes: Génome et Environnement, BP 10448, Clermont-Ferrand, France, **2** CNRS, UMR 6023, LMGE, Aubière, France, **3** INRA, UMR 406 Abeilles & Environnement, Laboratoire de Toxicologie Environnementale, Site Agroparc, Avignon, France

Abstract

Background: The honeybee, *Apis mellifera*, is undergoing a worldwide decline whose origin is still in debate. Studies performed for twenty years suggest that this decline may involve both infectious diseases and exposure to pesticides. Joint action of pathogens and chemicals are known to threaten several organisms but the combined effects of these stressors were poorly investigated in honeybees. Our study was designed to explore the effect of *Nosema ceranae* infection on honeybee sensitivity to sublethal doses of the insecticides fipronil and thiacloprid.

Methodology/Finding: Five days after their emergence, honeybees were divided in 6 experimental groups: (i) uninfected controls, (ii) infected with *N. ceranae*, (iii) uninfected and exposed to fipronil, (iv) uninfected and exposed to thiacloprid, (v) infected with *N. ceranae* and exposed 10 days post-infection (p.i.) to fipronil, and (vi) infected with *N. ceranae* and exposed 10 days p.i. to thiacloprid. Honeybee mortality and insecticide consumption were analyzed daily and the intestinal spore content was evaluated 20 days after infection. A significant increase in honeybee mortality was observed when *N. ceranae*-infected honeybees were exposed to sublethal doses of insecticides. Surprisingly, exposures to fipronil and thiacloprid had opposite effects on microsporidian spore production. Analysis of the honeybee detoxification system 10 days p.i. showed that *N. ceranae* infection induced an increase in glutathione-S-transferase activity in midgut and fat body but not in 7-ethoxycoumarin-O-deethylase activity.

Conclusions/Significance: After exposure to sublethal doses of fipronil or thiacloprid a higher mortality was observed in *N. ceranae*-infected honeybees than in uninfected ones. The synergistic effect of *N. ceranae* and insecticide on honeybee mortality, however, did not appear strongly linked to a decrease of the insect detoxification system. These data support the hypothesis that the combination of the increasing prevalence of *N. ceranae* with high pesticide content in beehives may contribute to colony depopulation.

Citation: Vidau C, Diogon M, Aufauvre J, Fontbonne R, Viguès B, et al. (2011) Exposure to Sublethal Doses of Fipronil and Thiacloprid Highly Increases Mortality of Honeybees Previously Infected by *Nosema ceranae*. PLoS ONE 6(6): e21550. doi:10.1371/journal.pone.0021550

Editor: Elizabeth Didier, Tulane University School of Public Health and Tropical Medicine, United States of America

Received: March 16, 2011; **Accepted:** June 1, 2011; **Published:** June 28, 2011

Copyright: © 2011 Vidau et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was funded by a grant from the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS, MIE: Maladies Infectieuses et Environnement). C.V. acknowledges the support of a Fellowship from the CNRS. J.A. and R.F. were supported by grants from the "Ministère de l'Éducation Nationale de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche". The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: frederic.delbac@univ-bpclermont.fr

Introduction

Honeybee pollination contributes to agriculture productivity and biodiversity. One-third of food consumed in the world is linked to the pollination activity of honeybees, representing a global economic worth of 153 billion euros in 2005 [1]. A significant and poorly understood decrease in honeybee populations, however, has been reported worldwide by beekeepers and scientists. Several factors have been proposed to explain the honeybee decline including nutrition, queen quality, intoxication by pesticides and parasitic diseases [2].

The honeybee, *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apoidea), may be exposed to a wide range of pesticides when foraging or consuming

contaminated food (pollen and honey) stocked into the hive [3]. Two classes of systemic pesticides, neonicotinoids and phenylpyrazoles, are mainly suspected for negative effects on honeybee health. There are intense debates about the use and the eventual restriction of these pesticides. In many studies, the lack of knowledge about their toxicological profile has prevented drawing conclusions about a causal link between exposure to insecticides and the honeybee decline [4]. This is partly due to the fact that the assessment of the risk posed by pesticides is mainly based on the determination of acute toxicity using LD₅₀ as the critical toxicological value [5]. This approach is contested because it cannot account for chronic toxicity and sublethal effects that are highly important elements of neonicotinoid and phenylpyrazole toxicity in honeybees [6–8].

Indeed, low doses of neonicotinoids and phenylpyrazoles induce a broad range of sublethal effects such as behavioral or physiological alterations in honeybees and other beneficial arthropods [9].

The adverse effects usually induced by pesticides are limited by the action of a large set of metabolic enzymes. Although honeybees have fewer genes involved in detoxification than other insects [10], they are not necessarily more sensitive to pesticides [11]. In honeybees, detoxification processes occur mainly in both midgut and fat body [12], very similar to those of mammals [13]. Induction of microsomal monooxygenases and glutathione-S-transferase is one of the key mechanisms of insect sensitivity to pesticides [13,14]. The role of detoxification enzymes, however, is not limited to the protection of insect against the deleterious effects of pesticides. These enzymes are also involved in the metabolism of endogenous compounds such as hormones and pheromones [10]. Therefore, changes in the activity of the detoxification system can lead to variations in honeybee sensitivity to pesticides and more generally to alteration of their physiological homeostasis.

Parasites may also impact insect homeostasis to promote their development. This usually induces changes in insect development, behavior, reproduction and parasite tolerance. Physiological changes induced by parasitism can render insects more susceptible to environmental stressors such as pollutants and may cause a reduction of insect fitness [15]. This trend is particularly exploited in the concept of integrated pest management (IPM) where entomopathogenic parasites are used in association with insecticides at low doses [16–18]. Honeybees are also victim to such joint effects between parasites and insecticides. Potential interactions between *Nosema* and pesticides have been firstly described by Ladas in 1972 [19]. More recently, Alaux et al. demonstrated that co-exposure to microsporidian parasites and imidacloprid weakens honeybee [20]. This result corroborates the hypothesis of a multifactorial cause for the massive colony losses observed worldwide.

Two microsporidian species, *Nosema apis* and *Nosema ceranae*, are the agents of two major diseases known as nosemoses A and C, respectively [21]. Both species are obligate intracellular parasites of adult honeybees. *N. ceranae* increases energetic demand in honeybees [20,22] and decreases hemolymph sugar level [23]. Furthermore, *N. ceranae* infection significantly suppresses the honeybee immune response [20,24] and increases ethyl -oleate content (a primer pheromone which regulates worker behavioral maturation) [25]. Finally, *N. ceranae*-infected honeybees have shorter life-spans than uninfected honeybees [20,26].

There are no data related to the effect of *N. ceranae* on the detoxification system of honeybees. Therefore, it is not possible to consider the link between *N. ceranae* infection, detoxification capacity of infected honeybees and their sensitivity to pesticides. However, we hypothesized that detoxification system could be modified by *Nosema* infection given that detoxification mainly occurs in the gut and that this tissue is the site of *N. ceranae* proliferation. In this study, we assessed the impact of *N. ceranae* infection on detoxification activity of honeybees as well as their sensitivity to fipronil (phenylpyrazole) and thiacloprid (neonicotinoid), two pesticides found at high levels in hives [3]. Based on their oral LD₅₀ values, fipronil (LD₅₀: 4.17 ng/bee) and thiacloprid (LD₅₀: 17 µg/bee) are considered highly and slightly toxic, respectively, to honeybees [27]. We demonstrate, however, that a daily exposure 1/100th concentration of the LD₅₀ significantly affects the mortality rate of *N. ceranae*-infected honeybees.

Materials and Methods

Experimental procedures and artificial rearing

All experiments were performed with a mixture of honeybees from three Buckfast colonies (crossed with the *Apis mellifera mellifera*

honeybee). We used 3 colonies to get sufficient emergent bees for all the experiments (~2000 bees). We confirmed that these colonies were free of *Nosema* by PCR using primers previously described [26]. Two frames of sealed brood were taken in each colony and placed in an incubator in the dark at 35°C with 80% relative humidity. Emerging honeybees were collected, confined to laboratory cages (Pain type) in groups of 50, and maintained in the incubator for five days. During this time, the caged honeybees were fed with candy (Apifonda®) and water *ad libitum* and were supplied with pollen. To mimic the hive environment as much as possible, a little piece of wax and a Beeboost® (Pherotech, Delta, BC, Canada) releasing a queen's mandibular pheromone, were placed in each cage. After five days of feeding, six experimental groups of individuals were created: (i) uninfected controls, (ii) infected with *N. ceranae*, (iii) uninfected and chronically exposed to fipronil, (iv) uninfected and chronically exposed to thiacloprid, (v) infected with *N. ceranae* and chronically exposed 10 days post-infection (p.i.) to fipronil, and (vi) infected with *N. ceranae* and chronically exposed 10 days p.i. to thiacloprid.

Honeybees were first individually infected (see below honeybee infection) and fed during 10 days with 50% (w/v) sugar syrup supplemented with 1% (w/v) proteins (Provita'bee, Biové laboratory) 10 h per day and thereafter (14 h per day) were fed with candy and water *ad libitum*. Each day, feeders were replaced and the daily sucrose consumption was quantified. Ten days after infection, honeybees were then exposed to fipronil or thiacloprid by ingesting insecticide-containing sugar syrup *ad libitum* (see below exposure to insecticides). Honeybees not exposed to insecticides were fed *ad libitum* with 0.1% DMSO-containing sugar syrup. The feeders were replaced and the daily insecticide consumption was quantified. Throughout the experiment, each cage was checked every morning and any dead honeybees removed and counted.

Honeybee infection

Spores of *N. ceranae* were obtained from honeybees infected experimentally in our laboratory. After sacrifice, the intestinal tract of infected honeybees was dissected and homogenized in PBS using a manual tissue grinder. The suspension was filtered through No. 1 Whatman mesh and the resulting suspension was cleaned by centrifugation and resuspended in PBS. The spore concentration was determined by counting with a hemacytometer chamber. *Nosema* species was confirmed by PCR according the procedure described by Higes et al. [26].

At 5 days post-emergence, caged bees were starved for 3 h, CO₂ anaesthetized and spread individually in “infection boxes” consisting of 40 ventilated compartments (3.5×4×2 cm). Each compartment was supplied with a tip containing 125,000 spores of *Nosema ceranae* diluted in 3 µL of water. “Infection boxes” were placed in the incubator and 1 h later, bees that have consumed the total spore solution were again encaged (50 bees per cage). Non-infected bees were similarly treated without *N. ceranae* spores in the water.

Exposure to insecticides

At 10 days p.i., honeybees were exposed *ad libitum* to fipronil or thiacloprid by ingesting insecticide-containing sugar syrup (50% sucrose solution, w/v) supplemented with 1% protein (Provita'bee, Biové laboratory). Stock solutions of fipronil (1 g/L) and thiacloprid (5.1 g/L) were prepared in DMSO and diluted in sugar syrup to obtain a final concentration of 50% sucrose, 1% protein, 0.1% DMSO and 1 µg/L fipronil or 5.1 mg/L thiacloprid. To expose honeybees to sublethal doses of insecticides, the final concentrations were determined so that honeybees absorbed daily an insecticide quantity corresponding to about 1/

100th of the LD₅₀. The actual insecticide consumption was quantified by measuring the daily amount of insecticide-containing sugar syrup consumed per bee.

Preparation of microsomal and cytosolic fractions

Enzyme extraction was performed 10 days p.i. for control and *N. ceranae*-infected honeybee groups. Honeybees were CO₂-anaesthetized and sacrificed by decapitation, the intestinal tract was dissected, and the midgut was separated from the rectum. Ten abdomens devoid of intestinal tract (containing the fat body) and 50 midguts were pooled in ice-cooled tubes and frozen at -80°C until homogenization. They were homogenized twice at 4°C , (TissuLyserTM; Qiagen; 5×10 s at 30 MHz) in extraction buffer (1% KCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 0.1 mg/mL soybean inhibitor and 50 mM Tris-HCl pH 7.6). The homogenates were then centrifuged at $12,000 \times g$ for 20 min at 4°C and the resulting supernatants centrifuged at $105,000 \times g$ for 60 min at 4°C . The final supernatants (containing GST activity) were frozen at -80°C and the microsomal pellets (containing ECOD activity) were resuspended in 20% glycerol (v/v), 1 mM EDTA, 1 mM PMSF and 100 mM sodium phosphate pH 7.4 and frozen at -80°C until analysis. Protein concentration was estimated for each preparation by the technique of Lowry et al. [28] using a standard curve generated from known amounts (5–35 μg) of BSA.

7-ethoxycoumarin-O-deethylase (ECOD) assay

The measurement of 7-ethoxycoumarin-O-deethylase (ECOD) activity was done as described by de Souza et al. [29]. Briefly, ECOD activity was measured in midgut and abdomen devoid of intestinal tract (*i.e.* the fat body) by adding 1 mg of microsomal proteins to the reaction mixture containing, 0.5 mM NADP, 5 mM G6P, 10 mM MgCl₂, 1 U G6PD, 200 μM 7-ethoxycoumarin and 100 mM Tris-HCl pH 7.4. After 30 min of incubation, the reaction was stopped with TCA 60% (p/v) then adjusted to pH 9.0 with 1.6 M glycine-NaOH. The medium was centrifuged at $3000 \times g$ for 7 min and the production of 7-hydroxycoumarin was quantified by recording the fluorescence (λ_{ex} 380 nm and λ_{em} 455 nm) with a fluorimeter (SFM 25, Kontron instruments) apparatus. The amount of 7-hydroxycoumarin formed by the ECOD activity assay was determined with a standard curve generated from known amounts (0–100 nM) of 7-hydroxycoumarin.

Glutathione-S-Transferase (GST) assay

Glutathione-S-Transferase (GST) activity was spectrophotometrically assayed by measuring the conjugation of GSH to 1-chloro-2,4-dinitrobenzene using a method adapted from Habig et al. [30]. GST activity was measured in midgut and abdomen by adding enzymatic extract to the reaction mixture containing 1 mM EDTA, 2.5 mM GSH, 1 mM 1-chloro-2,4-dinitrobenzene and 100 mM Na/K-phosphate pH 7.4. GST activity was quantified by recording the appearance of conjugated product at 340 nm during 5 min. GST activity was calculated using Beer Lambert law with $\epsilon_{340} = 9,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Statistical analysis

Statistica 7.0 (StatSoft inc., Tulsa, USA) was used for the statistical analysis. The significance thresholds were deemed as significant ($p \leq 0.05$), highly significant ($p \leq 0.01$), or very highly significant ($p \leq 0.001$). Mann-Whitney U Test, a non-parametric test, was used to compare the sucrose and insecticide consumptions at 10 days p.i. Detoxification enzyme activities in both midgut and fat body from control and *N. ceranae*-infected groups were compared

by using the Mann-Whitney U Test. The effect of *N. ceranae* infection on honeybee sensitivity from exposure to insecticides was analyzed with a survival analysis taking into consideration all groups followed by a Cox-Mantel test (Life Tables) to determine the significant difference between each group. The Wald-Wolfowitz Runs Test (W-W Runs test) was used to compare insecticide uptake in fipronil only, thiacloprid only, *N. ceranae*-fipronil and *N. ceranae*-thiacloprid groups. A Kruskal-Wallis test combined with a multiple comparison of mean ranks for all groups was used to determine the effect of exposure to insecticides on *N. ceranae* spore production in the digestive tract (*i.e.* midgut and rectum).

Results

Honeybee infection

The success of *N. ceranae* infection was monitored by measuring sucrose consumption of honeybees and counting spores present in their digestive tract 10 days p.i. Light microscopy analysis revealed that numerous *foci* of *N. ceranae* were present at 10 days p.i. in the epithelium cells of infected-bees (**Fig. 1A**). A mean of $18.4 \cdot 10^6 \pm 0.4 \cdot 10^6$ spores per honeybee was measured in infected honeybees whereas no spore was observed in uninfected honeybees. PCR analysis confirmed the infection by *N. ceranae* for the infected honeybee group (data not shown). Energetic stress was the main symptom of *Nosema* infection. Thus, the sucrose consumption was compared between infected and uninfected honeybees. For each group (*i.e.* control and infected by *N. ceranae*), the amount of sucrose consumed daily increased with time but differed between these two groups (*i.e.* treatment) (**Fig. 1B**). Indeed, at 10 days p.i., honeybees infected by *N. ceranae* consumed much more sucrose than uninfected honeybees (M-W U test = 2.0, $p = 0.0007$).

Changes in detoxification enzyme activity in both midgut and fat body

ECOD and GST are considered representative of phase I and phase II activities of the detoxification system. The effect of *N. ceranae* on ECOD activity was studied in fat body and mid-gut at 10 days p.i. Infection induced no significant changes in ECOD activity both in midgut (M-W U test = 9.0, $p = 0.150$) and fat body (M-W U test = 16.0, $p = 0.749$) (**Fig. 2A**). Conversely, GST activity was highly significantly increased in midgut (M-W U test = 0, $p = 0.003948$) and fat body (M-W U test = 0.0, $p = 0.003948$) of infected honeybees (**Fig. 2B**). GST activity measured in midgut and fat body of infected honeybees was increased 1.6-fold and 1.7-fold, respectively, compared to the GST activity measured in uninfected honeybees.

Sublethal doses of fipronil and thiacloprid increases mortality of *Nosema ceranae*-infected honeybees

The effect of exposure to insecticides on honeybee mortality was assessed in both uninfected and *N. ceranae*-infected honeybees. Survival analysis indicated that *N. ceranae* infection induced a very highly significant increase in honeybee mortality compared to the uninfected control group of honeybees (Cox-Mantel test, $U = 31,78$, $p < 10^{-5}$) (**Fig. 3A**). Exposures to fipronil (Cox-Mantel test, $U = 1.87$, $p = 0.51768$) and thiacloprid (Cox-Mantel test, $U = 0.96$, $p = 0.73395$) had no effect on the mortality of uninfected honeybees compared to uninfected and untreated control group over the duration of our experiments (**Fig. 3A**). Interestingly, honeybee exposure to fipronil (Cox-Mantel test $U = 38,41$, $p < 10^{-5}$) and thiacloprid (Cox-Mantel test $U = 28,26$, $p < 10^{-5}$) influenced very highly significantly the amplitude and the time course of *N. ceranae*-induced honeybee mortality (**Fig. 3A**). Indeed, honeybees infected with *N. ceranae* and then exposed to insecticides died earlier than bees only infected. In addition, at the end of the experiment (20

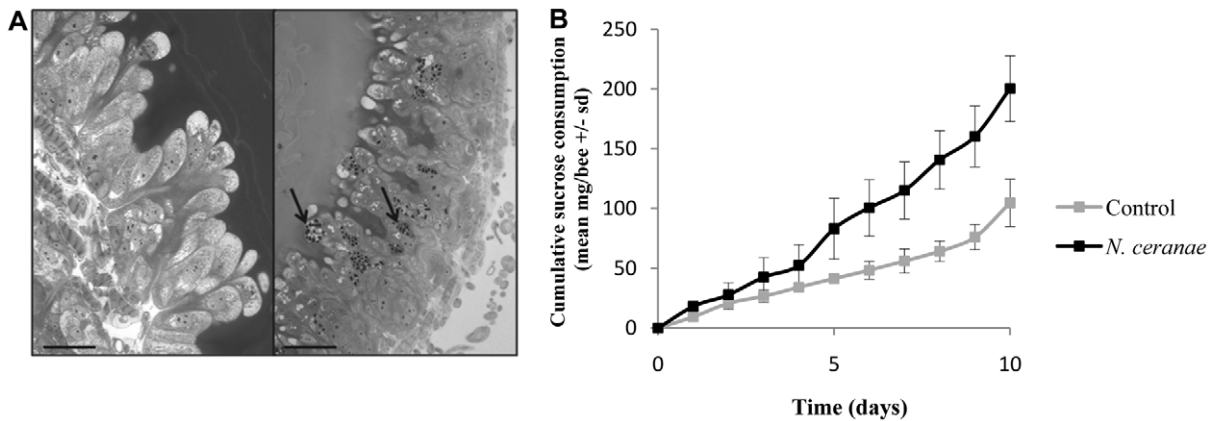


Figure 1. Infection monitoring. (A) Semi-thin sections of midgut epithelium of control (left) and infected (right) honeybees stained with toluidin blue. Arrows indicate *N. ceranae* foci. Bar = 25 μ m. (B) Effect of *N. ceranae* infection on sucrose consumption. Data represent the mean of cumulative sucrose consumption (mg/bee \pm standard deviation, sd) from 9 replicates, each containing 50 honeybees. doi:10.1371/journal.pone.0021550.g001

days p.i.), while mortality of only infected honeybees reached a maximum of 47%, the mortalities observed in infected honeybees exposed to fipronil and thiacloprid were not significantly different from each other (Cox-Mantel test $U = -10,4864$, $p = 0.13265$) and reached a maximum of 82 and 71%, respectively (Fig. 3A). Comparison of insecticide uptake in fipronil, thiacloprid, *N. ceranae*-fipronil and *N. ceranae*-thiacloprid groups revealed that total consumption of each insecticide at 20 days p.i. was not different in non-infected and *N. ceranae*-infected honeybees for both fipronil (W-W Runs test = 0.46, $p = 0,64808$) and thiacloprid (W-W Runs test = 1.37, $p = 0,17090$). Also, the daily insecticide uptake was not different in non-infected and *N. ceranae*-infected honeybees for both fipronil (Fig. 3B) and thiacloprid (Fig. 3C). After exposure to insecticides, uninfected honeybees did not display any signs of intoxication. By contrast, at this level of exposure, insecticides triggered aggressiveness and tremors in infected honeybees during the first days of exposure, and later exhibited ataxia.

Effect of insecticide exposure on *N. ceranae* spore production

Spore production was monitored at 20 days p.i. in all groups (Fig. 4). No *N. ceranae* spore was observed in control uninfected

bees and insecticide-exposed uninfected honeybees (data not shown). In *N. ceranae*-infected honeybees, a mean of 112.1×10^6 (± 16.7) spores/bee was counted. Interestingly, statistical analysis (Kruskal-Wallis test combined to a multiple comparison of mean ranks for all groups) revealed that exposure to fipronil reduced significantly ($p = 0.011763$) the spore production in infected bees to 74.8×10^6 (± 12.0) whereas exposure to thiacloprid enhanced highly significantly ($p = 0.0035, 99$) the spore production up to 156.9×10^6 (± 13.3) spores/bee.

Discussion

In this study, we showed that sublethal doses of a neonicotinoid (thiacloprid) and of a phenylpyrazole (fipronil) highly increased mortality of honeybees previously infected by the microsporidian parasite *N. ceranae*. Although the exact mechanism involved in this synergistic effect remains unclear, our data suggest that the sensitization process is not strongly linked to a decrease of detoxification capacity in infected bees or necessarily by an enhancement of *N. ceranae* proliferation after exposure to insecticides.

During our experiments, no mortality was observed at 10 days p.i. in infected honeybees. Numerous foci were visible in their

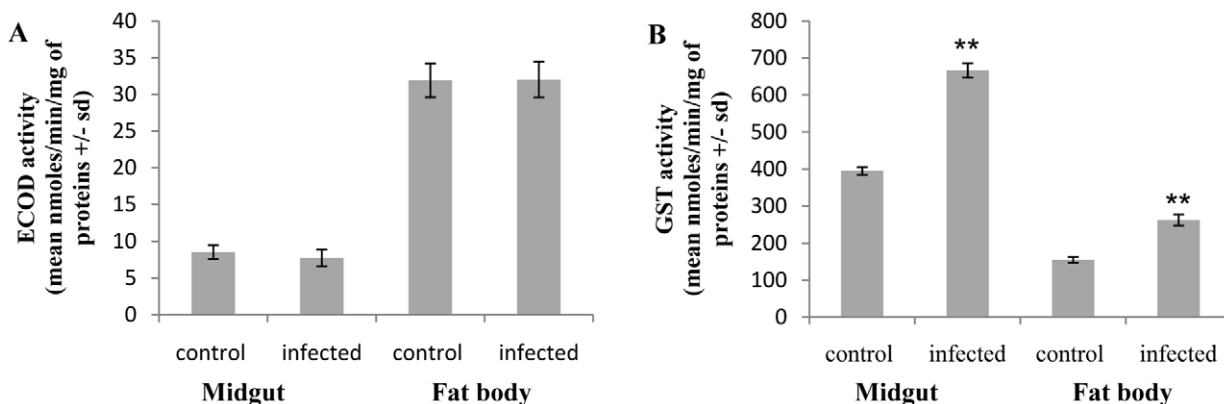


Figure 2. Effect of *N. ceranae* infection on ECOD (A) and GST (B) activities at 10 days p.i. in midgut and fat body of honeybees. Data represent the mean of specific activity (nmoles/min/mg of proteins \pm standard deviation, sd) from 6 replicates (45 honeybees/replicate) of control and infected honeybees. Asterisks indicate the level of significance at $p < 0.01$ (**). ECOD: 7-ethoxycoumarin-O-deethylase; GST: Glutathione-S-Transferase. doi:10.1371/journal.pone.0021550.g002

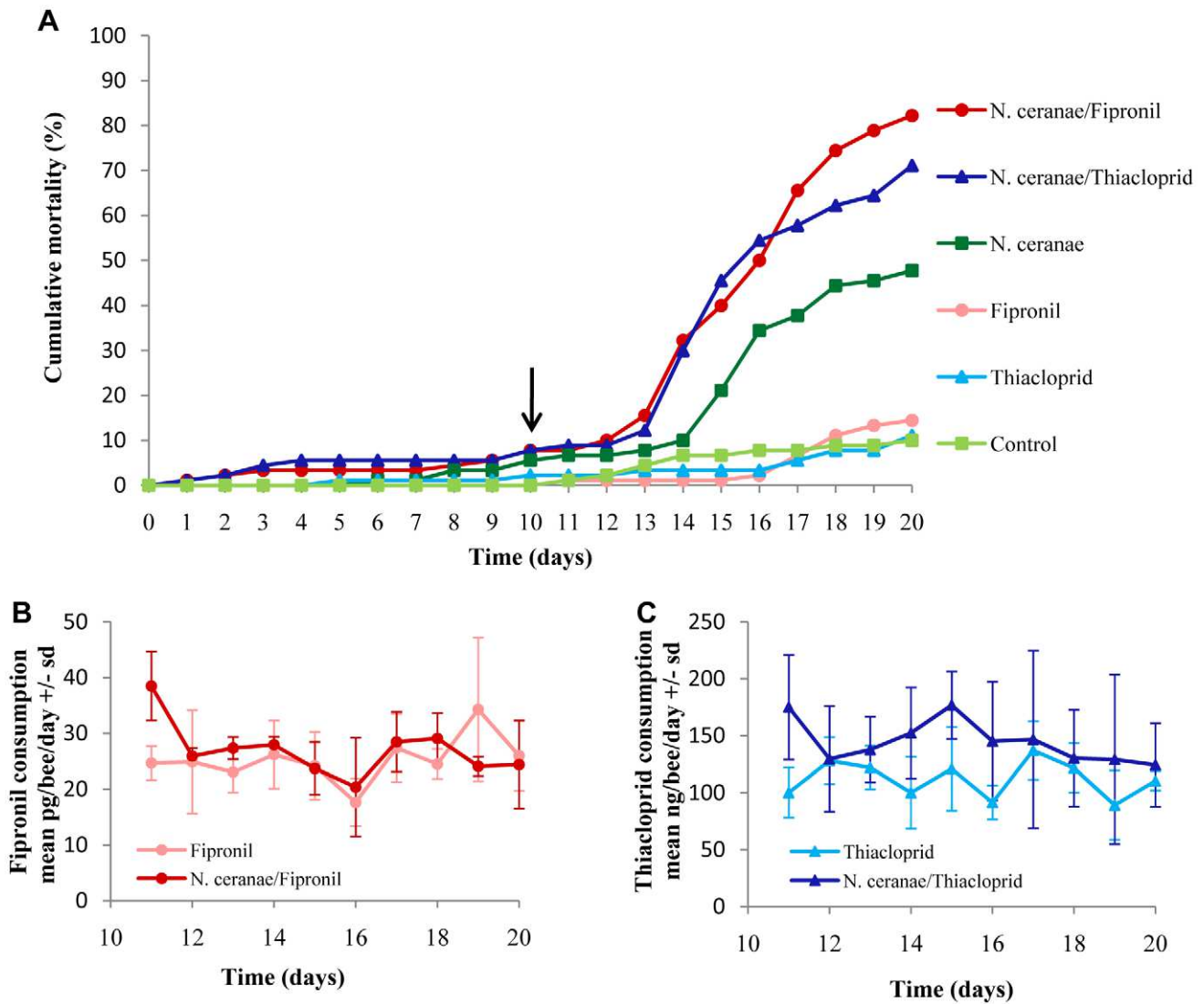


Figure 3. Effect of *N. ceranae* infection on honeybee sensitivity to insecticides. (A) Percentage of honeybee mortality of (i) uninfected control (light green square), (ii) *N. ceranae*-infected (dark green square), (iii) uninfected and chronically exposed to fipronil (light red circle), (iv) uninfected and chronically exposed to thiacloprid (light blue triangle), (v) *N. ceranae*-infected then chronically exposed to fipronil (dark red circle) and (vi) *N. ceranae*-infected then chronically exposed to thiacloprid (dark blue triangle). The arrow indicates the time of exposure to insecticides (10 days p.i.). Data represent the percentage of cumulative mortality calculated from 3 cages, each containing 50 honeybees. The means of fipronil (B) and thiacloprid (C) consumptions (pg or ng/bee/day \pm standard deviation, sd) were daily-monitored until 20 days p.i. for both infected (dark red or blue) and uninfected (light red or blue) honeybees. doi:10.1371/journal.pone.0021550.g003

epithelial cells and a mean of $18.4 \cdot 10^6 (\pm 0.4 \cdot 10^6)$ spores/honeybee was measured in their digestive tract. Our results contrast with previous data by Higes et al. [26] who described 100% of honeybee mortality at 8 days p.i. with *N. ceranae*, but are comparable to mortality rate and spore production observed by Paxton et al. [31]. In addition, the very highly significant enhanced sucrose consumption by infected honeybees is consistent with the energetic stress recently described by Mayack and Naugh [22]. Thus, at 10 days p.i., we can consider that the infected honeybees of our study displayed a level of *N. ceranae* invasion seen in forager honeybees [32].

The first evidence of a synergistic interaction between *Nosema* infection and insecticide exposure in honeybees was described by Alaux et al. [20]. These authors demonstrated that *Nosema* spp treatment combined with exposure to imidacloprid, another neonicotinoid, resulted in a higher mortality of honeybees. Based

on these results, we hypothesized that *N. ceranae* infection could alter the functioning of detoxification system. We assessed the ECOD and GST activities to test this hypothesis. In insects, ECOD and GST activities have often served as convenient measures of overall phases I and II metabolizing enzyme activities. In addition, levels of ECOD and GST activities have been associated with sensitivity to insecticides [33,34]. Our results showed that ECOD activity remained unchanged at 10 days p.i. in fat body and midgut whereas GST activity increased significantly in both tissues. Therefore, these data indicated that the higher mortality observed after insecticide exposure in *N. ceranae*-infected honeybees was not strongly linked to a decrease in detoxification capacity. However, we cannot exclude that infection by *N. ceranae* could modify other enzymes involved in detoxification of these insecticides. Despite this observation, exposure to sublethal doses of fipronil and thiacloprid increased the mortality rate in *N. ceranae*-

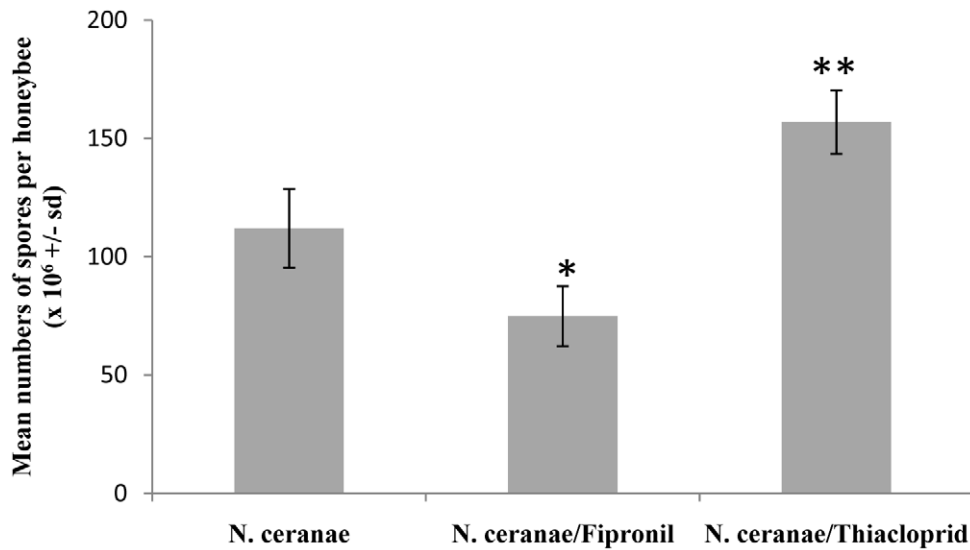


Figure 4. Effect of exposure to insecticides on *N. ceranae* spore production. The spore production in the digestive tract (midgut and rectum) was assessed at 20 days p.i. Data represent the mean numbers of spores/honeybee ($\times 10^6 \pm$ standard deviation, sd) from 15 honeybees, 20 days p.i. Asterisks indicate the level of significance at $p < 0.05$ (*) and $p < 0.01$ (**). doi:10.1371/journal.pone.0021550.g004

infected honeybees. Indeed, in our experimental procedure, at 10 day p.i. honeybees were chronically exposed to very low doses of insecticides during 10 days. Fipronil consumption was not different in infected and uninfected honeybees. The mean of daily fipronil consumption corresponded to an exposure equivalent to the $LD_{50}/158$ (25.3 ± 4.8 pg/bee) for uninfected honeybees and $LD_{50}/148$ (26.9 ± 0.8 pg/bee) for infected honeybees. A comparable exposure level has been previously considered as sublethal by Aliouane et al. [35]. In the same way, honeybees exposed to thiacloprid consumed a similar daily quantity of insecticides of $LD_{50}/151$ (112.1 ± 4.4 ng/bee) and $LD_{50}/112$ (152.8 ± 8.7 ng/bee) for uninfected and infected honeybees, respectively. As suspected, these levels of fipronil and thiacloprid exposure had no effect on the mortality of uninfected honeybees and on their behavior. Surprisingly, the same levels of exposure caused symptoms of poisoning in infected honeybees and influenced the mortality rate.

Because this metabolic hypothesis failed to explain the sensitization process observed with mortality data, we assessed the effect of exposure to insecticides on spore production. Our results indicated that exposure to fipronil and thiacloprid had antagonist effects on spore production. Indeed, in comparison to infected honeybees not exposed to insecticides, the spore production decreased by about 33% during exposure to fipronil whereas the spore production increased by 40% with thiacloprid exposure. These results then, do not explain the mortality increase observed in the presence of insecticides. First, exposures to fipronil and thiacloprid induced an increase in mortality among infected honeybees but had opposite effects on spore production. Second, in the case of thiacloprid, the spore overproduction did not seem sufficient to explain the enhancement of honeybees' mortality.

The interactive effect seen between *N. ceranae* and insecticides on honeybee mortality was consistent with the observations in honeybees infected with *Nosema* sp and exposed to imidacloprid [20]. While the synergistic effect observed by Alaux et al. [20] seemed to be linked to an increased consumption of imidacloprid by infected honeybees, the synergistic effect observed in our study, however, was not due to increased food intake following infection.

These new data on the synergistic action of *Nosema* and insecticides highlight that such interactions are not restricted to neonicotinoids (imidacloprid, thiacloprid) but extend to other classes of insecticides including phenylpyrazoles.

A further generalization of this phenomenon in honeybees exposed to other insecticides would not be surprising. Several classes of chemical insecticides have already shown potency to interact synergistically with entomopathogenic fungi in other insect species. These kinds of combination are commonly used in integrated pest management because they counteract resistance to insecticides of many insects [36] and allow reducing insecticide doses spread in the environment [16,37,38]. For instance, organophosphorus compounds (oxydemeton methyl) and pyrethrinoid (permethrin) insecticides used in combination with *Beauveria bassiana*, induced a higher impact on *Spilactia obliqua* [39] and *Anopheles gambiae* [36] survival, respectively, than the use of these control agents alone. In general, the synergistic effect of these combinations appears at insecticide doses considered sublethal to the target insect [17,40]. As is our study, the major pattern observed with these combinations included an increase in insecticide toxicity (decrease in LD_{50} or LC_{50}) and a decreased time to onset of insect mortality. This suggests that susceptibility of insects to pesticides is a more complex phenomenon than previously thought. The influence of parasitism in the ecosystem must be considered in toxicological studies. As shown in our study, the use of the LD_{50} as an indicator of systemic insecticide toxicity leads to an underestimation of the deleterious effects induced in infected honeybees. Indeed, we demonstrated that sublethal doses of insecticides highly impacted *Nosema*-infected honeybee mortality. This precaution is important since *N. ceranae* spreads rapidly and can affect more than 80% of honeybee colonies [41].

Numerous examples of interactions between chemicals and pathogens that affect the insect lifespan have been described [15,17,39,42–44]. Unfortunately, physiological mechanisms involved in these interactions remain poorly understood and may even appear to be contradictory. One of the current hypotheses explaining the synergistic effect of such combinations suggests that pathogen metabolites may interfere with the detoxification process [36,45].

Reallocation of insecticide-detoxifying enzymes to counteract parasitic infections possibly reduces the quantity of enzymes available to target insecticides resulting in changes of insecticide toxicokinetics. Thus, it is possible that the synergistic effect results in an effective increase in sensitivity to insecticides in the presence of a proliferating parasite infection. Ironically, the few published data about the effect of parasitism on metabolizing enzymes of insects showed that a large set of parasitic infections could activate several proteins implicated in insect detoxification (e.g. CYP's, GST, esterases) [45–50]. Consistently, we showed in our study, that 10 days after infection by *N. ceranae*, the GST activity was enhanced in midgut and fat body of honeybees, in agreement with the increase of the antioxidant activity recently described in *Nosema*-infected queens [51]. This result contrasts with the enhancement of infected-honeybees susceptibility to insecticides, suggesting that GST would not be involved in detoxification process of both fipronil and thiacloprid. However, the production of microsomal monooxygenases is an inducible process [52] and it remains possible that induction of detoxification genes in response to exposure to insecticides was prevented by *Nosema* infection. Thus, uninfected honeybees would be able to respond to insecticides by enhancing detoxification process whereas infected honeybees may not. This could explain the symptoms of intoxication observed in infected honeybees.

Curiously, in most studies reporting synergistic effect of fungus/insecticide combination, the impact of exposure to insecticides on parasite virulence was not investigated [36,39,40,43]. In the rare studies addressing this aspect, the parasite virulence was not enhanced by the insecticides. Instead, despite the synergistic effect on insect mortality, it appears that exposure to insecticides tends to decrease germination or proliferation of the fungus [44]. Indeed, insecticides have potential to affect the various developmental stages of entomopathogenic fungi [18,53,54] to further justify why studies of compatibility between parasites and insecticides are important for developing IPM applications. In our study, fipronil and thiacloprid

have antagonist effect on *N. ceranae* proliferation whereby fipronil decreases slightly spore production in honeybees. This effect can be attributed either to the cytotoxic effect of fipronil on the intestinal epithelium [55,56] or to its pro-oxidant action [57] that may affect the reproduction cycle of *N. ceranae*, but this assertion should be confirmed by other experiments. In contrast, thiacloprid increased spore production in our study. This result was not consistent with the observations done by Alaux et al. [20] who showed that imidacloprid decreases slightly spore production in honeybees. Thus, in our studies, the synergistic effect of *N. ceranae* infection and exposure to insecticide did not appear to be linked to enhancement of *N. ceranae* virulence by insecticides.

To conclude, our study confirms that interactions between *N. ceranae* and insecticides constitute a significant risk for honeybee health. The increasing prevalence of *N. ceranae* in European apiary combined with the constant toxic pressure undergone by honeybees, appears to contribute to the honeybee colony depopulation. A better understanding of physiological effects induced both by low doses of pesticides and *Nosema* infection seems essential to elucidate the synergistic effects observed on honeybee mortality. The discovery of molecular and cellular mechanisms involved in the adverse effects induced by pathogens and pesticides would confirm the influence of these stressors on honeybee health. In addition, these data provide additional information that will allow a better assessment of risk associated with these stressors and highlight the urgent need of veterinary products for treating nosemosis.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: CV NB HEA LPB FD. Performed the experiments: CV MD JA RF BV J-LB. Analyzed the data: CV DGB CT LPB FD. Contributed reagents/materials/analysis tools: MD JA RF BV DGB. Wrote the paper: CV DGB LPB FD.

References

- Gallai N, Salles J-M, Settele J, Vaissière BE (2009) Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecological Economics* 68: 810–821.
- Ratnieks FL, Carreck NL (2010) Ecology. Clarity on honey bee collapse? *Science* 327: 152–153.
- Mullin CA, Frazier M, Frazier JL, Ashcraft S, Simonds R, et al. (2010) High levels of miticides and agrochemicals in North American apiaries: implications for honey bee health. *PLoS One* 5: e9754.
- Maxim L, van der Sluijs JP (2007) Uncertainty: Cause or effect of stakeholders' debates?: Analysis of a case study: The risk for honeybees of the insecticide Gaucho®. *Science of The Total Environment* 376: 1–17.
- OEPP/Eppo (2003) Environmental risk assessment scheme for plant protection products. *Bull OEPP/Eppo* 33: 141–145.
- Halm MP, Rortais A, Arnold G, Tasci JN, Rault S (2006) New risk assessment approach for systemic insecticides: the case of honey bees and imidacloprid (Gaucho). *Environ Sci Technol* 40: 2448–2454.
- Rortais A, Arnold G, Halm M-P, Touffet-Briens F (2005) Modes of honeybees exposure to systemic insecticides: estimated amounts of contaminated pollen and nectar consumed by different categories of bees. *Apidologie* 36: 71–83.
- Suchail S, Guez D, Belzunces LP (2001) Discrepancy between acute and chronic toxicity induced by imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera*. *Environ Toxicol Chem* 20: 2482–2486.
- Desneux N, Decourtye A, Delpuech JM (2007) The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annu Rev Entomol* 52: 81–106.
- Claudianos C, Ranson H, Johnson RM, Biswas S, Schuler MA, et al. (2006) A deficit of detoxification enzymes: pesticide sensitivity and environmental response in the honeybee. *Insect Mol Biol* 15: 615–636.
- Hardstone MC, Scott JG (2010) Is *Apis mellifera* more sensitive to insecticides than other insects? *Pest Manag Sci* 66: 1171–1180.
- Yu SJ, Robinson FA, Nation JL (1984) Detoxication capacity in the honey bee, *Apis mellifera* L. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 22: 360–368.
- Terriere LC (1984) Induction of Detoxication Enzymes in Insects. *Annual Review of Entomology* 29: 71–88.
- Johnson RM, Wen Z, Schuler MA, Berenbaum MR (2006) Mediation of pyrethroid insecticide toxicity to honey bees (Hymenoptera: Apidae) by cytochrome P450 monooxygenases. *J Econ Entomol* 99: 1046–1050.
- Holmstrup M, Bindsbol AM, Oostingh GJ, Duschl A, Scheil V, et al. (2010) Interactions between effects of environmental chemicals and natural stressors: a review. *Sci Total Environ* 408: 3746–3762.
- Cameron PJ, Walker GP, Hodson AJ, Kale AJ, Herman TJB (2009) Trends in IPM and insecticide use in processing tomatoes in New Zealand. *Crop Protection* 28: 421–427.
- Ericsson JD, Kabaluk JT, Goettel MS, Myers JH (2007) Spinosad interacts synergistically with the insect pathogen *Metarhizium anisopliae* against the exotic wireworms *Agriotes lineatus* and *Agriotes obscurus* (Coleoptera: Elateridae). *J Econ Entomol* 100: 31–38.
- Mohamed AK, Pratt JP, Nelson FR (1987) Compatibility of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* with chemical pesticides. *Mycopathologia* 99: 99–105.
- Ladas A (1972) Der einfluss verschiedener konstitutions- und umweltafaktoren auf die anfaelligkeit der honigbiene (*Apis mellifica* L.) gegenueber zwei insektiziden pflanzenschutzmitteln. *Apidologie* 3: 55–78.
- Alaux C, Brunet JL, Dussauba C, Mondet F, Tchamitchan S, et al. (2009) Interactions between *Nosema* microspores and a neonicotinoid weaken honeybees (*Apis mellifera*). *Environ Microbiol* 12: 774–782.
- Higes M, Martin-Hernandez R, Meana A (2010) *Nosema ceranae* in Europe: an emergent type C nosemosis*. *Apidologie* 41: 375–392.
- Mayack C, Naug D (2009) Energetic stress in the honeybee *Apis mellifera* from *Nosema ceranae* infection. *J Invertebr Pathol* 100: 185–188.
- Mayack C, Naug D (2010) Parasitic infection leads to decline in hemolymph sugar levels in honeybee foragers. *J Insect Physiol* 56: 1572–1575.
- Antunez K, Martin-Hernandez R, Prieto L, Meana A, Zunino P, et al. (2009) Immune suppression in the honey bee (*Apis mellifera*) following infection by *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Environ Microbiol* 11: 2284–2290.
- Dussauba C, Maisonnasse A, Alaux C, Tchamitchan S, Brunet JL, et al. (2010) *Nosema* spp. infection alters pheromone production in honey bees (*Apis mellifera*). *J Chem Ecol* 36: 522–525.
- Higes M, Martin R, Meana A (2006) *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe. *J Invertebr Pathol* 92: 93–95.
- Kievits JB, E (2009) Neurotoxiques systémiques, un risque pour les abeilles? *Pesticides news*. 76 p.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265–275.

29. de Sousa G, Cuany A, Brun A, Amichot M, Rahmani R, et al. (1995) A microfluorometric method for measuring ethoxycoumarin-O-deethylase activity on individual *Drosophila melanogaster* abdomens: interest for screening resistance in insect populations. *Anal Biochem* 229: 86–91.
30. Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB (1974) Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 249: 7130–7139.
31. Paxton RJ, Klee J, Korpela S, Fries I (2007) *Nosema ceranae* has infected *Apis mellifera* in Europe since at least 1998 and may be more virulent than *Nosema apis*. *Apidologie* 38: 558–565.
32. Higes M, Martin-Hernandez R, Botias C, Bailon EG, Gonzalez-Porto AV, et al. (2008) How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Environ Microbiol* 10: 2659–2669.
33. Bride JM, Cuany A, Amichot M, Brun A, Babault M, et al. (1997) Cytochrome P-450 field insecticide tolerance and development of laboratory resistance in grape vine populations of *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae). *J Econ Entomol* 90: 1514–1520.
34. Enayati AA, Ranson H, Hemingway J (2005) Insect glutathione transferases and insecticide resistance. *Insect Mol Biol* 14: 3–8.
35. Aliouane Y, El Hassani AK, Gary V, Armengaud C, Lambin M, et al. (2009) Subchronic exposure of honeybees to sublethal doses of pesticides: effects on behavior. *Environ Toxicol Chem* 28: 113–122.
36. Fahrenhorst M, Mouatcho JC, Kikankie CK, Brooke BD, Hunt RH, et al. (2009) Fungal infection counters insecticide resistance in African malaria mosquitoes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 17443–17447.
37. Mariyono J (2008) Direct and indirect impacts of integrated pest management on pesticide use: a case of rice agriculture in Java, Indonesia. *Pest Manag Sci* 64: 1069–1073.
38. Weddle PW, Welter SC, Thomson D (2009) History of IPM in California pears—50 years of pesticide use and the transition to biologically intensive IPM. *Pest Manag Sci* 65: 1287–1292.
39. Purwar JP, Sachan GC (2006) Synergistic effect of entomogenous fungi on some insecticides against Bihar hairy caterpillar *Spilarctia obliqua* (Lepidoptera: Arctiidae). *Microbiol Res* 161: 38–42.
40. Pachamuthu P, Kamble ST (2000) In vivo study on combined toxicity of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) strain ESC-1 with sublethal doses of chlorpyrifos, propetamphos, and cyfluthrin against German cockroach (Diptera: Blattellidae). *J Econ Entomol* 93: 60–70.
41. Cox-Foster DL, Conlan S, Holmes EC, Palacios G, Evans JD, et al. (2007) A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science* 318: 283–287.
42. Al Mazraawi MS (2007) Interaction effects between *Beauveria bassiana* and imidacloprid against *Thrips tabaci* (Thysanoptera: Thripidae). *Commun Agric Appl Biol Sci* 72: 549–555.
43. Fahrenhorst M, Knols BG, Thomas MB, Howard AF, Takken W, et al. (2010) Synergy in efficacy of fungal entomopathogens and permethrin against West African insecticide-resistant *Anopheles gambiae* mosquitoes. *PLoS One* 5: e12081.
44. Furlong MJ, Groden E (2001) Evaluation of synergistic interactions between the Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) pathogen *Beauveria bassiana* and the insecticides, imidacloprid, and cyromazine. *J Econ Entomol* 94: 344–356.
45. Serebrov VV, Gerber ON, Maliarchuk AA, Martem'ianov VV, Alekseev AA, et al. (2006) [The effect of entomopathogenic fungi on the activity of detoxicating enzymes of larvae of bee pyralid *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera, Pyralidae) and the role of detoxicating enzymes in the formation of the insect' resistance to entomopathogenic fungi]. *Izv Akad Nauk Ser Biol*. pp 712–718.
46. Felix RC, Muller P, Ribeiro V, Ranson H, Silveira H (2010) *Plasmodium* infection alters *Anopheles gambiae* detoxification gene expression. *BMC Genomics* 11: 312.
47. Gui Z, Hou C, Liu T, Qin G, Li M, et al. (2009) Effects of insect viruses and pesticides on glutathione S-transferase activity and gene expression in *Bombyx mori*. *J Econ Entomol* 102: 1591–1598.
48. Shiotsuki T, Kato Y (1999) Induction of carboxylesterase isozymes in *Bombyx mori* by *E. coli* infection. *Insect Biochem Mol Biol* 29: 731–736.
49. Tchankouo-Nguetcheu S, Khun H, Pincet L, Roux P, Bahut M, et al. (2010) Differential protein modulation in midguts of *Aedes aegypti* infected with chikungunya and dengue 2 viruses. *PLoS One* 5.
50. Zibae A, Bandani AR, Tork M (2009) Effect of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*, and its secondary metabolite on detoxifying enzyme activities and acetylcholinesterase (AChE) of the Sunn pest, *Eurygaster integriceps* (Heteroptera: Scutellaridae). *Biocontrol Science and Technology* 19: 485–498.
51. Alaux C, Folschweiller M, McDonnell C, Beslay D, Cousin M, et al. (2011) Pathological effects of the microsporidium *Nosema ceranae* on honey bee queen physiology (*Apis mellifera*). *Journal of Invertebrate Pathology* 106: 380–385.
52. Le Goff G, Hilliou F, Siegfried BD, Boundy S, Wajnberg E, et al. (2006) Xenobiotic response in *Drosophila melanogaster*: sex dependence of P450 and GST gene induction. *Insect Biochem Mol Biol* 36: 674–682.
53. Alizadeh A, Samih MA, Izadi H (2007) Compatibility of *Verticillium lecani* (Zimm.) with several pesticides. *Commun Agric Appl Biol Sci* 72: 1011–1015.
54. Li DP, Holdom DG (1994) Effects of Pesticides on Growth and Sporulation of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes). *Journal of Invertebrate Pathology* 63: 209–211.
55. da Silva Cruz A, da Silva-Zacarin EC, Bueno OC, Malaspina O (2010) Morphological alterations induced by boric acid and fipronil in the midgut of worker honeybee (*Apis mellifera* L.) larvae: Morphological alterations in the midgut of *A. mellifera*. *Cell Biol Toxicol* 26: 165–176.
56. Vidau C, Brunet JL, Badiou A, Belzunces LP (2009) Phenylpyrazole insecticides induce cytotoxicity by altering mechanisms involved in cellular energy supply in the human epithelial cell model Caco-2. *Toxicol In Vitro* 23: 589–597.
57. Lassiter TL, MacKillop EA, Ryde IT, Seidler FJ, Slotkin TA (2009) Is fipronil safer than chlorpyrifos? Comparative developmental neurotoxicity modeled in PC12 cells. *Brain Res Bull* 78: 313–322.



OPEN

Parasite-insecticide interactions: a case study of *Nosema ceranae* and fipronil synergy on honeybee

SUBJECT AREAS:

PARASITOLOGY

ENVIRONMENTAL
MICROBIOLOGY

PATHOGENS

ECOLOGY

Julie Aufauvre^{1,2}, David G. Biron^{1,2}, Cyril Vidau^{1,2}, Régis Fontbonne^{1,2}, Mathieu Roudel^{1,2}, Marie Diogon^{1,2}, Bernard Viguès^{1,2}, Luc P. Belzunces³, Frédéric Delbac^{1,2} & Nicolas Blot^{1,2}

¹Clermont Université, Université Blaise Pascal, Laboratoire "Microorganismes : Génome et Environnement", BP 10448, 63000 Clermont-Ferrand, France, ²CNRS, UMR 6023, LMGE, 63177 Aubière, France, ³INRA, UMR 406 Abeilles & Environnement, Laboratoire de Toxicologie Environnementale, Site Agroparc, 84914 Avignon, France.

Received
15 December 2011

Accepted
23 February 2012

Published
22 March 2012

Correspondence and
requests for materials
should be addressed to
N.B. (nicolas.blot@
univ-bpclermont.fr)

In ecosystems, a variety of biological, chemical and physical stressors may act in combination to induce illness in populations of living organisms. While recent surveys reported that parasite-insecticide interactions can synergistically and negatively affect honeybee survival, the importance of sequence in exposure to stressors has hardly received any attention. In this work, Western honeybees (*Apis mellifera*) were sequentially or simultaneously infected by the microsporidian parasite *Nosema ceranae* and chronically exposed to a sublethal dose of the insecticide fipronil, respectively chosen as biological and chemical stressors. Interestingly, every combination tested led to a synergistic effect on honeybee survival, with the most significant impacts when stressors were applied at the emergence of honeybees. Our study presents significant outcomes on beekeeping management but also points out the potential risks incurred by any living organism frequently exposed to both pathogens and insecticides in their habitat.

In the environment, living organisms are exposed to a variety of biotic and abiotic stressors that may drastically reduce their longevity and fitness^{1,2}. These stressors may be anthropogenic (e.g. pollutants) as well as natural (e.g. pathogens). Recently, multiple stressors approaches have received an increasing interest in ecotoxicology, the interaction between those agents being potentially synergistic. Synergistic interaction is defined as a combination of stressors that results in a greater effect than expected from cumulative independent exposures³. Synergistic interactions of some chemicals combined to natural stressors have been studied on aquatic organisms like daphnia^{4–8} and used to control pest in various ecosystems^{9–15}.

Insecticides are designed to induce high mortality in populations of target organisms (i.e. pests) and may be combined to biological control agents for a better effectiveness. For instance, synergistic interactions between the insecticide imidacloprid and two entomopathogenic nematodes (*Steinernema glaseri* or *Heterorhabditis bacteriophora*) have been observed against white grubs (*Cyclocephala hirta*, *Cyclocephala borealis* and *Popillia japonica*)¹⁶. However, insecticides can have collateral effects on non-target species by disturbing their physiology and exacerbating the negative effects of pathogens³. For instance, the foraging activity of wild and domesticated bees, key species for pollination in ecosystems, may expose them simultaneously to both parasites and insecticides, resulting in harmful effects on their health and lifespan^{17–21}.

As a major pollinator, the Western honeybee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) has a substantial economical and ecological value²². Therefore, colony losses recorded for the last decade represent a concerning issue for both crop and apiary fields. The origin of this phenomenon is likely to be multicausal, with a strong emphasis on parasites and insecticides^{23–26}. The microsporidian parasite, *Nosema ceranae* (Dissociodihaplophasida: Nosematidae), is a unicellular eukaryote and invasive intracellular parasite infecting *A. mellifera* midgut, inducing a disease named nosemosis²⁷. It is a worldwide emerging parasite that presents a high prevalence in honeybee colonies^{28,29}. The insecticide fipronil (5-amino-1-(2,6-dichloro- α,α,α -trifluoro-p-tolyl)-4-trifluoromethylsulfonylpyrazole-3-carbonitrile) is a chemical stressor of *A. mellifera*¹⁹ which is extensively used against arthropod pests on crops worldwide, and especially in USA³⁰. This is a neurotoxic compound of the phenylpyrazoles family whose action on neuronal signaling can potentially results in mortality³¹. In this work, *N. ceranae* and a sublethal dose of the insecticide fipronil were chosen as natural and chemical stressors respectively to assess synergistic interactions that can occur in honeybees.



While recent surveys reported that parasite-insecticide interactions can negatively affect honeybee survival^{32,33}, the importance of sequence in exposure to stressors has hardly received any attention. Yet, in their natural habitat, organisms may be exposed to a chemical first and then to a natural stressor, or the opposite, or to different stressors simultaneously, and those various scenarios may differently affect the organism. A recent survey demonstrated that sublethal doses of fipronil, but also of another insecticide, thiacloprid, highly increase the mortality of honeybees previously infected by *N. ceranae*, suggesting that *N. ceranae* infection may render honeybees more susceptible to insecticides³³. Contrariwise, the reported opportunism of microsporidian parasites^{34–36} suggests that honeybee could become less resistant to parasite infection following sublethal exposure to insecticides. Moreover, as honeybees can easily be simultaneously exposed to fipronil and *N. ceranae* inside the hive, one could wonder about the consequences of such combined effect on honeybee survival. In the present work, different *N. ceranae*-fipronil combinations were compared in order to analyze the impact of exposure sequence on laboratory-reared honeybee survival. Honeybees were thus submitted to all combinations of parasite exposure (presence or absence) and sublethal insecticide chronic exposure (presence or absence). Interestingly, all combinations led to a synergistic effect on honeybee mortality.

Results

In order to detect potential synergistic effects between a pathogen and an environmental chemical stressor on honeybee mortality, we analyzed four different *N. ceranae*-fipronil combinations: (i) honeybees infected by *N. ceranae* (125,000 spores/bee) then chronically exposed to fipronil for 7 days; (ii) honeybees previously intoxicated then infected; (iii) honeybees simultaneously infected and intoxicated at their emergence from nymphal cell or (iv) simultaneously infected and intoxicated at the age of 7 days. Honeybee chronic exposure to fipronil was done at a concentration (1 µg/L of sucrose syrup) that can be potentially encountered inside the hive^{19,20}.

Survival analysis indicated that each *N. ceranae*-fipronil combination led to a significant decrease ($p \leq 0.05$) in honeybee survival compared to control or single treatments (Figure 1, see Supplementary Table S1 online). As expected, control honeybees presented the lowest mortality rate (24%) at the end of the experiment, 22 days after emergence. Moreover, while mortalities of honeybees exposed to *N. ceranae* or fipronil alone reached a maximum of 39 and 31% respectively, the one of honeybees co-exposed to both factors reached a maximum of 84%. In each case, the *N. ceranae*-fipronil combination induced a synergistic effect compared to the sum of the effects observed in honeybees exposed to each stressor alone (Table 1).

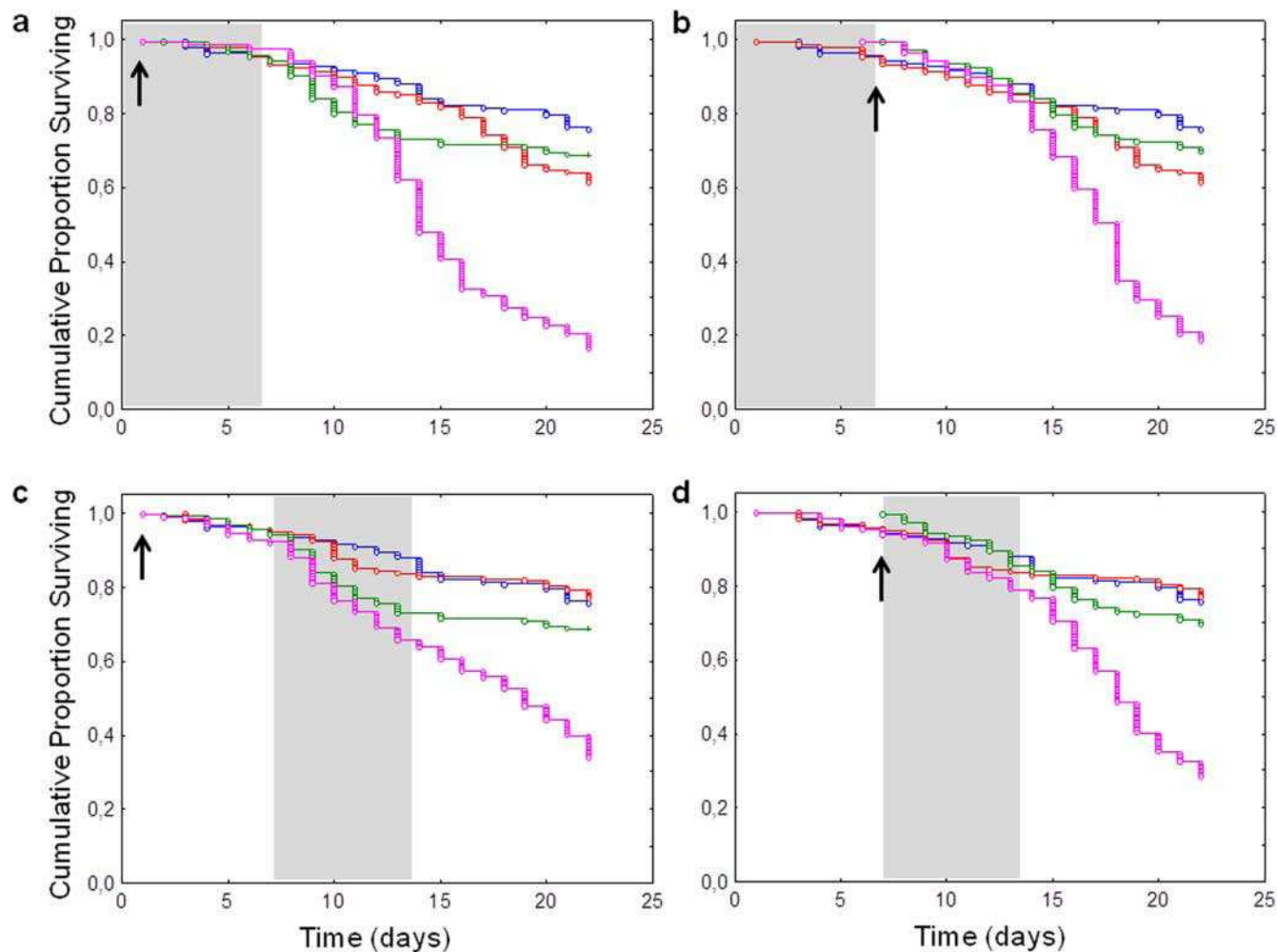


Figure 1 | Effect of *N. ceranae*-fipronil combinations on honeybee survival. Data give the cumulative proportion of surviving honeybees exposed to no treatment (—), to *N. ceranae* (—) or fipronil (—) alone, or to a *N. ceranae*-fipronil combination (—). Different sequential combinations of *N. ceranae* infection (arrows) and 7-day-long chronic exposure to fipronil (grey boxes) were performed: (a) both treatments were applied on emerging honeybees, (b) bees were chronically exposed to fipronil on week 1 then infected by *N. ceranae*, (c) bees were infected at their emergence then chronically exposed to fipronil on week 2, (d) both treatments were applied on 7-day-old bees. Data from three replicates of 50 honeybees were analyzed with the Kaplan-Meier method.


Table 1 | Synergistic interactions between *N. ceranae* (Nc) and fipronil (F)

Exposure		Mortality (%)			Effect
day 0	day 7	Observed	Expected*	χ^2 **	
Nc + F	-	83.7	57.7	11.7	Synergistic
Nc	F	81.4	57.2	10.2	Synergistic
F	Nc	66.5	47.3	7.8	Synergistic
-	Nc + F	71.9	46.8	13.5	Synergistic

*Expected mortality (M_E) on day 22 has been calculated as $M_{Nc} + M_F(1 - M_{Nc}/100)$, with M_{Nc} and M_F being the observed percent mortalities caused by *N. ceranae* and fipronil alone respectively.
 **The calculated χ^2 is much higher than the theoretical χ^2 (i.e. $\chi^2=6.635$, $df=1$, $p=0.01$).

Using the proportional hazard model (Cox regression), we determined whether the different treatments or the combination sequence had a significant impact on honeybees survival probability during the entire experiment (Table 2). Statistical analysis indicated that *N. ceranae* factor had a highly significant impact on honeybees survival, but only when applied at the emergence (Wald's statistics (W_s) = 42.1, degree of freedom (df) = 5, $p=0.000$). Fipronil factor also had a highly significant impact on honeybees survival probability when applied at their emergence ($W_s=24.1$, $df=5$, $p=0.000$) and a less significant impact when applied on 7-day-old bees ($W_s=4.5$, $df=5$, $p=0.034$). Moreover, the factor corresponding to the sequence of treatments also had a highly significant impact on survival ($W_s=11.4$, $df=5$, $p=0.001$). The cumulated mortalities recorded at the end of the experiment (22 days after emergence) were also compared between groups exposed to different *N. ceranae*-fipronil combinations (Table 3). Compared to honeybees infected 7 days after their emergence, statistical analysis showed that honeybees infected at the emergence exhibited a significantly higher mortality rate, whenever the fipronil was applied simultaneously or 7 days later.

Fipronil daily consumptions have been monitored during both intoxication periods (week 1 or week 2 corresponding to days 0 to 7 or days 7 to 14 respectively). Honeybees absorbed a daily mean quantity of fipronil of $1/254^{\text{th}}$ of the LD50 (16.4 ± 1.6 pg/day/bee) in the first case and of $1/179^{\text{th}}$ of the LD50 (23.3 ± 2.5 pg/day/bee) in the second one (LD50 fipronil: 4.17 ng/bee³⁷). As expected because of the low fipronil concentration administered (1 $\mu\text{g/L}$ of sucrose syrup), statistical analysis indicated that mortality rates are not significantly different between fipronil-intoxicated and control honeybees ($p=0.092$ and $p=0.334$ for week 1 and week 2 respectively), confirming that honeybees received sublethal doses of insecticide. Moreover, for each intoxication period, infected honeybees did not significantly consume different cumulated quantities of fipronil (15.1 ± 4.3 and 24.0 ± 4.2 pg/day/bee for week 1 and week 2 respectively) compared to uninfected honeybees (17.1 ± 4.3 and 22.0 ± 5.0 pg/day/bee for the same periods) (Figure 2).

N. ceranae development success was monitored as the number of spores present in the abdomen of surviving honeybees at the end

Table 2 | Treatments involvement in honeybee survival probability

Variable	Wald's statistic	p-value
Sequence of treatments	11.4	0.001
<i>N. ceranae</i> infection on day 0	42.1	0.000
<i>N. ceranae</i> infection on day 7	0.2	0.630
Fipronil exposure from day 0 to 7	24.1	0.000
Fipronil exposure from day 7 to 14	4.5	0.034

The given Wald's statistic and p-value are results of the Cox's Proportional Hazard Model ($n=1539$). Significant differences ($p \leq 0.05$) are underlined. The higher the Wald's statistic, the higher the variable participates in affecting the survival.

of experiment (day 22) (Figure 3). A mean of $3.0 \times 10^3 \pm 10.3 \times 10^3$ spores/bee was counted in the controls (i.e. uninfected groups), meaning that some control honeybees were likely slightly infected at the beginning of experiment. However, the level of *N. ceranae* infection was highly significantly different between experimentally and non-experimentally infected honeybees (Figure 3). As suspected, statistical analysis revealed that, at the end of the experiment, the spore content was higher in honeybees infected at the emergence than in honeybees infected on day 7 ($145.2 \times 10^6 \pm 56.7 \times 10^6$ and $93.7 \times 10^6 \pm 38.6 \times 10^6$ spores/bee respectively). One can assume that this difference was only due to the infection duration. To identify a potential impact of the fipronil exposure on spore production, spore counts were compared between honeybees that were infected on a same day. Among groups infected at the emergence, honeybees only infected by *N. ceranae* presented a significantly lower spore count compared to honeybees intoxicated during week 2 ($136.2 \times 10^6 \pm 51.1 \times 10^6$ and $168.5 \times 10^6 \pm 61.9 \times 10^6$ spores/bee respectively). Surprisingly, among groups infected 7 days after emergence, fipronil had a significant antagonistic effect on spore content when applied during the same week compared to honeybees only infected ($86.2 \times 10^6 \pm 38.5 \times 10^6$ and $95.5 \times 10^6 \pm 35.3 \times 10^6$ spores/bee respectively). In each case, fipronil had no significant effect on spore count when applied during week 1.

Discussion

Environmental pollution frequently results in the exposure to chemicals of organisms that can as well be subjected to other stressors such as pathogens. This multiple stressors exposure is likely to be detrimental for organism health and lifespan^{2,3} and makes the assessment of the potential effects associated with such combinations hardly difficult. We chose the Western honeybee, *A. mellifera*, as a model for studying interactions between pollutants and pathogens because it is frequently exposed to both factors inside hives worldwide. The microsporidian parasite *N. ceranae* and the phenylpyrazole insecticide fipronil were applied to honeybees following different sequences. A synergistic interaction between the neonicotinoid imidacloprid and *Nosema* infection has been previously observed when both agents were applied simultaneously to young worker honeybees³². In a more recent study, we have also shown a

Table 3 | Host response to parasite (Nc) – insecticide (F) combinations

Exposure		Cumulative mortality (%)*	Cumulative sucrose consumption (mg/day/bee \pm sd)**	Spore numeration (10^6 spores/bee \pm sd)**
day 0	day 7			
Nc+F	-	83.66 a	665.8 \pm 42.0 a	151.2 \pm 63.6 a
Nc	F	81.41 a	632.3 \pm 60.4 a	168.5 \pm 61.9 a
F	Nc	66.48 b	621.8 \pm 68.5 a	96.4 \pm 44.2 b
-	Nc+F	71.91 b	604.7 \pm 89.9 a	86.2 \pm 38.5 b

*Cumulative mortality rates on day 22 were compared pairwise using a one-tailed χ^2 test.

**Spore numerations and cumulative sucrose consumptions on day 22 were compared pairwise using the Kolmogorov-Smirnov test. Significant differences ($p \leq 0.05$) are indicated by non-corresponding letters.

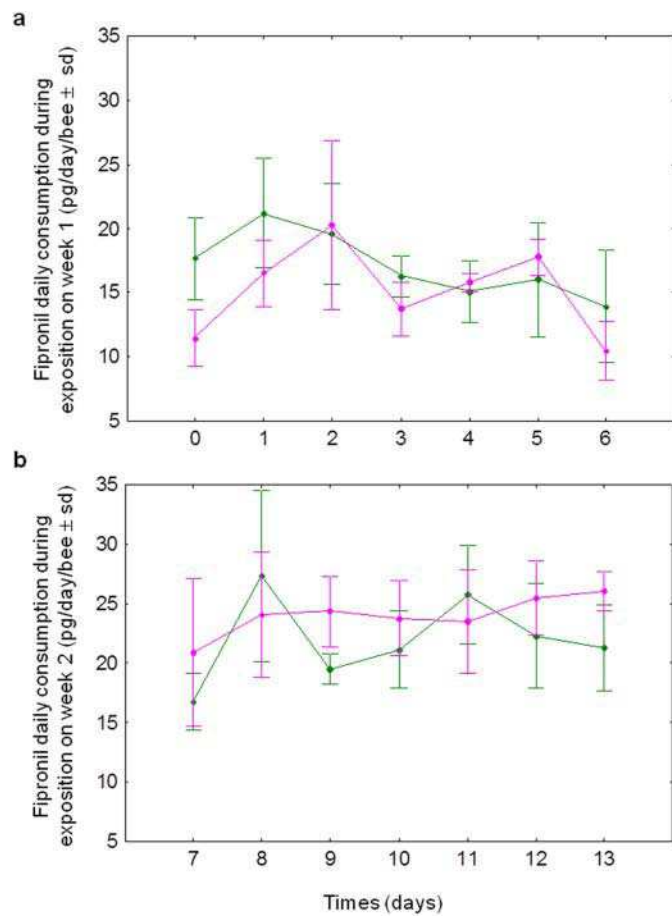


Figure 2 | Effect of *N. ceranae* infection on honeybee fipronil consumption. The mean of fipronil consumption (pg/day/honeybee \pm standard deviation, sd) was monitored daily during weeks 1 (a) and 2 (b) for both infected (—) and uninfected (—) honeybees.

significant increase in mortality when young worker honeybees were firstly infected by *N. ceranae* then chronically exposed to fipronil or thiacloprid (neonicotinoid)³³. To date, no work has been conducted on the impact of *N. ceranae* infection on previously intoxicated honeybees. In this sequence, two scenarios could have been expected. First, a higher mortality of co-exposed honeybees was possible as a sublethal dose of insecticide could render individuals more susceptible to pathogens, especially to opportunistic parasites such as microsporidia. Secondly, sublethal exposure to one stressor might induce subsequent stress resistance. The later would imply that honeybees exposed to a very low dose of fipronil may develop a stress resistance resulting in a lower impact of *N. ceranae* infection on honeybee survival. Surprisingly, our results revealed that, whatever the sequence tested, co-exposure led to a synergistic interaction between *N. ceranae* and fipronil on overall honeybee mortality (Table 1). These synergistic effects resulted in approximately 66 to 84 % mortality after 22 days in co-exposed groups, compared with 23 to 39 % for *N. ceranae* or fipronil alone.

Reviewing interactions occurring between chemical and natural stressors, Holmstrup *et al.* (2010) pointed out the lack of study assessing the importance of sequence in exposure to stressors³. Synergistic interactions between chemicals and pathogens have been relatively well documented in the framework of integrated pest management. In order to improve the malaria vector *Anopheles gambiae* control, mosquito larvae were exposed to different fungus-insecticide combinations: the permethrin, a pyrethroid insecticide, was combined to *Beauveria bassiana* or *Metarhizium anisopliae*¹². This study indicated that all fungus-insecticide combinations led to synergistic

effects on mosquito survival. This systematic synergistic effect between insecticides and pathogens detected in two different insects (*i.e.* honeybees and mosquitoes) is surprising and the mechanisms involved are still unknown. This higher mortality induced by parasite-insecticide interactions can be of great interest in integrated pest management, allowing a reduction of the chemical doses spread in the environment and a more efficient control of insecticide-resistant vectors. Nevertheless, such synergistic interactions can have detrimental side effects on beneficial arthropods such as honeybees and also render more complicated the risk assessment of insecticides introduced in the environment.

Statistical analyses (Cox regression model and pairwise comparisons of mortality rates) indicated that *N. ceranae* infection is the main factor influencing the honeybee mortality, but only when applied at the emergence of worker honeybees (Table 2). This result could be a consequence of the longer infection duration compared to honeybees infected on day 7 (22 vs. 15 days of infection respectively at the end of the experiment). However, we cannot exclude that the physiology of new emerging honeybees also resulted in a more harmful impact of *N. ceranae* infection. For instance, younger honeybees are likely to be less immunocompetent than their older congeners^{38,39}. The fipronil factor had a significant but lower impact on overall honeybee survival compared to *N. ceranae*. This highlights the risk encountered inside hives where honeybees can easily be exposed to similar and even higher concentrations of fipronil or worse^{19,20}, to both agents in a colony.

Several hypotheses could be proposed to explain the systematic occurrence of a synergistic effect between *N. ceranae* and fipronil. First, it has been shown that *N. ceranae* infection induces an energetic stress in honeybees that results in a higher food intake by infected individuals^{40,41}. As proposed by Alaux *et al.*³², such a boost in food intake implies an increase in insecticide oral exposure, potentiating the effect of the later on honeybee mortality. However in this work, *N. ceranae*-infected and uninfected honeybees consumed a similar quantity of sucrose (Fig. 3). This result indicates that the increased food intake is unlikely to occur systematically during a *N. ceranae* infection and should not be considered as a specific symptom of nosemosis. Thereby, the highest mortality observed for honeybees treated with *N. ceranae*-fipronil combinations was not due to an increase in insecticide uptake.

In parasite-insecticide interactions, the parasite development and transmission success can be modified in intoxicated organisms^{42,43}. It is known that insect detoxification system can act on a parasite development, disrupting or enhancing it⁴⁴. On one hand, the deployment of insecticide detoxification may lead to physiological modifications that render the host toxic to parasites. For example, the development of the filaria *Wuchereria bancrofti* larvae is affected in insecticide-resistant *Culex quinquefasciatus* mosquitoes, probably due to an increase in esterase activity resulting in a change in the redox potential of the tissues hosting the parasite⁴⁵. On the other hand, it can be hypothesized that the production of large amounts of detoxifying enzymes could deplete the resource pool through resource-based trade-offs, limiting the host's immune abilities, therefore favouring the parasite development⁴⁴. It has been previously stated that thiacloprid may increase *N. ceranae* spore production, while fipronil and, to a lesser extent, imidacloprid would decrease it^{32,33}. In our experimental conditions, fipronil exposure seemed to have no precise impact on the parasite development. Indeed, fipronil exposure only had a significant but slight impact on *N. ceranae* development success when applied for 7 days starting from the 7th day after emergence (Fig. 3). Interestingly, fipronil slightly increased or decreased spore production depending on the day of infection. However, our results concern a unique time point in the experiment and a specific parasite development stage (mature spores). We cannot exclude a specific impact on the overall spore production kinetics or on earlier development stages since it has been

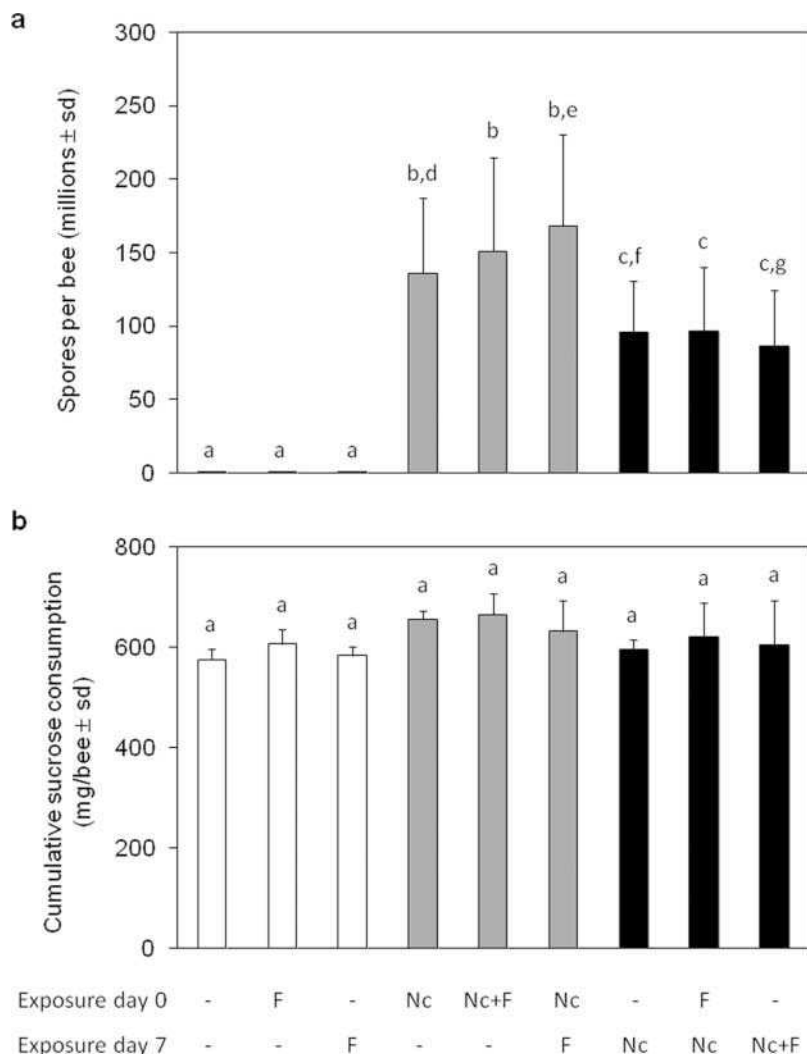


Figure 3 | *N. ceranae* development success and honeybee cumulative sucrose consumption on day 22. Mean number of (a) spores per honeybee abdomen (in millions \pm standard deviation, sd, $n=585$) and (b) total sucrose consumption (mg/bee \pm sd from 3 replicates of 50 initial individuals) in surviving honeybees on day 22, in response to various *N. ceranae* (Nc) and fipronil (F) treatments. White bars represent data of non-experimentally infected honeybees, grey bars that of honeybees infected by *N. ceranae* at the emergence and black bars that of honeybees infected by *N. ceranae* at the age of 7 days. Significant differences ($p \leq 0.05$) using Kolmogorov-Smirnov test between each experimental group are indicated by non-corresponding letters.

suggested that microsporidia are dependent on host-derived ATP^{46–48} and that fipronil may precisely alter the cellular energetic metabolism^{49,50}. Nevertheless, insecticides' impact on *N. ceranae* development success in the honeybee seems more complex than thought before and clearly needs further investigations.

In conclusion, our findings showed that honeybees co-exposed to the natural stressor *N. ceranae* and to an environmental concentration of the insecticide fipronil will undergo a significantly higher mortality compared to the sum of the effects induced by each agent acting alone. Few studies have been done on such interactions in the honeybee and the resulting data illustrate the difficulty to find out the synergy related mechanisms. The economical and ecological value of honeybees renders our results worrying as the scenario of colonies housing both *N. ceranae* spores and insecticide residues is realistic. Those results also point out the potential risks incurred by any living organism frequently exposed to both pesticides and pathogens in their environment, no matter the sequence of exposure to those agents. Such multiple stressors interactions, endangering honeybees and potentially other communities, deserve additional attention. Finally, understanding the complexity of cumulative risks is a prerequisite for the implementation of more efficient guidelines in the frame of future chemicals regulation.

Methods

Honeybee artificial rearing. All experiments were performed on June 2011 with *Apis mellifera* emerging honeybees taken from different colonies of the same apiary at the Laboratoire Microorganismes: Génome et Environnement (UMR 6023, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand, France). Those colonies were found *Nosema*-free by PCR-based detection as previously described by Higes *et al.*⁵¹. Frames of sealed brood were placed in an incubator in the dark at 33°C under humidified atmosphere. Emerging honeybees were collected and distributed in groups of 50 individuals into Pain-type cages⁵². In order to mimic the colony environment, a 5 mm piece of Beeboost® (Pherotech, Delta, BC, Canada) releasing 5 queen's mandibular pheromones was placed in each cage. During all the experiment, honeybees were fed *ad libitum* with 50% (w/v) sugar syrup supplemented with 1% (w/v) Provita'Bee (VETOPHARM PRO). Every day, feeders were replaced, dead bees were counted and removed, and the sucrose consumption was quantified. Nine experimental groups were created as honeybees received no treatment (controls), one treatment (infected with *N. ceranae* or chronically exposed to fipronil) or both treatments in 4 different sequences. Treatments were administrated to emerging or 7-day-old honeybees. All experimental conditions were performed in triplicates ($n=150$ bees per treatment).

***Nosema ceranae* infection.** *N. ceranae* spores were obtained according to Vidau *et al.*³³. The spore concentration was determined by counting using a haemocytometer chamber. *N. ceranae* species was confirmed by PCR³¹. Honeybees were infected the day of their emergence or 7 days later by individual feeding with 125,000 spores of *N. ceranae* in 5 μ L of 50% sucrose solution using a micropipette⁵³.



Seven-day-old honeybees were previously anaesthetized with CO₂ before infection. Control honeybees were treated with a sucrose solution devoid of *N. ceranae* spores.

Exposure to fipronil. Stock solution of fipronil (1 g/L) was prepared in DMSO (v/v). Emerging or 7-day-old honeybees were exposed *ad libitum* to fipronil by adding the insecticide in the feeding syrup to a final concentration of 1 µg/L fipronil, 0.1% DMSO (v/v). The insecticide consumption was quantified by measuring the daily amount of fipronil-containing sugar syrup consumed per cage then reported per living honeybee. Control honeybees were fed *ad libitum* with 0.1% DMSO-containing sugar syrup.

Effects of *N. ceranae*-fipronil combinations on host mortality and sucrose consumption. Survival analysis was performed using the Cox regression (i.e. proportional hazard model)³⁴ by using Statistica 7.0 (StatSoft inc., Tulsa, USA). This model analyzes the event times at the day of death, censors times at the termination of the study on day 22. Cox regression also assesses the standing of the variables through a covariance matrix. In this work, a model was elaborated to determine the respective weight of five variables: nature of the treatment (infection or intoxication), its respective time application (day 0 or 7), and the treatments sequence.

Synergistic interactions between treatments on honeybee mortality at the end of experiment (i.e. on day 22) were determined using a χ^2 test³⁵. The expected interaction mortality value, M_E , for combined agents was calculated using the formula $M_E = M_{Nc} + M_F(1 - M_{Nc}/100)$, where M_{Nc} and M_F are the observed percent mortalities caused by *N. ceranae* and fipronil alone, respectively. Results from the χ^2 test were compared to the χ^2 table value with 1 df, using the formula $\chi^2 = (M_O - M_E)^2/M_E$, where M_O is the observed mortality for the *N. ceranae*-fipronil combinations. A non-additive effect between the two agents was suspected when the χ^2 value exceeded the table value and if the difference $M_O - M_E$ had a positive value, a significant interaction was then considered synergistic. Finally, for each treatment, daily sucrose consumptions were compared by using the nonparametric Kolmogorov-Smirnov test, which is an alternative to the t-test for independent samples.

Development success of *N. ceranae*. To determine the development success of *N. ceranae*, a spore numeration was performed on living honeybees at the end of the experiment (i.e. on day 22). Briefly, every abdomen was collected and homogenized in PBS (250 µL). After thorough grinding, samples were washed twice by centrifugation at 8000 x g for 5 min and resuspended in PBS (500 µL). The average number of spores of each honeybee was estimated using a haemocytometer chamber. *N. ceranae* development success (i.e. number of spores produced) was analyzed for each treatment by using a Kolmogorov-Smirnov test.

- Loos, M., Ragas, A. M. J., Plasmeijer, R., Schipper, A. M. & Hendriks, A. J. Eco-SpaCE: an object-oriented, spatially explicit model to assess the risk of multiple environmental stressors on terrestrial vertebrate populations. *Sci. Total Environ.* **408**, 3908–3917 (2010).
- Jansen, M., Stoks, R., Coors, A., van Doorslaer, W. & de Meester, L. Collateral damage: rapid exposure-induced evolution of pesticide resistance leads to increased susceptibility to parasites. *Evolution* **65**, 2681–2691 (2011).
- Holmstrup, M. *et al.* Interactions between effects of environmental chemicals and natural stressors: a review. *Sci. Total Environ.* **408**, 3746–3762 (2010).
- Coors, A., Decaestecker, E., Jansen, M. & De Meester, L. Pesticide exposure strongly enhances parasite virulence in an invertebrate host model. *Oikos* **117**, 1840–1846 (2008).
- Gérard, C., Carpentier, A. & Paillisson, J. M. Long-term dynamics and community structure of freshwater gastropods exposed to parasitism and other environmental stressors. *Freshw. Biol.* **53**, 470–484 (2008).
- Gismondi, E., Rigaud, T., Beisel, J. N. & Cossu-Leguille, C. Microsporidia parasites disrupt the responses to cadmium exposure in a gammarid. *Environ. Pollut.* **160**, 17–23 (2012).
- Relyea, R. & Hoverman, J. Assessing the ecology in ecotoxicology: a review and synthesis in freshwater systems. *Ecol. Lett.* **9**, 1157–1171 (2006).
- Sures, B. Environmental parasitology. Interactions between parasites and pollutants in the aquatic environment. *Parasite* **15**, 434–438 (2008).
- Agnew, P., Berticat, C., Bedhomme, S., Sidobre, C. & Michalakakis, Y. Parasitism increases and decreases the costs of insecticide resistance in mosquitoes. *Evolution* **58**, 579–586 (2004).
- Alizadeh, A., Samih, M. A., Khezri, M. & Riseh, R. S. Compatibility of Beauveria bassiana (Bals.) Vuill. with several pesticides. *Int. J. Agric. Biol.* **9**, 31–34 (2007).
- Blanford, S. *et al.* Lethal and pre-lethal effects of a fungal biopesticide contribute to substantial and rapid control of malaria vectors. *PLoS ONE* **6**, e23591 (2011).
- Farenhorst, M. *et al.* Synergy in efficacy of fungal entomopathogens and permethrin against West African insecticide-resistant *Anopheles gambiae* mosquitoes. *PLoS ONE* **5**, e12081 (2010).
- Farenhorst, M. *et al.* Fungal infection counters insecticide resistance in African malaria mosquitoes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 17443–17447 (2009).
- Koppenhöfer, A. M., Cowles, R. S., Cowles, E. A., Fuzy, E. M. & Baumgartner, L. Comparison of neonicotinoid insecticides as synergists for entomopathogenic nematodes. *Biological Control* **24**, 90–97 (2002).
- Morales-Rodríguez, A. & Peck, D. C. Synergies between biological and neonicotinoid insecticides for the curative control of the white grubs *Amphimallon majale* and *Popillia japonica*. *Biological Control* **51**, 169–180 (2009).
- Koppenhöfer, A. M., Wilson, M., Brown, I., Kaya, H. K. & Gaugler, R. Biological control agents for white grubs (Coleoptera: Scarabaeidae) in anticipation of the establishment of the Japanese beetle in California. *J. Econ. Entomol.* **93**, 71–80 (2000).
- Cox-Foster, D. L. *et al.* A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science* **318**, 283–287 (2007).
- Martel, A. C. *et al.* Acaricide residues in honey and wax after treatment of honey bee colonies with Apivar or Asuntol50. *Apidologie* **38**, 534–544 (2007).
- Mullin, C. A. *et al.* High levels of miticides and agrochemicals in North American apiaries: implications for honey bee health. *PLoS ONE* **5**, e9754 (2010).
- Pareja, L. *et al.* Detection of Pesticides in Active and Depopulated Beehives in Uruguay. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **8**, 3844–3858 (2011).
- Smodis Skerl, M. I., Kmecl, V. & Gregorc, A. Exposure to pesticides at sublethal level and their distribution within a honey bee (*Apis mellifera*) colony. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **85**, 125–128 (2010).
- Gallai, N., Salles, J., Settele, J. & Vaissiere, B. Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecological Economics* **68**, 810–821 (2009).
- Oldroyd, B. P. What's killing American honey bees? *PLoS Biol.* **5**, e168 (2007).
- Potts, S. G. *et al.* Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends Ecol. Evol.* **25**, 345–353 (2010).
- vanEngelsdorp, D. & Meixner, M. D. A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. *J. Invertebr. Pathol.* **103 Suppl 1**, S80–95 (2010).
- vanEngelsdorp, D. *et al.* Weighing risk factors associated with bee colony collapse disorder by classification and regression tree analysis. *J. Econ. Entomol.* **103**, 1517–1523 (2010).
- Higes, M., Martín-Hernández, R. & Meana, A. Nosema ceranae in Europe: an emergent type C nosemosis. *Apidologie* **41**, 375–392 (2010).
- Hedtko, K., Jensen, P. M., Jensen, A. B. & Genersch, E. Evidence for emerging parasites and pathogens influencing outbreaks of stress-related diseases like chalkbrood. *J. Invertebr. Pathol.* **108**, 167–173 (2011).
- Klee, J. *et al.* Widespread dispersal of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of the western honey bee, *Apis mellifera*. *J. Invertebr. Pathol.* **96**, 1–10 (2007).
- Johnson, R. M., Ellis, M. D., Mullin, C. A. & Frazier, M. Pesticides and honey bee toxicity – USA. *Apidologie* **41**, 312–331 (2010).
- Cole, L. M., Nicholson, R. A. & Casida, J. E. Action of phenylpyrazole insecticides at the GABA-gated chloride channel. *Pestic. Biochem. Physiol.* **46**, 47–54 (1993).
- Alaux, C. *et al.* Interactions between *Nosema* microspores and a neonicotinoid weaken honeybees (*Apis mellifera*). *Environ. Microbiol.* **12**, 774–782 (2010).
- Vidau, C. *et al.* Exposure to sublethal doses of fipronil and thiacloprid highly increases mortality of honeybees previously infected by *Nosema ceranae*. *PLoS ONE* **6**, e21550 (2011).
- Didier, E. S. Microsporidiosis: an emerging and opportunistic infection in humans and animals. *Acta Trop.* **94**, 61–76 (2005).
- Didier, E. S. & Weiss, L. M. Microsporidiosis: not just in AIDS patients. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **24**, 490–495 (2011).
- Franzen, C. & Müller, A. Microsporidiosis: human diseases and diagnosis. *Microbes Infect.* **3**, 389–400 (2001).
- Kievičs, J. & Bruneau, E. Neurotoxiques systémiques, un risque pour les abeilles? *Abeilles & Cie* **118**, 12–17 (2007).
- Loughton, A. M., Boots, M. & Siva-Jothy, M. T. The ontogeny of immunity in the honey bee, *Apis mellifera* L. following an immune challenge. *J. Insect Physiol.* **57**, 1023–1032 (2011).
- Wilson-Rich, N., Dres, S. T. & Starks, P. T. The ontogeny of immunity: development of innate immune strength in the honey bee (*Apis mellifera*). *J. Insect Physiol.* **54**, 1392–1399 (2008).
- Mayack, C. & Naug, D. Parasitic infection leads to decline in hemolymph sugar levels in honeybee foragers. *J. Insect Physiol.* **56**, 1572–1575 (2010).
- Mayack, C. & Naug, D. Energetic stress in the honeybee *Apis mellifera* from *Nosema ceranae* infection. *J. Invertebr. Pathol.* **100**, 185–188 (2009).
- Loge, F. J., Arkoosh, M. R., Ginn, T. R., Johnson, L. L. & Collier, T. K. Impact of environmental stressors on the dynamics of disease transmission. *Environ. Sci. Technol.* **39**, 7329–7336 (2005).
- Morley, N. J. Interactive effects of infectious diseases and pollution in aquatic molluscs. *Aquat. Toxicol.* **96**, 27–36 (2010).
- Rivero, A., Vézilier, J., Weill, M., Read, A. F. & Gandon, S. Insecticide control of vector-borne diseases: when is insecticide resistance a problem? *PLoS Pathogens* **6**, e1001000 (2010).
- McCarroll, L. *et al.* Insecticides and mosquito-borne disease. *Nature* **407**, 961–962 (2000).
- Keeling, P. J. & Corradi, N. Shrink it or lose it: balancing loss of function with shrinking genomes in the microsporidia. *Virulence* **2**, 67–70 (2011).
- Vivareš, C. P., Gouy, M., Thomarat, F. & Méténier, G. Functional and evolutionary analysis of a eukaryotic parasitic genome. *Curr. Opin. Microbiol.* **5**, 499–505 (2002).
- Peyretailade, E. *et al.* Extreme reduction and compaction of microsporidian genomes. *Res. Microbiol.* **162**, 598–606 (2011).
- Vidau, C., Brunet, J.-L., Badiou, A. & Belzunces, L. P. Phenylpyrazole insecticides induce cytotoxicity by altering mechanisms involved in cellular energy supply in the human epithelial cell model Caco-2. *Toxicol. In Vitro* **23**, 589–597 (2009).



50. Vidau, C. *et al.* Fipronil is a powerful uncoupler of oxidative phosphorylation that triggers apoptosis in human neuronal cell line SHSY5Y. *Neurotoxicology* **32**, 935–943 (2011).
51. Higes, M., Martín-Hernández, R. & Meana, A. Nosema ceranae, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe. *J. Invertebr. Pathol.* **92**, 93–95 (2006).
52. Pain, J. Nouveau modèle de cagettes expérimentales pour le maintien d'abeilles en captivité. *Ann. Abeille* **9**, 71–76 (1966).
53. Malone, L. A. & Stefanovic, D. Comparison of the responses of two races of honeybees to infection with Nosema apis Zander. *Apidologie* **30**, 375–382 (1999).
54. Kalbfleisch, J. D. & Prentice, R. L. *The Statistical Analysis Of Failure Time Data*. (J. Wiley: 2002).

Acknowledgements

This work was funded by a grant from the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS, MIE: Maladies Infectieuses et Environnement). JA and RF were supported by grants from the Ministère de l'Éducation Nationale de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, MR from Région Auvergne, CV from the CNRS.

Author contributions

JA, CV, FD and NB conceived the experiments and designed the study. JA, DGB and NB analyzed the data, and wrote the main manuscript. JA performed the experiments with the help of CV, RF, MR, MD, BV and NB. LPB helped in the manuscript redaction. All authors reviewed the manuscript.

Additional information

Supplementary information accompanies this paper at <http://www.nature.com/scientificreports>

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

License: This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 Unported License. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/>

How to cite this article: Aufauvre, J. *et al.* Parasite-insecticide interactions: a case study of *Nosema ceranae* and fipronil synergy on honeybee. *Sci. Rep.* **2**, 326; DOI:10.1038/srep00326 (2012).

CHAPITRE 3
RÉPONSE TRANSCRIPTOMIQUE DE L'ABEILLE À
NOSEMA CERANAE ET AUX INSECTICIDES

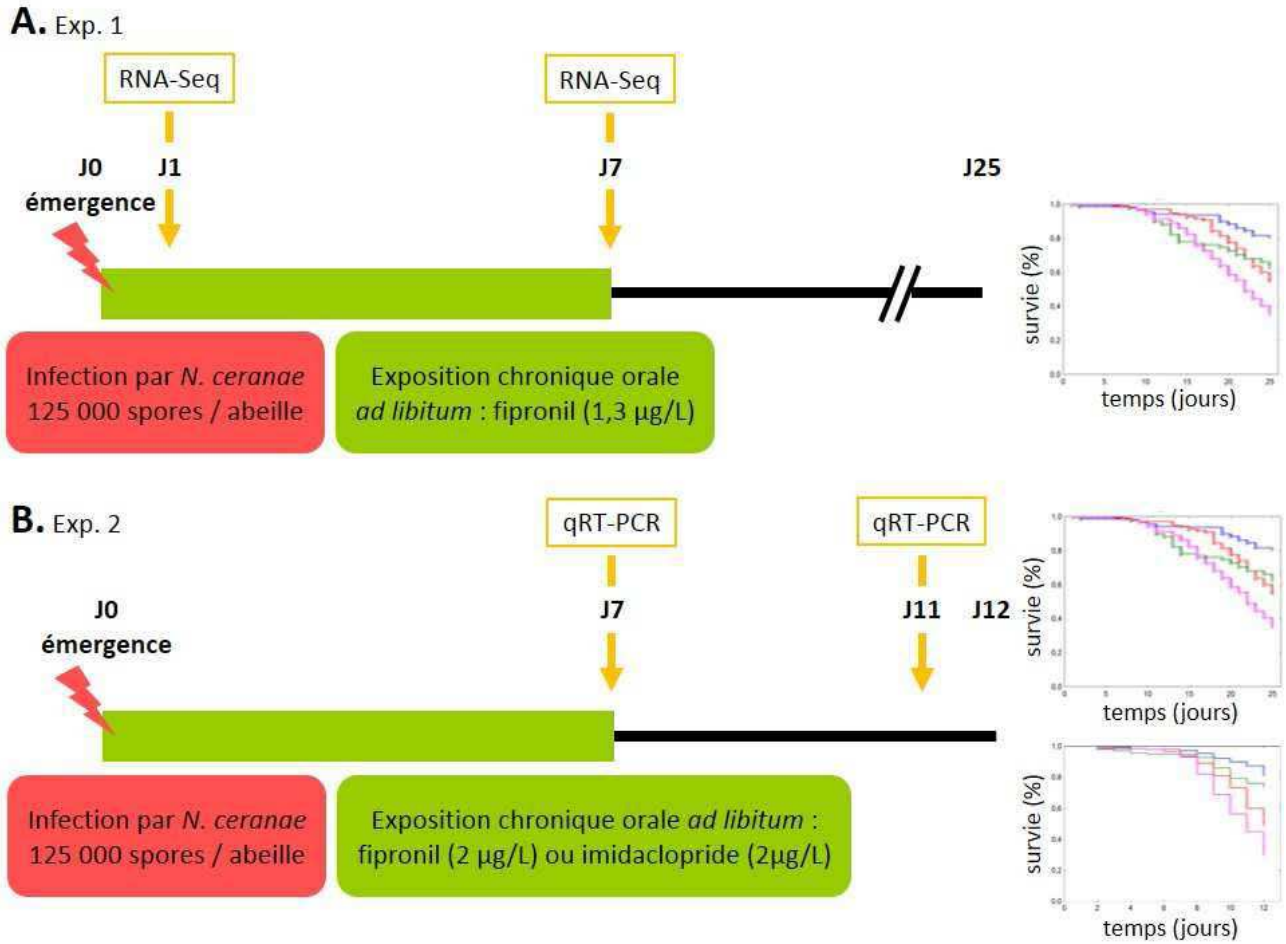


Figure 20. Protocoles d'exposition des abeilles à différentes combinaisons *N. ceranae*-insecticides utilisés lors des expérimentations (A) RNA-Seq et (B) qRT-PCR pour l'analyse du transcriptome.

Introduction

Suite à la mise en évidence d'un effet synergique de l'association *N. ceranae*-insecticide sur la mortalité des abeilles (Vidau *et al.*, 2011a; Aufauvre *et al.*, 2012), il apparaissait nécessaire d'identifier les mécanismes moléculaires impliqués dans l'apparition de cette synergie. Dans ce but, nous avons pour objectif d'identifier, par une étude du transcriptome de l'intestin, les processus biologiques altérés chez l'abeille soumise à la combinaison *N. ceranae*-fipronil. Puisque chaque combinaison *N. ceranae*-fipronil testée auparavant entraînait un effet synergique (Aufauvre *et al.*, 2012), nous avons choisi d'appliquer les deux traitements dès l'émergence des abeilles adultes pour des questions pratiques et parce que cette combinaison entraînait une très forte synergie. En utilisant le même protocole que précédemment, l'expérimentation a été reconduite plusieurs fois et, malgré une surmortalité des abeilles soumises à la combinaison *N. ceranae*-fipronil, aucune synergie n'a été observée. L'absence d'effet synergique pourrait être due à des paramètres non maîtrisés lors des expérimentations. En effet, les abeilles sont collectées après développement au sein de leurs colonies et ont donc pu être préalablement exposées à de nombreux facteurs environnementaux, comme d'autres contaminants chimiques ou agents pathogènes.

L'étude du transcriptome de l'abeille a tout de même été réalisée dans le but de mieux comprendre la réponse de l'abeille à ces différents facteurs de stress. Un des objectifs majeurs était d'identifier les processus biologiques, c'est-à-dire les groupes de gènes fonctionnels, spécifiquement affectés en réponse à l'infection parasitaire, à l'intoxication par des insecticides de différentes familles chimiques, ou à différentes combinaisons parasite-insecticide. L'analyse du transcriptome, effectuée à différents temps de prélèvement, visait également à mieux appréhender la cinétique de réponse de l'abeille aux différents facteurs de stress. Cette étude a été réalisée spécifiquement sur l'intestin moyen car ce tissu constitue à la fois le site primaire de l'infection par *N. ceranae* et le site privilégié d'exposition aux insecticides administrés par voie orale. L'analyse transcriptomique de la réponse de l'abeille a été réalisée en utilisant deux méthodes d'analyses complémentaires lors de deux expérimentations indépendantes.

Au cours de la première expérimentation, des abeilles émergentes ont été exposées soit à *N. ceranae*, soit à une faible concentration de fipronil (1,3 µg/L) durant 7 jours, soit à une combinaison des deux traitements (Figure 20.A). Le transcriptome de l'intestin moyen a été analysé dans sa globalité en utilisant la technique de séquençage à haut débit dite de RNA-Sequencing (RNA-Seq). Le RNA-Seq est une technique de choix pour suivre l'expression des gènes *via* l'analyse de l'ensemble des ARNm contenus au sein d'une cellule ou d'une population de cellules (Figure 21) (McGettigan, 2013). Le niveau d'expression des gènes de l'abeille a été évalué 24 h ou 7 j après le

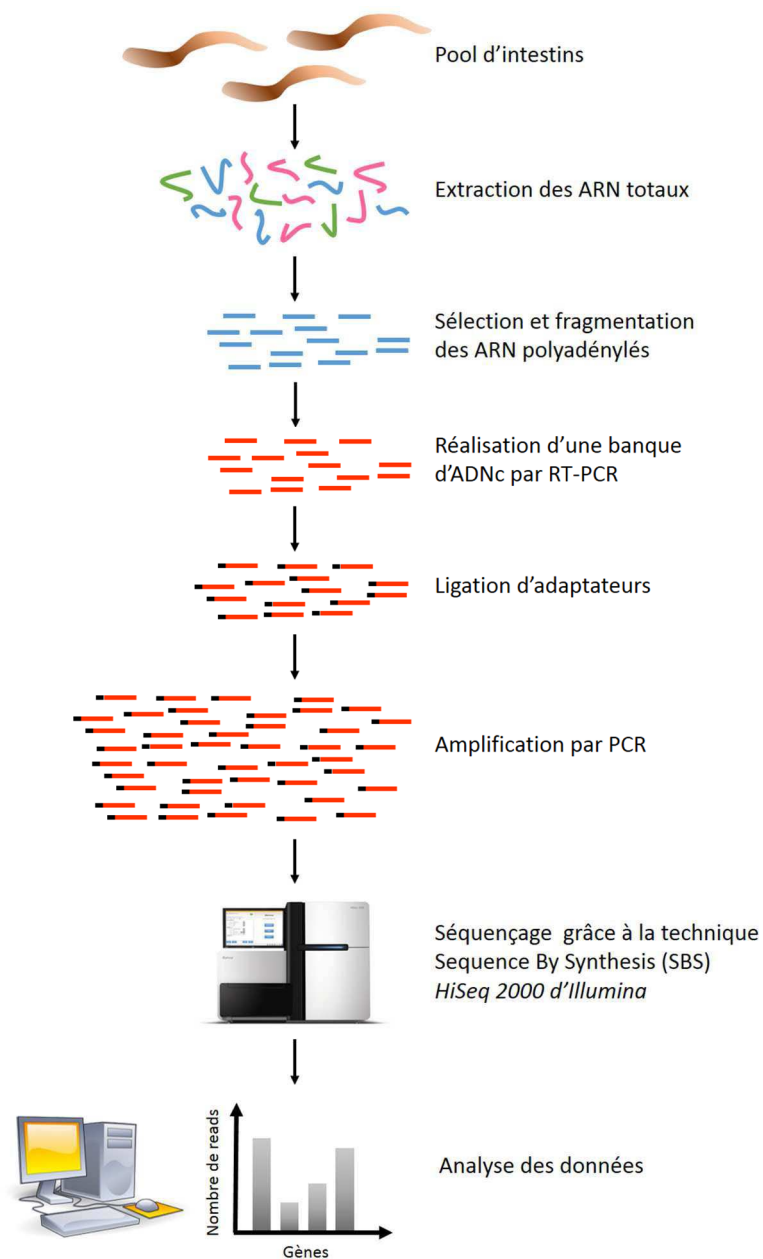


Figure 21. Principe de la technologie RNA-Seq utilisée pour l'analyse du transcriptome de l'abeille.

Les ARN totaux ont été extraits du pool d'intestins d'abeilles puis les ARNm ont été sélectionnés à l'aide de billes magnétiques portant des oligo(dT) puis fragmentés. Les ARNm ont ensuite été rétrotranscrits en ADNc, auxquels des adaptateurs ont été ajoutés. Les ADNc ont été amplifiés par PCR et les amplicons séquencés sur un HiSeq 2000 d'Illumina. Les séquences (« reads ») obtenues ont été alignées sur le génome de référence d'*Apis mellifera* (Cornman *et al.*, 2009). Le niveau d'expression des gènes a été évalué grâce au nombre de lectures dénombrées pour chaque gène.

début des traitements dans le but d'appréhender respectivement les réponses précoces et à moyen terme.

Au cours d'une deuxième expérimentation, des abeilles émergentes ont été exposées soit à *N. ceranae*, soit aux insecticides fipronil (2 µg/L) ou imidaclopride (2 µg/L), soit aux combinaisons *N. ceranae*-fipronil ou *N. ceranae*-imidaclopride (Figure 20.B). L'objectif de cette étude était d'analyser la réponse de l'abeille au niveau de l'intestin moyen à moyen et à plus long terme. Pour cela, l'analyse de l'expression de plusieurs gènes de l'abeille a été réalisée par RT-PCR quantitative (qRT-PCR), 7 et 11 j après le début des traitements. Parmi les gènes étudiés, certains ont été choisis car leur expression était modifiée lors de la première expérimentation (RNA-Seq), d'autres gènes ont été choisis *a priori* car liés à des fonctions biologiques connues pour intervenir dans la réponse au parasitisme ou à l'exposition à des insecticides chez les insectes. Pour chaque gène, au moins un couple d'amorces spécifiques a été choisi dans la littérature ou dessiné *in silico* (Annexe 1). Les couples d'amorces ont été dessinés de façon à être de courte taille, à comporter un fort pourcentage en bases guanine et cytosine et à amplifier un fragment compris entre 50 et 150 pb pour que l'amplification soit optimale. De plus les amorces ont été dessinées en dehors des introns. La spécificité, la température d'hybridation optimale et la concentration des amorces ont été vérifiées et validées par PCR « classique » (Annexe 1). Les couples ont ensuite été testés en qRT-PCR pour amplifier de l'ADNc (dilutions de 4 en 4) produit à partir d'ARNm extraits d'intestins d'abeilles. Cette étape permet d'apprécier la linéarité et l'efficacité des couples d'amorces sélectionnés (Figure 22) et de définir, pour chaque couple d'amorces, l'intervalle de validation des valeurs de C_T . De plus, les couples d'amorces ont été testés sur des échantillons contrôles ne contenant pas d'ADNc (réaction de rétrotranscription sans reverse transcriptase) dans le but de valider l'absence d'amplification aspécifique et d'ADN contaminant dans les échantillons. La phase de mise au point a permis de valider au moins un couple d'amorces pour 25 gènes différents (Annexe 1). L'expression de ces 25 gènes a ainsi été étudiée par qRT-PCR chez des abeilles infectées par *N. ceranae*, exposées aux insecticides ou soumises à une combinaison *N. ceranae*-insecticide.

Les résultats, obtenus par RNA-Seq ou qRT-PCR, issus de ces deux études transcriptomiques ont été compilés dans un même article qui sera prochainement soumis pour publication dans la revue PLoS ONE.

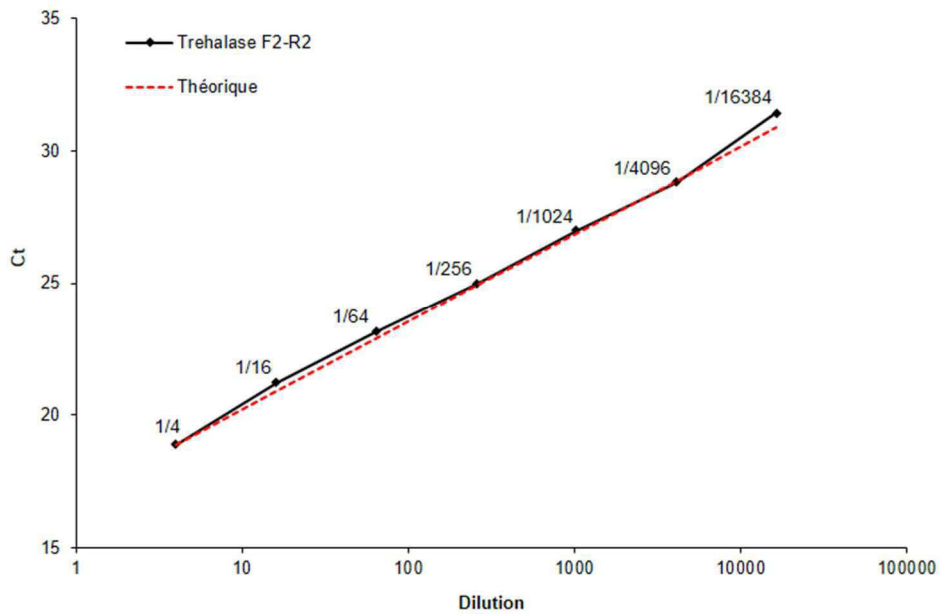


Figure 22. Validation du couple d'amorces Trehalase F2 / Trehalase R2 pour utilisation en qRT-PCR.

Le couple d'amorces a été utilisé en qRT-PCR pour amplifier de l'ADNc produit à partir d'ARNm d'intestins d'abeilles puis dilué de 4 en 4. La courbe représentant les valeurs de C_T obtenues (en noir) en fonction du logarithme du facteur de dilution a été comparée à la courbe théorique (en rouge) attendue pour une relation linéaire et idéale où le nombre de C_T augmente de 1 pour une dilution d'un facteur 2. Pour ce couple d'amorces, cette relation a effectivement été linéaire (coefficient de détermination de 0.999) et de pente attendue (efficacité de 102 %) pour des dilutions comprises entre 1/4 et 1/4096 et des valeurs de C_T entre 18 et 29. Les mesures suivantes ont alors toujours été réalisées dans cet intervalle de validation.

Full title: Transcriptome analysis of the honeybee response to *Nosema ceranae* and insecticides

Short title: Honeybee response to *Nosema ceranae* and insecticides

Julie AUFAUVRE^{1,2}, Bernard VIGUÈS^{1,2}, Frédéric DELBAC^{1,2} and Nicolas BLOT^{1,2*}

¹Clermont Université, Université Blaise Pascal, Laboratoire "Microorganismes : Génome et Environnement", BP 10448, 63000 Clermont-Ferrand, France, ²CNRS, UMR 6023, LMGE, 63171 Aubière, France

* Corresponding author: Nicolas.Blot@univ-bpclermont.fr

Abstract

Honeybees (*Apis mellifera*) are constantly exposed to a wide variety of environmental stressors such as parasites and pesticides. Among them, *Nosema ceranae* and neurotoxic insecticides might act in combination and lead to a higher honeybee mortality. We investigated the molecular response of honeybees exposed to *N. ceranae*, to insecticides, or to a combination of both stressors. Midgut transcriptional changes induced by these stressors were measured in two independent experiments combining a global RNA-Seq transcriptomic approach with the screening of the expression of selected genes by quantitative RT-PCR. Our result showed that, although *N. ceranae*-insecticide combinations induced a significant increase in honeybee mortality, they did not always lead to a synergistic effect. According to gene expression profiles, chronic exposure to insecticides had no significant impact on detoxifying genes but repressed the expression of immunity-related genes. Honeybees treated with *N. ceranae*, alone or in combination with an insecticide, showed a strong alteration of midgut immunity together with significant modifications affecting cuticle coatings and trehalose metabolism. An increasing impact of treatments on gene expression profiles with time was identified suggesting an absence of stress recovery which could be linked to the higher mortality rates observed.

Introduction

Honeybees (*Apis mellifera*), like any living organism, are constantly exposed to a wide variety of biotic and abiotic stressors. Among those stressors, pathogens and pesticides represent important variables influencing the honeybee survival [1–4]. Among the common pathogens of the honeybee, the microsporidian parasite *Nosema ceranae* is a unicellular eukaryote and invasive intracellular parasite infecting *A. mellifera* midgut, inducing a disease named nosemosis [5]. It is a worldwide emerging parasite that presents a high prevalence in honeybee colonies [6,7]. *N. ceranae* infection affects the honeybee health through immune suppression [8–10], energetic stress [11–13], degeneration of gut epithelial cells [10,14] and reduction of lifespan [10,15,16] and therefore might lead to colony depopulation [15].

Honeybees are also frequently exposed to neonicotinoid and phenylpyrazole insecticides which are neurotoxic compounds intensively used on crops worldwide against arthropod pests [17,18]. Inside their colonies, honeybees can be orally or topically exposed to these insecticides as diverse matrices (*i.e.* pollen, honey, wax) can be contaminated with low concentrations of these compounds [18–21]. Nonetheless, chronic exposure to low doses of neonicotinoids and phenylpyrazoles can have sublethal effects on honeybee [22,23] such as impairment on cognition [24–26] and flight behaviour [27–31]. Moreover, low and sublethal doses, under acute intoxication, of the phenylpyrazole fipronil or the neonicotinoid imidacloprid can lead to a significant decrease in honeybee survival once applied through chronic exposure [32–34].

Environmental stressors might interact with each other and potentiate their effects on organisms' health and survival [35,36]. Interactions between stressors in honeybees are thought to be responsible for the severe colony losses recorded worldwide for more than ten years [1–4]. *N. ceranae* and insecticides were shown to act synergistically on the reduction of the honeybee lifespan. Synergistic interaction is defined as a combination of stressors that results in a greater effect than expected from cumulative independent exposures [35]. A synergistic effect on mortality was observed in honeybees co-exposed to *Nosema* spp. spores and imidacloprid [37]. *N. ceranae* and fipronil combinations also led to a synergistic effect on the honeybee mortality, whatever the sequence of exposure to stressors [38,39].

Only few data have been collected regarding the molecular honeybee response to *N. ceranae* and insecticides and none to their combination. In insects, the immune and detoxification systems respond quickly to chemical and biological stresses [40] and are well expressed in the gut [41,42] given that this organ is the site of exposure to many stressors. In honeybee, the midgut is the primary site of infection by *N. ceranae* but also the main site of exposure to orally administered chemicals. Our objective was to investigate the honeybee response to biotic and abiotic environmental stressors. We

measured and compared the midgut transcriptional changes induced by the parasite *N. ceranae* and one neurotoxic insecticide (fipronil or imidacloprid), alone or in combination. For this purpose, we performed two independent experiments combining a global RNA-Seq transcriptomic approach (Exp. 1) with the screening of the expression of selected genes by quantitative RT-PCR (Exp. 2).

Materials and Methods

Bees, parasites and insecticides

Experiments 1 and 2 were performed in September 2012 and April 2013 respectively, with *Apis mellifera* emerging honeybees taken from different colonies of the same apiary at the Laboratoire Microorganismes: Génome et Environnement (UMR 6023, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand, France). Frames of sealed brood were placed in an incubator in the dark at 33 °C under humidified atmosphere. Emerging honeybees were collected and distributed into different experimental groups of 165 and 140 individuals for Exp. 1 and Exp. 2 respectively and placed in cages. In order to mimic the colony environment, a 5 mm piece of Beeboost® (Phero Tech Inc.) releasing 5 queen's mandibular pheromones was placed in each cage. During all the experiment, honeybees were fed *ad libitum* with 50 % (w/v) sugar syrup supplemented with 1 % (w/v) Provita'Bee (Vetopharm Pro). Every day, feeders were replaced, dead bees were counted and removed, and the sucrose consumption was quantified. Bees were either not treated (control), infected with *N. ceranae*, chronically exposed to an insecticide (fipronil or imidacloprid), or exposed to both *N. ceranae* and insecticide (fipronil or imidacloprid).

N. ceranae spores were obtained according to Vidau *et al.* (2011) [38]. The spore concentration was determined by counting using a haemocytometer chamber. *N. ceranae* species was confirmed by PCR according to Martín-Hernández *et al.* (2007) [43]. Emerging honeybees were individually infected by feeding with 125,000 spores of *N. ceranae* in 3 µL of 50 % sucrose solution using a micropipette. Control honeybees were treated with a sucrose solution devoid of *N. ceranae* spores.

Stock solutions of fipronil (1 or 2 g/L for Exp. 1 and Exp. 2 respectively) and imidacloprid (2 g/L) were prepared in DMSO and diluted in sucrose to a final concentration of 1,3 µg/L (Exp. 1) or 2 µg/L (Exp. 2) for fipronil and 2 µg/L for imidacloprid with 0,1 % DMSO (v/v). Emerging honeybees were exposed *ad libitum* to the contaminated feeding syrup for 7 days. The insecticide consumption was quantified by measuring the daily amount of contaminated syrup consumed per cage reported per living honeybee. Control honeybees were fed *ad libitum* with 0,1 % DMSO-containing sugar syrup.

RNA extraction

Honeybee midguts were dissected on ice, pooled and immediately homogenized in 400 μ L TRIzol® Reagent (Life Technologies) using first a microtube pestel and then a BioSpec Mini-BeadBeater (3 pulses for 2 min at 30 Hz) after addition of 150 mg of 0.5 mm glass beads. After phase separation according to the manufacturer, the aqueous phase was supplemented with 0.015 volume of β -mercaptoethanol and 1 volume of 70 % ethanol and then transferred to an RNeasy spin column (RNeasy Mini Kit, Qiagen). Total RNA was isolated according to the kit instructions. Genomic DNA was removed using the RNA-free DNase set (Qiagen) twice during the RNA extraction. RNA was quantified by spectrophotometry using the ND-1000 (Nanodrop).

RNA-Seq analysis of differentially expressed genes

Two RNA samples were extracted for each experimental group from pools of 3 midguts. RNA quality and concentration were checked using a RNA 6000 Nano Chip on the 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). Six micrograms of each RNA sample were provided to Montpellier GenomiX (MGX, Institut de Génomique Fonctionnelle, Montpellier, France) for an additional RNA quality control and for library preparation and sequencing (50 bp singled-end reads) on an HiSeq 2000 (Illumina) following the manufacturer's protocol. Sequence runs were deposited in the NCBI short read archive under accessions XXXX. Image analyses and base-calling were conducting using the HiSeq Control Software 1.4.5.0 and RTA component 1.12.4.0 (Illumina). Sequences were mapped on the *Apis mellifera* genome (version 4.5 downloaded from NCBI), allowing up to two mismatches in alignments, and tags that matched predicted transcripts were counted using CASAVA 1.8.2 (Illumina).

The R package DESeq was used to normalize data and determine which genes were differentially expressed among treatments [44]. Genes were considered to be differentially expressed between two treatments at an adjusted p-value < 0.1 . The p-values were adjusted for multiple testing with the Benjamini-Hochberg procedure which controls for false discovery rate. A principal component analysis (PCA) was performed under PAST [45] to evaluate the samples' distribution according to their expression profiles. This analysis was performed using the log of normalized data corresponding to the 3001 genes showing an adjusted p-value < 0.1 in at least one pairwise comparison.

Quantitative real-time PCR

cDNA synthesis was performed in a 20 μ L reaction containing 0.5 μ g of total RNA, 0.5 μ g of oligo(dT)₁₂₋₁₈ primers (Life Technologies), 0.5 mM of each dNTP and 200 U of SuperScript® III Reverse Transcriptase (Life Technologies) in the appropriate 1 X buffer.

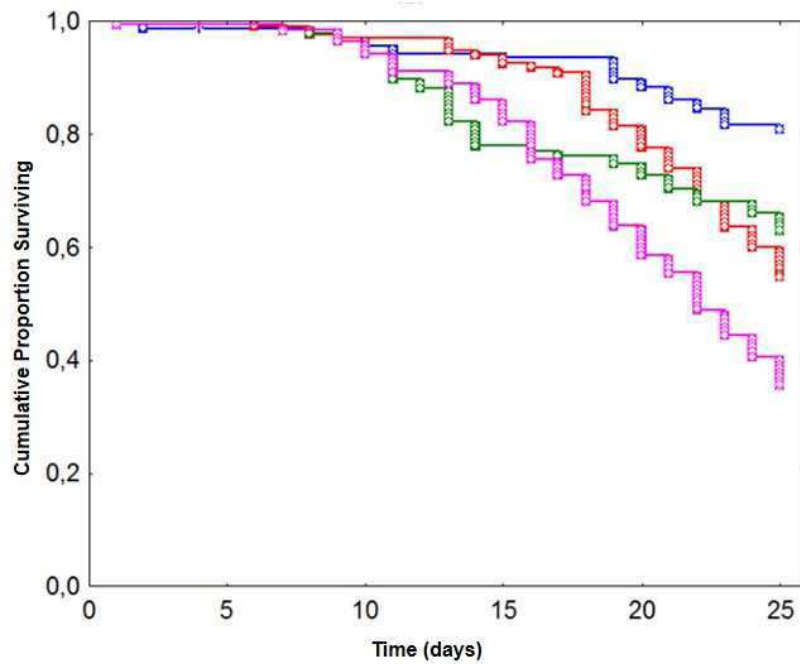


Figure 1. Effect of *N. ceranae* and fipronil, alone or in combination, on honeybee survival.

Data give the cumulative proportion of surviving honeybees exposed to no treatment (—), *N. ceranae* (—), fipronil (—), or a *N. ceranae*-fipronil combination (—). *N. ceranae*-treated honeybees were individually infected at their emergence (day 0) and fipronil-treated ones were chronically and orally exposed to fipronil (1.3 µg/L) from day 0 to day 7. Data from 165 honeybees were analysed using the Kaplan-Meier method.

All real-time quantitative PCR analyses were performed in 96-well microtiter plates on a Mastercycler® ep Realplex² thermocycler (Eppendorf) running Realplex software (version 1.5) using the primers and conditions listed in Table S1. All primer sets, whether they were already published or newly designed, have been validated according to their specificity, linearity, efficiency and amplification reproducibility (Table S1). qPCR reaction mixtures consisted in 5 µL of 1:16 diluted cDNA, the appropriate concentration of each primer and 10 µL of 2X Absolute Blue QPCR SYBR Green Mix (Thermo Scientific) in a final volume of 20 µL. Negative controls (without cDNA) were included in each reaction set. The PCR programme consisted in an initial step at 95 °C for 15 min, and 40 cycles of 95 °C for 15 s, specific annealing temperature for 30 s and 72 °C for 30 s. Fluorescence was measured in each cycle after the elongation step. The specificity of the reaction was checked by analysing the melting curve of the final amplified product. The amplification results were expressed as the threshold cycle number (C_T), which represents the number of cycles needed to generate a fluorescent signal greater than a predefined threshold. C_T values were normalized by subtracting the C_T value of the RpS5a reference gene from the corresponding cDNA sample. The data corresponding to each gene were analysed under PAST to determine if they fitted a normal distribution. The variation in gene transcript levels between different groups was evaluated by two-way ANOVA followed by a Student's t-test. When data did not fit a normal distribution, the non-parametric Kruskal-Wallis test was applied. p-values below 0.05 were considered significant.

Results

Exp. 1: Whole honeybee transcriptome response to *N. ceranae* and/or fipronil

Survival analysis

In this experiment, newly emerged honeybees were exposed to (i) no treatment, (ii) *N. ceranae* (125,000 spores/bee), (iii) chronic exposure to fipronil (1.3 µg/L for 7 days) or (iv) the combination of both stressors. Survival analysis revealed that each treatment, applied alone or in combination, led to a significant decrease ($p \leq 0.05$, one-tailed χ^2 test) in honeybee survival compared to control (Figure 1). As expected, control honeybees presented the lowest mortality rate (19 %) at the end of the experiment, *i.e.* 25 days after emergence. Mortality rates were significantly increased in honeybees exposed to *N. ceranae* (45 %, $p < 0.001$) or fipronil (37 %, $p < 0.001$) alone compared to control. Both factors, when applied alone, had a similar impact on honeybee survival ($p = 0.070$). The mortality rate of honeybees co-exposed to both factors reached a maximum of 64 %, and was significantly different from other experimental groups ($p < 0.001$). However, while the *N. ceranae*-fipronil combination induced the highest honeybee mortality, it did not lead to a synergistic effect.

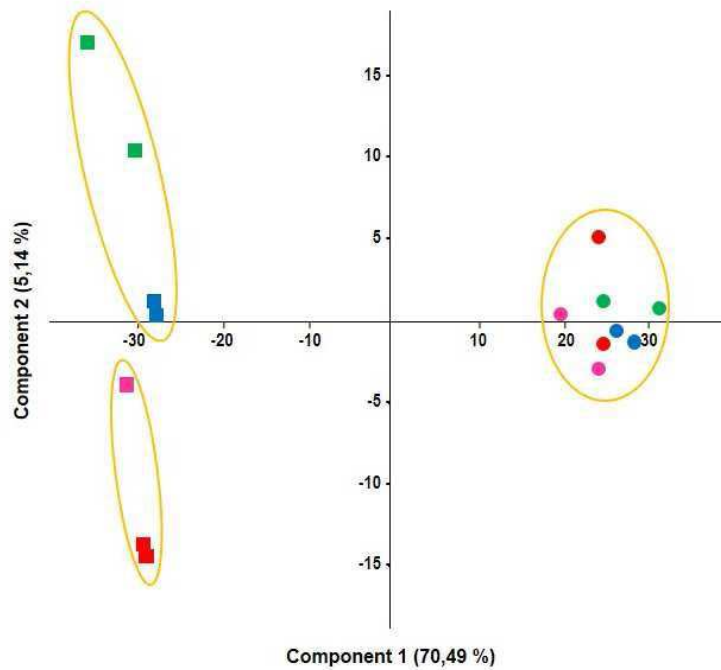


Figure 2. Principal component analysis of RNA-Seq data.

Gene expression changes were investigated at day 1 (circles) or 7 (squares) in honeybees exposed to no treatment (—), *N. ceranae* (—), fipronil (—), or a *N. ceranae*-fipronil combination (—). The PCA was performed using normalized RNA-Seq data of a set of 3001 genes showing an adjusted p-value < 0.1 in at least one pairwise comparison.

As expected from our previous study [39], neither *N. ceranae* nor the insecticide influenced the host sucrose consumption and the parasite development (data not shown). Honeybees exposed to insecticide and to the *N. ceranae*-fipronil combination absorbed a similar daily quantity of fipronil of 1/209th (19.9 ± 5.1 pg/day/bee) and 1/201th of the DL50 (20.7 ± 6.9 pg/day/bee) respectively (LD50 of 4.17 ng/bee [46]). As those honeybees showed a significant increase in their mortality rates, the fipronil doses absorbed, although much lower than the molecule LD50, cannot be considered as sublethal.

Identification of differentially expressed genes

The midgut transcriptome modifications induced by parasitism and exposure to insecticide, acting alone or in combination, were determined at 1 and 7 days after the treatments' initiation by whole transcriptome sequencing (RNA-Seq). A total of 16 RNA-Seq libraries were generated corresponding to 2 libraries for each experimental group. The number of sequence reads that mapped the honeybee genome varied between 10,000,000 and 27,000,000 per library, except for one where only 14.2 % of the reads matched the genome. This sample contained a high amount of *Varroa destructor* virus sequences and was then discarded from further analyses. Overall, 10,061 honeybee genes have been detected in either library. The R package DESeq [44] was used to normalize data and perform all possible pairwise comparisons to determine the differentially expressed genes between experimental groups. In order to validate the RNA-Seq data, 8 genes showing differential expression in at least two pairwise comparisons were randomly selected. qRT-PCR assays on these genes confirmed both the direction and the magnitude of changes as shown by the Spearman rho correlation coefficient of 0.722 ($p = 8.0 \times 10^{-13}$) (Figure S1).

A PCA was performed on normalized data corresponding to a set of 3001 genes showing an adjusted p-value < 0.1 in at least one pairwise comparison in the whole data (Figure 2). The first (70.5 %) and second (5.1 %) components represent most of the differential expression pattern with a cumulative proportion of 75.6 %. This analysis revealed a clear segregation between samples collected at day 1 and those collected at day 7. The PCA plot also showed that samples collected at day 1 were all gathered together, while those collected at day 7 were segregated in a treatment-dependent way, possibly more strongly upon parasite infection. Therefore, honeybee ageing might have highly influenced gene expression in our experiment but exposure to parasite and/or insecticide might also have influenced it 7 days after treatment initiation. Indeed, pairwise comparisons performed on samples collected on day 1 only resulted in 17 genes whose expression was significantly modified between two experimental groups (*i.e.* showing at least one adjusted p-value < 0.1 among all pairwise comparisons), while expression profiles were more affected on day 7 with 104 genes whose expression was affected.

Table 1. Honeybee genes whose expression is significantly modified in response to at least one treatment (*N. ceranae* infection, chronic exposure to fipronil or a combination of both) compared to the control, 1 or 7 days after the experiment initiation. The log2 ratio of the normalized transcript content relative to the control at the same day is given together with the adjusted p-value in parentheses. Significant expression changes (adjusted p-value < 0.1) are shown in bold.

Locus (Gene)	Product	<i>N. ceranae</i> vs. control	Fipronil vs. control	<i>N. cer.</i> + fip. vs. control
1 day after treatment initiation				
406065 (Wat)	worker-enriched antennal transcript	2.32 (0.056)	0.44 (1)	0.86 (1)
726421	membrane metallo-endoropeptidase-like	1.19 (0.051)	0.47 (1)	0.96 (0.964)
408864	waprin-Phi1-like variant 2	-0.84 (0.056)	-0.13 (1)	-0.11 (1)
552195	-	-1.32 (0.051)	-0.34 (1)	-0.50 (1)
551454	voltage-dependent calcium channel subunit	-1.45 (0.028)	-0.01 (1)	-0.77 (1)
411602	dynein heavy chain 6, axonemal-like	-1.54 (0.067)	-1.21 (1)	-1.16 (1)
408365 (serp)	serpentine	-1.56 (0.056)	-0.58 (1)	-0.51 (1)
100576126	-	-0.81 (1)	-0.30 (1)	-1.58 (0.090)
100578599	-	-2.93 (0.000)	-0.63 (1)	-0.94 (1)
725041	slit homolog 2 protein-like	-3.08 (0.008)	-0.54 (1)	-1.92 (1)
7 days after treatment initiation				
724556 (CPR17)	cuticular protein 17	-0.38 (1)	1.57 (1)	6.41 (0.000)
408650	inositol oxygenase-like	-0.05 (1)	4.54 (0.088)	2.13 (1)
100578048	-	2.37 (0.001)	-0.24 (1)	3.83 (0.000)
725123	-	1.31 (1)	0.85 (1)	3.57 (0.029)
413894 (Y-e3)	yellow-e3	1.33 (1)	1.71 (1)	3.44 (0.002)
100576797	acyl-CoA Delta(11) desaturase-like	1.36 (1)	2.79 (0.055)	0.55 (1)
551600 (Cht5)	chitinase 5 variant 2	2.61 (0.001)	-0.12 (1)	2.49 (0.011)
412202 (CPR28)	cuticular protein 28	0.15 (1)	0.15 (1)	2.35 (0.055)
727287	-	-0.33 (1)	-0.14 (1)	2.20 (0.000)
727037	lipase member H-A-like	0.86 (1)	1.42 (0.372)	2.11 (0.055)
100578599	-	2.07 (0.008)	-0.48 (1)	1.78 (0.196)
408645	-	-0.02 (1)	0.32 (1)	1.93 (0.008)
100577518	leucine-rich repeats and immunoglobulin-like	1.48 (0.005)	0.22 (1)	0.56 (1)
552210 (Faa)	fumarylacetoacetase	1.38 (0.006)	0.41 (1)	1.31 (0.142)
725272	histone H3-like	1.36 (0.000)	0.29 (1)	0.88 (0.568)
412220	vesicular glutamate transporter 2-like	0.52 (1)	0.87 (0.066)	1.28 (0.001)
406132	histone H4	1.26 (0.022)	-0.01 (1)	0.73 (1)
551143 (Inos)	inositol-3-phosphate synthase	-0.13 (1)	1.16 (0.012)	0.11 (1)
413858	-	0.05 (1)	0.45 (1)	0.97 (0.029)
551924	-	0.95 (0.007)	0.14 (1)	0.55 (1)
408669	-	0.95 (0.057)	-0.16 (1)	0.40 (1)
413768	2-oxoglutarate dehydrogenase	0.18 (1)	0.30 (1)	0.95 (0.078)
552244	-	0.85 (0.051)	0.18 (1)	0.56 (1)
724336	tRNA dimethylallyltransferase	0.83 (0.051)	0.15 (1)	0.65 (1)
412282	leucyl-tRNA synthetase, cytoplasmic-like	0.75 (0.083)	-0.48 (1)	-0.01 (1)
409932	B(0,+)-type amino acid transporter 1-like	0.68 (0.099)	-0.02 (1)	0.47 (1)
410527	probable cation-transporting ATPase	0.62 (0.088)	-0.18 (1)	0.49 (1)
412843 (Pepck)	phosphoenolpyruvate carboxykinase	-0.62 (0.081)	-0.01 (1)	-0.27 (1)
725756	beta-galactosidase	-0.75 (0.083)	-0.72 (0.066)	-0.44 (1)
725777	LIM and SH3 domain protein Lasp-like	-0.61 (0.347)	-0.75 (0.040)	-0.58 (1)
726414	-	-0.13 (1)	-0.76 (0.051)	-0.46 (1)
725466 (Fur1)	furin-like protease 1	-0.29 (1)	-0.77 (0.088)	-0.23 (1)
726965	-	-0.79 (0.016)	-0.62 (0.222)	-0.82 (0.12)
410767 (Nedd9)	neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated gene 9	-0.31 (1)	-0.82 (0.012)	-0.55 (1)
725862	-	-0.13 (1)	-0.84 (0.085)	-0.74 (0.804)
413117	proton-coupled amino acid transporter	0.16 (1)	-0.86 (0.010)	-0.49 (1)
409185	-	-0.45 (1)	-0.86 (0.072)	-0.64 (1)
724832 (inx2)	innexin 2	-0.37 (1)	-0.86 (0.006)	-0.59 (1)
727092	POU domain, class 2, transcription factor 3-like	0.16 (1)	-0.92 (0.012)	-0.28 (1)
408664 (hipk)	homeodomain interacting protein kinase	-0.70 (0.123)	-0.59 (0.331)	-0.94 (0.048)
100578870	-	-0.48 (1)	-0.97 (0.017)	-0.26 (1)
100576695	-	-0.76 (0.631)	-0.99 (0.095)	-0.82 (1)
412007	facilitated trehalose transporter	-0.18 (1)	-0.24 (1)	-1.00 (0.083)
408358	-	-1.06 (0.005)	-0.86 (0.051)	-0.87 (0.327)
413575	facilitated trehalose transporter	-0.37 (0.926)	-0.98 (0.000)	-1.06 (0.004)
409628 (CDase)	neutral ceramidase	-1.08 (0.003)	-0.57 (0.958)	-1.04 (0.102)
725671	homeobox protein Nkx-2.5-like	-0.34 (1)	-1.09 (0.001)	-0.69 (1)
410658 (Lim3)	Lim3 homeobox	-0.98 (0.027)	-1.11 (0.005)	-1.08 (0.087)
726990	-	-0.62 (0.407)	0.03 (1)	-1.18 (0.06)
413242	heparan sulfate N-deacetylase	-1.03 (0.001)	-0.83 (0.012)	-1.31 (0.000)
100576640	-	-0.86 (0.106)	-1.34 (0.000)	-0.68 (1)
410484	trehalase	-1.35 (0.000)	-0.47 (0.922)	-0.92 (0.032)
100577390	fibroblast growth factor 18-like	-1.33 (0.003)	-0.85 (0.222)	-1.39 (0.029)
413645 (SP22)	serine protease 22	-0.57 (0.442)	-0.41 (1)	-1.41 (0.001)
410638 (Ddc)	dopa decarboxylase	-1.42 (0.003)	-0.54 (1)	-1.24 (0.102)
100576509	-	-0.20 (1)	-1.44 (0.001)	-0.76 (1)
411353	lipase 3-like	-0.79 (0.006)	-0.39 (1)	-1.45 (0.000)
406114	alpha-amylase	-1.77 (0.000)	-0.59 (1)	-0.65 (1)
409626 (SP40)	serine protease 40	-1.18 (0.022)	-0.28 (1)	-1.96 (0.000)
100576126	-	-2.14 (0.006)	-0.64 (1)	-2.36 (0.029)
726796	hydrocephalus-inducing protein homolog	-1.08 (0.436)	-0.53 (1)	-3.20 (0.000)
100578512	hydrocephalus-inducing protein-like	-1.66 (0.049)	-1.09 (0.691)	-3.42 (0.000)
100578545	-	-2.13 (0.002)	-0.65 (1)	-4.38 (0.000)

Honeybee genes responding to *Nosema* infection and fipronil intoxication

In order to determine which genes were involved in honeybee response to *N. ceranae* and/or exposure to fipronil, we focused on pairwise comparisons performed between treated experimental groups and controls at the same day. Overall, we found 71 genes whose expression is significantly modified in response to at least one of the treatments 1 or 7 days after the experiment initiation (Table 1). The honeybee response to treatments is particularly lower at day 1 after treatment initiation with only 10 genes whose expression is significantly modified, compared to the 63 genes detected from data collected on day 7.

We noticed overlapping gene expression changes on day 7 between honeybees exposed to *N. ceranae* alone and to the *N. ceranae*-fipronil combination (Table 1). Both treatments led to a significant decrease in the expression of two genes encoding serine proteases, SP22 (Gene ID 413645) and SP40 (Gene ID 409626). Both treatments also induced a significant overexpression of a gene encoding a histone H3-like (Gene ID 725272). Moreover, the expression of the histone H4 encoding gene (Gene ID 406132) was induced in response to *N. ceranae* alone. Several genes involved in chitin metabolism and cuticle coatings, that constitute an important barrier defense in honeybees, were activated in experimental groups: the chitinase 5 encoding gene (Gene ID 551600) in response to *N. ceranae* and *N. ceranae*-fipronil combination, and the genes encoding the cuticular proteins 17 (Gene ID 724556) and 28 (Gene ID 412202) in response to the *N. ceranae*-fipronil combination only. Additionally, parasitism decreased the expression of genes related to carbohydrates metabolism. The expression of the genes encoding the facilitated trehalose transporter Tret1-like (Gene ID 412007) and the phosphoenolpyruvate carboxykinase (Gene ID 412843) was reduced in bees exposed to *N. ceranae* and to the *N. ceranae*-fipronil combination respectively. Some treatments affected the expression of genes involved in aminoacids metabolism and transport. The transcript amounts were higher for the B(0,+)-type amino acid transporter 1-like encoding gene (Gene ID 409932) in response to *N. ceranae* and for the fumarylacetoacetase encoding gene (Gene ID 552210) in response to *N. ceranae* and *N. ceranae*-fipronil, while the expression was inhibited for the dopa decarboxylase encoding gene (Gene ID 410638) in response to *N. ceranae* and *N. ceranae*-fipronil, for the vesicular glutamate transporter 2-like encoding gene (Gene ID 412220) in response to *N. ceranae* and to fipronil, and for the proton-coupled amino acid transporter 4-like encoding gene (Gene ID 413117) in response to fipronil alone. Fipronil also led to the overexpression of two genes related to carbohydrates metabolism, encoding an inositol-3-phosphate synthase (Gene ID 551143) and an inositol oxygenase-like (Gene ID 408650). Honeybees exposed to fipronil alone also showed a significant decrease in the expression of two genes encoding transcriptional factors: the homeobox

protein Nkx-2.5-like (Gene ID 725671) and the POU domain, class 2, transcription factor 3-like (Gene ID 727092).

Exp. 2: Transcriptomic profile of selected genes in response to *N. ceranae*, fipronil and imidacloprid

Survival analysis

In this experiment, newly emerged honeybees were exposed to (i) no treatment, (ii) *N. ceranae* (125,000 sp/bee), (iii) chronic exposure to fipronil (2 µg/L), (iv) chronic exposure to imidacloprid (2 µg/L), (v) *N. ceranae*-fipronil combination or (vi) *N. ceranae*-imidacloprid combination. Survival analysis showed a general pattern which is quite similar to the one observed in Exp. 1 (Fig S2). Briefly, all parasite and/or insecticide treatments, except for the imidacloprid treatment ($p = 0.079$), led to a significant decrease ($p \leq 0.001$) in honeybee survival compared to control. Moreover, mortality rates induced by *N. ceranae*-fipronil and *N. ceranae*-imidacloprid combinations were the highest (69 % and 70 % respectively after 12 days) and were significantly ($p \leq 0.001$) higher than the parasite or insecticide treatments applied alone. However, neither *N. ceranae*-fipronil nor *N. ceranae*-imidacloprid combination led to a synergistic effect on host mortality.

Regarding exposure to fipronil, honeybees treated with fipronil alone (46.1 ± 17.7 ng/day/bee, LD50/90) and honeybees exposed to the *N. ceranae*-fipronil combination (43.1 ± 12.2 ng/day/bee, LD50/97) consumed similar daily quantities of insecticide. Like in Exp. 1, fipronil doses received by honeybees in both experimental groups cannot be considered as sublethal. Honeybees exposed to imidacloprid also consumed similar daily quantities of insecticide, whether they were infected by *N. ceranae* (42.2 ± 13.5 ng/day/bee, LD50/664) or not (45.1 ± 17.6 ng/day/bee, LD50/621). As the mortality rate of honeybees treated with imidacloprid alone was not significantly different from the one measured in control bees, the imidacloprid dose received by individuals could be considered as a sublethal one.

Determination of differentially expressed genes by quantitative RT-PCR

Twenty four honeybee genes have been selected as potential expression markers for parasitism or exposure to insecticide. Among those, sixteen genes are involved in functions, such as immunity, detoxification and antioxidant reactions, that are activated in response to environmental stressors in honeybees. As an example, it has been shown that the expression of the genes encoding the hymenoptaecin and defensin 1 antimicrobial peptides (Gene ID 406142 and 406143) and the glucose dehydrogenase (Gene ID 551044) is significantly decreased several days after *N. ceranae* infection [8,9]. Six genes showing differential expression in our RNA-Seq experiment have also been selected.

Table 2. Expression levels of 24 honeybee genes in response to various stressors, alone or in combination, 7 or 11 days after experiment initiation (d.a.i).

Log fold change is given together with the p-value in parentheses. Significant expression changes (p-value ≤ 0.05) are shown in bold.

Locus (Gene)	Product	<i>N. ceranae</i> vs. control		Fipronil vs. control		Imidacloprid vs. control		<i>N. cer.+ fip.</i> vs. control		<i>N. cer.+ imi.</i> vs. control	
		7 d.a.i	11 d.a.i	7 d.a.i	11 d.a.i	7 d.a.i	11 d.a.i	7 d.a.i	11 d.a.i	7 d.a.i	11 d.a.i
725110	lysozyme 1	0.22 (0.517)	-2.12 (0.052)	-0.39 (0.463)	-2.76 (0.007)	0.06 (0.903)	-2.70 (0.011)	-0.12 (0.597)	-3.10 (0.008)	0.13 (0.783)	-2.39 (0.454)
522304	glutathione S-transferase S1	-0.01 (0.990)	-1.74 (0.442)	-0.22 (0.730)	-0.25 (0.443)	-0.31 (0.744)	0.04 (0.324)	-0.31 (0.625)	-2.42 (0.073)	-0.15 (0.842)	-2.26 (0.416)
100578512	hydrocephalus-inducing protein-like	-0.35 (0.885)	-0.05 (0.312)	-0.70 (0.194)	0.56 (0.312)	0.45 (0.309)	1.30 (0.312)	-0.63 (0.194)	-0.17 (0.817)	-0.10 (0.885)	-0.42 (0.312)
727092	POU domain, class 2, transcription factor 3-like	0.50 (0.211)	-1.37 (0.902)	-0.22 (0.545)	-0.41 (0.866)	-0.32 (0.451)	-0.50 (0.978)	-0.13 (0.744)	-2.44 (0.414)	0.37 (0.510)	-3.36 (0.350)
410747	GMC oxidoreductase 3	-3.75 (0.030)	-5.77 (0.061)	-0.52 (0.030)	-5.93 (0.061)	0.04 (0.885)	-3.96 (0.194)	-2.63 (0.030)	-6.65 (0.105)	-2.56 (0.030)	-8.94 (0.030)
410658	Lim3 homeobox	-0.62 (0.000)	-4.17 (0.039)	-0.08 (0.000)	-1.71 (0.548)	-0.35 (0.000)	-2.41 (0.249)	-1.27 (0.000)	-7.15 (0.014)	-0.59 (0.000)	-6.06 (0.012)
725154	serine protease 14	1.51 (0.061)	2.64 (0.061)	0.85 (0.112)	1.57 (0.112)	1.55 (0.061)	0.32 (0.885)	1.58 (0.061)	-0.24 (0.817)	1.77 (0.061)	0.61 (0.194)
409626	serine protease 40	-2.80 (0.030)	-3.43 (0.194)	-0.61 (0.147)	-0.34 (0.665)	-0.27 (0.665)	-1.00 (0.772)	-2.55 (0.030)	-3.90 (0.247)	-1.88 (0.030)	-5.70 (0.030)
551758	glucosinolate sulphatase	-0.83 (0.312)	-2.88 (0.194)	0.19 (0.665)	0.35 (0.665)	0.74 (0.312)	-0.59 (0.885)	-0.07 (1)	-0.58 (0.817)	0.17 (0.885)	-3.03 (0.471)
410484	trehalase	-0.76 (0.162)	-4.61 (0.018)	0.32 (0.408)	-0.48 (0.864)	0.81 (0.226)	-0.80 (0.935)	-0.87 (0.043)	-5.15 (0.024)	-0.07 (0.885)	-3.75 (0.091)
551600	chitinase 5	2.85 (0.030)	0.26 (0.312)	-0.07 (0.885)	-2.65 (0.312)	-0.10 (0.665)	-2.44 (0.194)	2.13 (0.030)	-1.55 (0.817)	2.58 (0.030)	-1.71 (0.471)
412150	endoplasmic-like	0.27 (0.662)	-0.05 (0.295)	-0.26 (0.479)	-0.38 (0.703)	-0.10 (0.905)	-0.52 (0.979)	-0.09 (0.874)	-1.95 (0.228)	0.65 (0.270)	-1.03 (0.361)
411758	catalase (1)	0.07 (0.885)	0.16 (0.216)	-0.11 (0.471)	-0.14 (0.885)	0.64 (0.665)	-0.22 (0.885)	0.20 (0.885)	-1.48 (0.817)	0.70 (0.312)	-1.25 (0.471)
443552	catalase (2)	-0.64 (0.391)	-3.67 (0.046)	-0.48 (0.520)	-1.19 (0.573)	-0.42 (0.611)	-1.56 (0.388)	-0.98 (0.189)	-2.61 (0.076)	-0.60 (0.465)	-3.59 (0.456)
406143	defensin 1	1.75 (0.112)	0.37 (0.471)	0.18 (0.885)	1.95 (0.471)	0.93 (0.665)	-0.45 (0.665)	1.50 (0.194)	3.14 (0.247)	1.41 (0.665)	2.43 (0.194)
406142	hymenoptaecin	-1.77 (0.323)	-7.20 (0.008)	-2.22 (0.286)	-3.87 (0.037)	-0.91 (0.607)	-3.63 (0.187)	-0.90 (0.600)	-5.15 (0.133)	-2.53 (0.184)	-6.37 (0.023)
100578995	vanin-like protein 1-like (1)	-0.81 (0.196)	-1.84 (0.729)	-0.31 (0.625)	1.22 (0.343)	-0.16 (0.867)	0.83 (0.477)	-0.84 (0.256)	-2.37 (0.369)	-0.40 (0.662)	-1.64 (0.920)
724312	vanin-like protein 1-like (2)	0.04 (0.665)	-4.64 (0.110)	0.06 (0.885)	-3.63 (0.029)	0.04 (0.885)	-3.72 (0.029)	-0.46 (0.471)	-4.87 (0.100)	-0.11 (0.885)	-5.24 (0.029)
494523	glutathione peroxidase-like 1	0.18 (0.471)	-1.24 (0.885)	-0.11 (0.665)	-0.51 (0.312)	0.13 (0.471)	-0.89 (0.817)	-0.11 (0.471)	-1.75 (0.105)	0.69 (0.665)	-1.48 (0.721)
726269	glutathione peroxidase-like 2	-0.30 (0.381)	-2.14 (0.305)	-0.13 (0.720)	-1.85 (0.224)	0.04 (0.916)	-1.50 (0.264)	-0.04 (0.884)	-1.09 (0.554)	-0.31 (0.488)	-3.33 (0.136)
551044	glucose dehydrogenase 2	-1.29 (0.061)	0.31 (0.194)	-0.39 (0.471)	1.00 (0.194)	-0.93 (0.194)	-0.22 (0.665)	-2.27 (0.030)	-0.30 (0.817)	-1.07 (0.112)	-0.29 (0.112)
413247	carboxylesterase clade I, member 1	0.17 (0.885)	-1.65 (0.884)	-0.19 (1)	-0.21 (0.309)	0.27 (0.561)	-1.12 (0.885)	-0.10 (0.772)	-1.70 (0.481)	0.00 (0.885)	-1.63 (0.468)
726134	carboxylesterase	-0.07 (0.784)	-3.07 (0.213)	-0.38 (0.174)	-1.22 (0.589)	0.11 (0.582)	-1.53 (0.344)	-0.29 (0.200)	-3.36 (0.066)	-0.37 (0.438)	-3.34 (0.163)
406122	actin related protein 1	-0.07 (0.885)	-2.15 (0.665)	-0.17 (0.885)	-0.92 (0.885)	-0.69 (0.312)	-1.82 (0.665)	-0.72 (0.471)	-3.31 (0.105)	-0.38 (0.471)	-3.84 (0.312)

The transcript levels of the 24 selected genes were determined from pools of four midguts collected at days 7 and 11 after treatment initiation. Six and eight genes were significantly differentially expressed in at least one experimental group compared to control in samples collected at days 7 and 11 respectively (Table 2).

Four genes thought to be involved in immunity were downregulated in response to several treatments. The gene encoding the serine protease 40 (Gene ID 409626) was downregulated at day 7 in honeybees infected by *N. ceranae*, whatever they were exposed to one insecticide or not, and at day 11 in individuals exposed to the combination *N. ceranae*-imidacloprid. The lysozyme 1 encoding gene (Gene ID 725110) was downregulated at day 11 in honeybees exposed to *N. ceranae* and fipronil, applied alone or in combination, and in honeybees exposed to imidacloprid alone. The expression of the antimicrobial peptide hymenoptaecin encoding gene (Gene ID 406142) was significantly inhibited at day 11 in response to *N. ceranae* or fipronil, but not to the *N. ceranae*-fipronil combination. In contrast, it was significantly lower in response to the *N. ceranae*-imidacloprid treatment at the same day. At last, honeybees exposed to the *N. ceranae*-fipronil combination showed a decrease in the expression of the gene encoding the glucose dehydrogenase 2 (Gene ID 551044) at day 7.

Other functional groups seemed affected by the applied treatments. Eleven days after the experiment initiation, honeybees infected by *N. ceranae* showed a strong decrease in the expression of the gene encoding a catalase (Gene ID 443552), an enzyme which might be implicated in antioxidant reactions and in xenobiotic detoxification. Two genes related to carbohydrates metabolism were significantly downregulated in our experiment: the trehalase encoding gene (Gene ID 410484) in response to *N. ceranae* at day 7 and to *N. ceranae*-fipronil combination at days 7 and 11, and the GMC oxidoreductase 3 encoding gene (Gene ID 410747) in response to all treatments but imidacloprid alone at day 7 and to *N. ceranae*-imidacloprid combination at day 11. The expression of the transcription factor Lim3 homeobox (Gene ID 410658) was significantly downregulated at day 7 in all experimental groups compared to control, and at day 11 in honeybees infected by *N. ceranae*, whether they were exposed to insecticides or not. Honeybees exposed to fipronil or imidacloprid or *N. ceranae*-imidacloprid showed a significant decrease in the expression of a gene encoding a vanin 1-like protein (Gene ID 724312). Vanin is an enzyme with pantetheinase activity that is suspected to have antiparasitic properties against *Plasmodium* in mice [47]. Finally, the only gene overexpressed in our experiment was the chitinase 5 encoding gene (Gene ID 551600) whose expression was significantly increased at day 7 in honeybees infected by *N. ceranae*.

Quantitative RT-PCR and RNA-Seq correlation

Gene expression profiles collected at day 7 from experimental groups exposed to no treatment, *N. ceranae* and fipronil, applied alone or in combination, were compared to RNA-Seq data (Figure S3). A strong correlation was found between Exp. 1 and Exp. 2 as shown by the Spearman rho correlation coefficient of 0.84 ($p = 1.42 \times 10^{-25}$). Among the six genes showing differential expression in RNA-Seq data and chosen for qPCR analysis, four showed significant similar expression changes in Exp. 2. More precisely, honeybees treated with *N. ceranae* alone or with the *N. ceranae*-fipronil combination showed in both experiments a higher expression of the chitinase 5 encoding gene (Gene ID 551600) and a lower expression of the SP 40 (Gene ID 409626) and Lim3 homeobox (Gene ID 410658) encoding genes. The latter was also repressed by fipronil in the two experiments. Similarly, a significant decrease in the expression of the trehalase encoding gene (Gene ID 410484) was observed in response to the *N. ceranae*-fipronil combination in both experiments. Overall, the similar survival and gene expression profiles obtained from the two distinct experiments, using different analytical methods (RNA-Seq and qPCR) and different fipronil concentrations (1.3 and 2 $\mu\text{g/L}$), showed that the stresses applied induced a reproducible response.

Discussion

Newly emerged honeybees were exposed to *N. ceranae*-infection or chronic exposure to insecticides (fipronil or imidacloprid) or a combination of both parasite and insecticide. It is noteworthy that the provided fipronil and imidacloprid concentrations in our study lie within the range detected in contaminated pollen and nectar stored inside hives [18,20,21,48,49].

Different impacts of fipronil and *N. ceranae* treatments on honeybee survival were observed in this study compared to previous surveys. Parasite infection had a more severe impact on honeybee survival compared to our previous study where the infection of newly emerged honeybees resulted in a mortality of 39 % of individuals 22 days post infection (dpi) [39]. This higher impact was particularly evident in Exp. 2, where the mortality reached a maximum of 51 % of honeybees only 12 dpi (Fig. S2). Moreover, we observed a significant impact on honeybee survival in groups exposed to fipronil concentrations of 1.3 $\mu\text{g/L}$ (Exp. 1) or 2 $\mu\text{g/L}$ (Exp. 2) (Fig. 1 and S2). Therefore the insecticide doses received by honeybees were not sublethal, in contrast to previous studies performed with a comparable chronic exposure to fipronil (1 $\mu\text{g/L}$) [38,39]. No synergy between *N. ceranae* and fipronil treatments has been observed in the present work while they led to a synergistic effect on honeybee mortality in previous studies [38,39]. The absence of synergy could be linked to the already high impact of individual treatments, that could have prevented further potentiation, and all these effects could be due to life-history traits of the sampled honeybee colonies such as resources, other

contaminants and pathogens that might have an impact on the honeybee lifespan. Indeed, a contamination by *Varroa destructor* virus sequences was detected in RNA-Seq data and two others viruses, the black queen cell virus and the deformed-wing virus, were also detected by RT-PCR in RNA samples extracted from Exp. 2 (data not shown). The unexpected presence of viruses in honeybees during experiments might be more common than thought as another study has also reported a RNA sample contamination by viruses [50].

Compared to fipronil, exposure to imidacloprid (2 µg/L) did not lead to a significant increase in individual mortality implying that doses absorbed by honeybees could be considered as sublethal (Fig. S2). The *N. ceranae*-imidacloprid combination did not lead to a synergistic effect on honeybee mortality. This result is in accordance with the data from Alaux *et al.*, (2010) [37], where a synergy between *Nosema* parasites and imidacloprid occurred only with a high insecticide concentration (70 µg/L), but not with 0.7 or 7 µg/L of imidacloprid.

Honeybee midgut response to parasitism and exposure to insecticide was analysed in two independent experiments using RNA-Seq and qRT-PCR for Exp. 1 and 2 respectively. Overall, a strong correlation was found between gene expression changes between both experiments (Fig. S3) showing that the midgut transcriptional response to treatments was reproducible. A strong effect of honeybee ageing on gene expression profiles was suspected from the principal component analysis performed on RNA-Seq data (Fig. 2). This analysis also suggested that parasite and insecticide treatments had a very low impact on global gene expression one day after experiment initiation while they influenced it at day 7. Moreover, a higher number of genes showed expression changes by qRT-PCR at day 11 compared to day 7 suggesting that parasite and insecticide have a growing impact on gene expression with time. Overall, early gene expression changes might reflect honeybee response to a moderate disruption of midgut homeostasis induced by parasite and/or insecticide treatments. On the next days, the amplification regarding gene expression changes might reflect the honeybees' inability to recover from this disruption, resulting in a growing imbalance that may lead to premature death.

A significant downregulation of several genes potentially involved in immune response was detected in *N. ceranae*-infected honeybees at 7 or 11 dpi. Those included the genes encoding the serine proteases SP22 and SP40, glucose dehydrogenase 2, lysozyme 1, hymenoptaecin and GMC oxidoreductase 3 (Tables 1 and 2). In addition to their function in the digestion of food, serine proteases in insects participate in regulatory cascade reactions linked to immune responses resulting in rapid activation of the Toll and prophenoloxidase pathways [51]. Antimicrobial peptides such as hymenoptaecin are key elements of the insect innate immunity against bacteria and fungi [52]. Hymenoptaecin was the only antimicrobial peptide significantly affected under *N. ceranae*-infection in our study while abaecin, apidaecin and defensin encoding genes were also downregulated in other

studies [8,9]. Glucose dehydrogenases are components of the humoral immune response associated with melanised encapsulation [53] and have already been shown to be repressed in response to *N. ceranae* [8]. A recent survey revealed a possible implication of GMC oxidoreductases in insect immunity. Related genes are upregulated in silkworm in response to four different pathogens and the knockdown of these genes affects the survival rate of infected individuals [54]. Additional genes were shown to be downregulated in *N. ceranae*-infected midguts in previous studies, but not significantly in the present one, such as the *basket* and *u-shaped* genes whose orthologs in *Drosophila melanogaster* are related to immunity [10]. Altogether these data suggest an impairment of the honeybee immune defense in response to *N. ceranae* infection that may favour the parasite development.

Pesticides might also act on insects' immune system [22,55] and fungicides and acaricides have been shown to downregulate immune-related genes in honeybees [55–57]. In our study, the hymenoptaecin and lysozyme 1 transcript levels were significantly lower following the chronic exposure to fipronil alone and to fipronil and imidacloprid respectively (Table 2). Therefore phenylpyrazole and neonicotinoid insecticides might also alter the honeybee immune response.

A significant overexpression of a chitinase-encoding gene was detected in honeybees exposed to *N. ceranae*, alone or in combination with an insecticide, and two cuticular proteins encoding genes were activated in honeybees exposed to parasite-insecticide treatments. For the first time data suggest that cuticle coatings, which constitute important barrier defense in insects, might undergo significant modifications in response to a parasite infection. One should also consider that the peritrophic membrane surrounding the food bolus and protecting epithelial cells is composed of chitin [58], therefore infection by *N. ceranae* might lead to an alteration of the peritrophic membrane.

In insect midgut, a localized immune response can be implemented by the production of reactive oxygen species (ROS) which are toxic to pathogens [59,60]. As ROS can also have cytotoxic effects on host tissues, a balance between the generation and elimination of ROS must be maintained [60]. Antioxidant reactions involve enzymes such as glutathione peroxidases, catalases and glutathione-S-transferases, which are also implicated in xenobiotic detoxification and particularly in pesticide metabolism. In our study, the expression of one of the honeybee catalase encoding genes was significantly reduced in midgut 11 days following *N. ceranae* infection (Table 2). In contrast, in *N. ceranae*-infected honeybees at 7 dpi, Dussaubat *et al.*, (2012) [10] observed the overexpression of genes encoding a catalase (whether it is the same gene or not is unclear), a glutathione peroxidase-like 2 as well as two cytochrome P450 monooxygenases (CYP/P450s). As the honeybee genome carries several homologs of these genes, the impact of *N. ceranae* infection on antioxidant and detoxification processes appears unclear although there seems to be a transcriptional reorganization between these genes. The measure of enzyme activities in *N. ceranae*-infected midguts

suggests that such gene expression rearrangement would lead to a decrease in glutathione peroxidase and an increase in glutathione-S-transferase activities [10,38].

In our study, neither insecticide nor parasite-insecticide treatments led to significant changes in the expression of genes related to detoxification. On the contrary, a significant overexpression of 9 genes encoding CYP/P450s was detected in honeybee larvae orally exposed to imidacloprid (2 µg/L) for 15 days [61]. In insects, CYP/P450s are involved in the resistance to insecticides [62–66]. Modifications of detoxifying enzymes' activity were also observed in honeybees after an acute and topical exposure to sublethal doses of the neonicotinoid thiamethoxam [67]. The low expression changes of these genes, that did not pass the statistical screening test in the present work, could be linked to the high mortality observed in honeybees exposed to fipronil.

Modifications of the expression of several genes related to trehalose metabolism were observed in our study. A trehalase-encoding gene was highly downregulated in *N. ceranae*-infected honeybees at 7 or 11 dpi (Tables 1 and 2), as expected from previous data [10]. This gene and two facilitated trehalose transporter encoding genes were also downregulated in honeybees exposed to the *N. ceranae*-fipronil combination. The trehalase enzyme hydrolyses trehalose to generate glucose which can be later catabolised through glycolysis or the pentose phosphate pathway [68]. In the haemolymph of *N. ceranae*-infected foragers, the trehalose amount has been shown to be lower compared to uninfected individuals while glucose amount remained stable, suggesting that parasitism increased honeybee energetic demand [12]. Trehalases are also involved in various other physiological processes in insects such as regulation of chitin biosynthesis, flight metabolism or cold tolerance [69,70]. Regulation of the trehalase gene may thus be linked to a complex metabolic response but it would need confirmation through trehalase activity monitoring.

Several genes encoding transcription factors were significantly downregulated in response to parasite and/or insecticide treatment (Tables 1 and 2), including three homeobox-containing proteins (namely the homeodomain interacting protein kinase, Lim3 homeobox and homeobox protein Nkx-2.5-like), referred to as Hox proteins. Another Hox gene, encoding an ortholog of the *D. melanogaster* pituitary homeobox homolog 1 was also found significantly downregulated in the midgut of honeybees infected by *N. ceranae* for 7 days [10]. Hox proteins are transcription factors that regulate the expression of genes involved in growth and differentiation during the developmental processes of animals, from flies to mammals [71]. Hox proteins may also play a role in the innate immune response as modulators of NF-κB-dependent transcription and as mediators of phagocytosis of apoptotic cells [72,73]. One other transcription factor (annotated as POU domain, class 2, transcription factor 3-like) was significantly repressed in response to fipronil. POU domain-containing transcription factors, referred to as POU proteins, perform varying functions as regulators of house-keeping genes or as developmental coordinators [74]. In *Drosophila*, POU proteins were shown to control, together with

other regulators, the constitutive expression of antimicrobial peptide genes, thus promoting a first-line defense against infection [75]. The pleiotropic effect of Hox and POU transcription factors renders very difficult any interpretation upon their regulation, as it could be linked either to a host response to the stressors (*e.g.* protection, compensation for damages, prevention of parasite development) or, in the case of infection, to a host manipulation by the parasite.

Conclusion

Our result showed that *N. ceranae*-fipronil and *N. ceranae*-imidacloprid combinations do not systematically lead to a synergistic effect on honeybee mortality. Such variability in impact on mortality could be due to additional unexpected stressors related to life-history traits of the sampled honeybee colonies. Gene expression profiles in honeybee midgut showed that insecticide treatments had no impact on detoxifying genes but led to a significant downregulation of immunity-related genes suggesting a possible immunotoxicity of neonicotinoid and phenylpyrazole insecticides under chronic exposure. Honeybees treated with *N. ceranae*, alone or in combination with an insecticide, showed a strong alteration of midgut immunity visible from 7 dpi together with significant modifications affecting cuticle coatings and trehalose metabolism. The increasing impact of the treatments with time suggests a growing imbalance of the honeybee transcriptome that would reflect an absence of stress recovery and could explain the observed higher mortality rates.

References

1. Oldroyd BP (2007) What's killing American honey bees? PLoS Biol 5: e168.
2. Potts SG, Biesmeijer JC, Kremen C, Neumann P, Schweiger O, et al. (2010) Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. Trends Ecol Evol 25: 345–353.
3. vanEngelsdorp D, Meixner MD (2010) A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. J Invertebr Pathol 103 Suppl 1: S80–95.
4. vanEngelsdorp D, Speybroeck N, Evans JD, Nguyen BK, Mullin C, et al. (2010) Weighing risk factors associated with bee colony collapse disorder by classification and regression tree analysis. J Econ Entomol 103: 1517–1523.
5. Higes M, Meana A, Bartolomé C, Botías C, Martín-Hernández R (2013) *Nosema ceranae* (Microsporidia), a controversial 21st century honey bee pathogen. Environ Microbiol Reports 5: 17–29.
6. Klee J, Besana AM, Genersch E, Gisder S, Nanetti A, et al. (2007) Widespread dispersal of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of the western honey bee, *Apis mellifera*. J Invertebr Pathol 96: 1–10.

7. Botías C, Martín-Hernández R, Garrido-Bailón E, González-Porto A, Martínez-Salvador A, et al. (2012) The growing prevalence of *Nosema ceranae* in honey bees in Spain, an emerging problem for the last decade. *Res Vet Sci* 93: 150–155.
8. Antúnez K, Martín-Hernández R, Prieto L, Meana A, Zunino P, et al. (2009) Immune suppression in the honey bee (*Apis mellifera*) following infection by *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Environ Microbiol* 11: 2284–2290.
9. Chaimanee V, Chantawannakul P, Chen Y, Evans JD, Pettis JS (2012) Differential expression of immune genes of adult honey bee (*Apis mellifera*) after inoculated by *Nosema ceranae*. *J Insect Physiol* 58: 1090–1095.
10. Dussaubat C, Brunet J-L, Higes M, Colbourne JK, Lopez J, et al. (2012) Gut pathology and responses to the microsporidium *Nosema ceranae* in the honey bee *Apis mellifera*. *PLoS ONE* 7: e37017.
11. Mayack C, Naug D (2009) Energetic stress in the honeybee *Apis mellifera* from *Nosema ceranae* infection. *J Invertebr Pathol* 100: 185–188.
12. Mayack C, Naug D (2010) Parasitic infection leads to decline in hemolymph sugar levels in honeybee foragers. *J Insect Physiol* 56: 1572–1575.
13. Aliferis KA, Copley T, Jabaji S (2012) Gas chromatography-mass spectrometry metabolite profiling of worker honey bee (*Apis mellifera* L.) hemolymph for the study of *Nosema ceranae* infection. *J Insect Physiol* 58: 1349–1359.
14. García-Palencia P, Martín-Hernández R, González-Porto A, Marin P, Meana A, et al. (2010) Natural infection by *Nosema ceranae* causes similar lesions as in experimentally infected caged-workers honey bees (*Apis mellifera*). *J Apic Res* 49: 278–283.
15. Higes M, Martín-Hernández R, Botías C, Bailón EG, González-Porto AV, et al. (2008) How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Environ Microbiol* 10: 2659–2669.
16. Dussaubat C, Sagastume S, Gómez-Moracho T, Botías C, García-Palencia P, et al. (2013) Comparative study of *Nosema ceranae* (Microsporidia) isolates from two different geographic origins. *Vet Microbiol* 162: 670–678.
17. Johnson RM, Ellis MD, Mullin CA, Frazier M (2010) Pesticides and honey bee toxicity – USA. *Apidologie* 41: 312–331.
18. Mullin CA, Frazier M, Frazier JL, Ashcraft S, Simonds R, et al. (2010) High levels of miticides and agrochemicals in North American apiaries: implications for honey bee health. *PLoS ONE* 5: e9754.
19. Chauzat M-P, Carpentier P, Martel A-C, Bougeard S, Cougoule N, et al. (2009) Influence of pesticide residues on honey bee (Hymenoptera: Apidae) colony health in France. *Environ Entomol* 38: 514–523.
20. Chauzat M-P, Faucon J-P, Martel A-C, Lachaize J, Cougoule N, et al. (2006) A survey of pesticides residues in pollen loads collected by honey bees in France. *J Econ Entomol* 99: 253–262.
21. Lambert O, Piroux M, Puyo S, Thorin C, L’hostis M, et al. (2013) Widespread occurrence of chemical residues in beehive matrices from apiaries located in different landscapes of Western France. *PLoS ONE* 8: e67007.
22. Desneux N, Decourtye A, Delpuech J-M (2007) The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annu Rev Entomol* 52: 81–106.

23. Belzunces LP, Tchamitchian S, Brunet J-L (2012) Neural effects of insecticides in the honey bee. *Apidologie* 43: 348–370.
24. Decourtye A, Armengaud C, Renou M, Devillers J, Cluzeau S, et al. (2004) Imidacloprid impairs memory and brain metabolism in the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Pestic Biochem Physiol* 78: 83–92.
25. El Hassani AK, Dacher M, Gauthier M, Armengaud C (2005) Effects of sublethal doses of fipronil on the behavior of the honeybee (*Apis mellifera*). *Pharmacol Biochem Behav* 82: 30–39.
26. Bernadou A, Démares F, Couret-Fauvel T, Sandoz JC, Gauthier M (2009) Effect of fipronil on side-specific antennal tactile learning in the honeybee. *J Insect Physiol* 55: 1099–1106.
27. Colin ME, Bonmatin JM, Moineau I, Gaimon C, Brun S, et al. (2004) A method to quantify and analyze the foraging activity of honey bees: relevance to the sublethal effects induced by systemic insecticides. *Arch Environ Contam Toxicol* 47: 387–395.
28. Decourtye A, Devillers J, Cluzeau S, Charreton M, Pham-Delègue M-H (2004) Effects of imidacloprid and deltamethrin on associative learning in honeybees under semi-field and laboratory conditions. *Ecotoxicol Environ Saf* 57: 410–419.
29. Decourtye A, Lefort S, Devillers J, Gauthier M, Aupinel P, et al. (2009) Sublethal effects of fipronil on the ability of honeybees (*Apis mellifera* L.) to orientate on a complex maze. *Hazards of pesticides to bees - 10th International Symposium of the ICP-Bee Protection Group*.
30. Decourtye A, Devillers J, Aupinel P, Brun F, Bagnis C, et al. (2011) Honeybee tracking with microchips: a new methodology to measure the effects of pesticides. *Ecotoxicology* 20: 429–437.
31. Schneider CW, Tautz J, Grünewald B, Fuchs S (2012) RFID tracking of sublethal effects of two neonicotinoid insecticides on the foraging behavior of *Apis mellifera*. *PLoS ONE* 7: e30023.
32. Suchail S, Guez D, Belzunces LP (2001) Discrepancy between acute and chronic toxicity induced by imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera*. *Environ Toxicol Chem* 20: 2482–2486.
33. Decourtye A, Devillers J, Genecque E, Le Menach K, Budzinski H, et al. (2005) Comparative sublethal toxicity of nine pesticides on olfactory learning performances of the honeybee *Apis mellifera*. *Arch Environ Contam Toxicol* 48: 242–250.
34. Aliouane Y, El Hassani AK, Gary V, Armengaud C, Lambin M, et al. (2009) Subchronic exposure of honeybees to sublethal doses of pesticides: effects on behavior. *Environ Toxicol Chem* 28: 113–122.
35. Holmstrup M, Bindsøbol A-M, Oostingh GJ, Duschl A, Scheil V, et al. (2010) Interactions between effects of environmental chemicals and natural stressors: a review. *Sci Total Environ* 408: 3746–3762.
36. González-Varo JP, Biesmeijer JC, Bommarco R, Potts SG, Schweiger O, et al. (2013) Combined effects of global change pressures on animal-mediated pollination. *Trends Ecol Evol* 28: 524–530.
37. Alaux C, Brunet J-L, Dussaubat C, Mondet F, Tchamitchan S, et al. (2010) Interactions between *Nosema* microspores and a neonicotinoid weaken honeybees (*Apis mellifera*). *Environ Microbiol* 12: 774–782.
38. Vidau C, Diogon M, Aufauvre J, Fontbonne R, Viguès B, et al. (2011) Exposure to sublethal doses of fipronil and thiacloprid highly increases mortality of honeybees previously infected by *Nosema ceranae*. *PLoS ONE* 6: e21550.
39. Aufauvre J, Biron DG, Vidau C, Fontbonne R, Roudel M, et al. (2012) Parasite-insecticide interactions: a case study of *Nosema ceranae* and fipronil synergy on honeybee. *Sci Reports* 2: 326.

40. Lemaitre B, Hoffmann J (2007) The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu Rev Immunol* 25: 697–743.
41. Hao Z, Kasumba I, Aksoy S (2003) Proventriculus (cardia) plays a crucial role in immunity in tsetse fly (Diptera: Glossinidae). *Insect Biochem Mol Biol* 33: 1155–1164.
42. Pauchet Y, Freitak D, Heidel-Fischer HM, Heckel DG, Vogel H (2009) Immunity or digestion: glucanase activity in a glucan-binding protein family from Lepidoptera. *J Biol Chem* 284: 2214–2224.
43. Martín-Hernández R, Meana A, Prieto L, Salvador AM, Garrido-Bailón E, et al. (2007) Outcome of colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*. *Appl Environ Microbiol* 73: 6331–6338.
44. Anders S, Huber W (2010) Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol* 11: R106.
45. Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD (2001) PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontol Electron* 4: 1–9.
46. Kievits J, Bruneau E (2007) Neurotoxiques systémiques, un risque pour les abeilles ? *Abeilles Cie* 118: 12–17.
47. Min-Oo G, Ayi K, Bongfen SE, Tam M, Radovanovic I, et al. (2010) Cysteamine, the natural metabolite of pantetheinase, shows specific activity against *Plasmodium*. *Exp Parasitol* 125: 315–324.
48. Bernal J, Garrido-Bailón E, Del Nozal MJ, González-Porto AV, Martín-Hernández R, et al. (2010) Overview of pesticide residues in stored pollen and their potential effect on bee colony (*Apis mellifera*) losses in Spain. *J Econ Entomol* 103: 1964–1971.
49. Pareja L, Colazzo M, Pérez-Parada A, Niell S, Carrasco-Letelier L, et al. (2011) Detection of pesticides in active and depopulated beehives in Uruguay. *Int J Environ Res Public Health* 8: 3844–3858.
50. McDonnell CM, Alaux C, Parrinello H, Desvignes J-P, Crauser D, et al. (2013) Ecto- and endoparasite induce similar chemical and brain neurogenomic responses in the honey bee (*Apis mellifera*). *BMC Ecol* 13: 25.
51. Kanost MR, Clarke TE (2005) Proteases. *Comprehensive Molecular Insect Science*. Amsterdam: Elsevier, Vol. 4. pp. 247–265.
52. Bulet P, Hetru C, Dimarcq J-L, Hoffmann D (1999) Antimicrobial peptides in insects: structure and function. *Dev Comp Immunol* 23: 329–344.
53. Lovallo N, Cox-Foster DL (1999) Alteration in FAD-glucose dehydrogenase activity and hemocyte behavior contribute to initial disruption of *Manduca sexta* immune response to *Cotesia congregata* parasitoids. *J Insect Physiol* 45: 1037–1048.
54. Sun W, Shen Y-H, Yang W-J, Cao Y-F, Xiang Z-H, et al. (2012) Expansion of the silkworm GMC oxidoreductase genes is associated with immunity. *Insect Biochem Mol Biol* 42: 935–945.
55. Garrido PM, Antúnez K, Martín M, Porrini MP, Zunino P, et al. (2013) Immune-related gene expression in nurse honey bees (*Apis mellifera*) exposed to synthetic acaricides. *J Insect Physiol* 59: 113–119.
56. Gregorc A, Evans JD, Scharf M, Ellis JD (2012) Gene expression in honey bee (*Apis mellifera*) larvae exposed to pesticides and *Varroa* mites (*Varroa destructor*). *J Insect Physiol* 58: 1042–1049.
57. Boncristiani H, Underwood R, Schwarz R, Evans JD, Pettis J, et al. (2012) Direct effect of acaricides on pathogen loads and gene expression levels in honey bees *Apis mellifera*. *J Insect Physiol* 58: 613–620.

58. Terra WR (2001) The origin and functions of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. *Arch Insect Biochem Physiol* 47: 47–61.
59. Broderick NA, Welchman DP, Lemaitre B (2009) Recognition and response to microbial infection in *Drosophila*. *Insect infection and immunity*. New York: Oxford University Press. p. 272.
60. Nathan C, Cunningham-Bussell A (2013) Beyond oxidative stress: an immunologist's guide to reactive oxygen species. *Nat Rev Immunol* 13: 349–361.
61. Derecka K, Blythe MJ, Malla S, Genereux DP, Guffanti A, et al. (2013) Transient exposure to low levels of insecticide affects metabolic networks of honeybee larvae. *PLoS ONE* 8: e68191.
62. Mao W, Schuler MA, Berenbaum MR (2011) CYP9Q-mediated detoxification of acaricides in the honey bee (*Apis mellifera*). *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 12657–12662.
63. Chandor-Proust A, Bibby J, Régent-Kloeckner M, Roux J, Guittard-Crilat E, et al. (2013) The central role of mosquito cytochrome P450 CYP6Zs in insecticide detoxification revealed by functional expression and structural modelling. *Biochem J* 455: 75–85.
64. Ding Z, Wen Y, Yang B, Zhang Y, Liu S, et al. (2013) Biochemical mechanisms of imidacloprid resistance in *Nilaparvata lugens*: over-expression of cytochrome P450 CYP6AY1. *Insect Biochem Mol Biol* 43: 1021–1027.
65. Scott JG (1999) Cytochromes P450 and insecticide resistance. *Insect Biochem Mol Biol* 29: 757–777.
66. David J-P, Ismail HM, Chandor-Proust A, Paine MJL (2013) Role of cytochrome P450s in insecticide resistance: impact on the control of mosquito-borne diseases and use of insecticides on Earth. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 368: 20120429.
67. Badiou-Bénéteau A, Carvalho SM, Brunet J-L, Carvalho GA, Buleté A, et al. (2012) Development of biomarkers of exposure to xenobiotics in the honey bee *Apis mellifera*: application to the systemic insecticide thiamethoxam. *Ecotoxicol Environ Saf* 82: 22–31.
68. Becker A, Schlöder P, Steele JE, Wegener G (1996) The regulation of trehalose metabolism in insects. *Experientia* 52: 433–439.
69. Chen J, Tang B, Chen H, Yao Q, Huang X, et al. (2010) Different functions of the insect soluble and membrane-bound trehalase genes in chitin biosynthesis revealed by RNA interference. *PLoS ONE* 5: e10133.
70. Barraza A, Sánchez F (2013) Trehalases: A neglected carbon metabolism regulator? *Plant Signal Behav* 8.
71. Pick L, Heffer A (2012) Hox gene evolution: multiple mechanisms contributing to evolutionary novelties. *Ann N Y Acad Sci* 1256: 15–32.
72. Chung EY, Liu J, Homma Y, Zhang Y, Brendolan A, et al. (2007) Interleukin-10 expression in macrophages during phagocytosis of apoptotic cells is mediated by homeodomain proteins Pbx1 and Prep-1. *Immunity* 27: 952–964.
73. Irazoqui JE, Ng A, Xavier RJ, Ausubel FM (2008) Role for beta-catenin and HOX transcription factors in *Caenorhabditis elegans* and mammalian host epithelial-pathogen interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 17469–17474.

74. Cook AL, Sturm RA (2008) POU domain transcription factors: BRN2 as a regulator of melanocytic growth and tumorigenesis. *Pigment Cell Melanoma Res* 21: 611–626.
75. Junell A, Uvell H, Davis MM, Edlundh-Rose E, Antonsson Å, et al. (2010) The POU transcription factor Drifter/Ventral veinless regulates expression of *Drosophila* immune defense genes. *Mol Cell Biol* 30: 3672–3684.

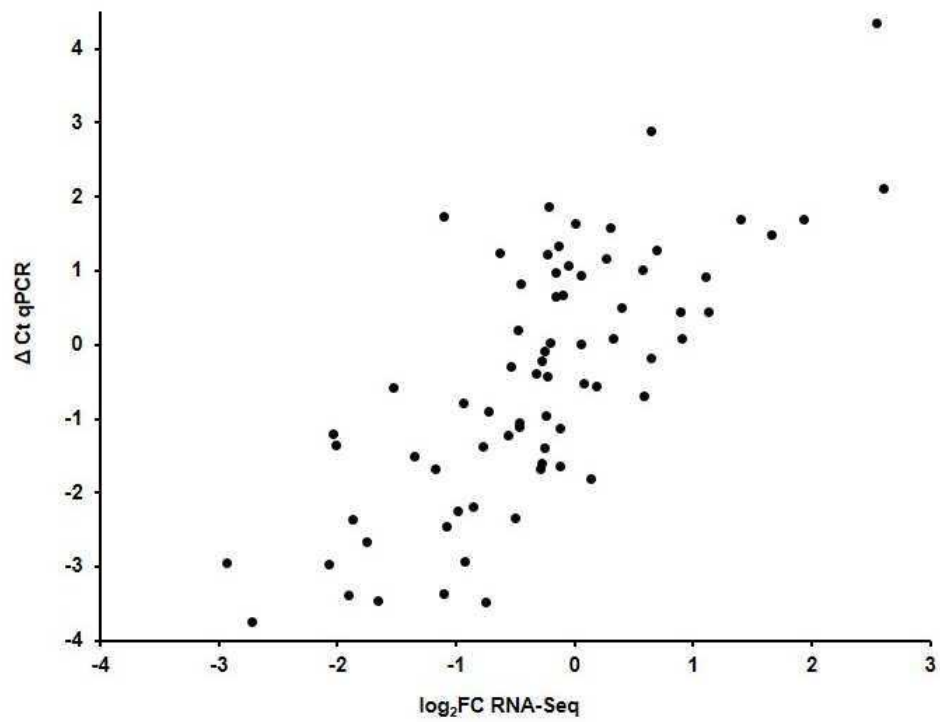


Figure S1. Quantitative RT-PCR validation of RNA-Seq data on a selection of eight genes.

Data show values of differential expression of eight selected genes for the same pairwise comparisons between experimental groups, determined by RNA-Seq and qPCR. The Spearman rho correlation coefficient of 0.722 ($p = 8.0 \times 10^{-13}$) reflects the statistical dependence between both datasets.

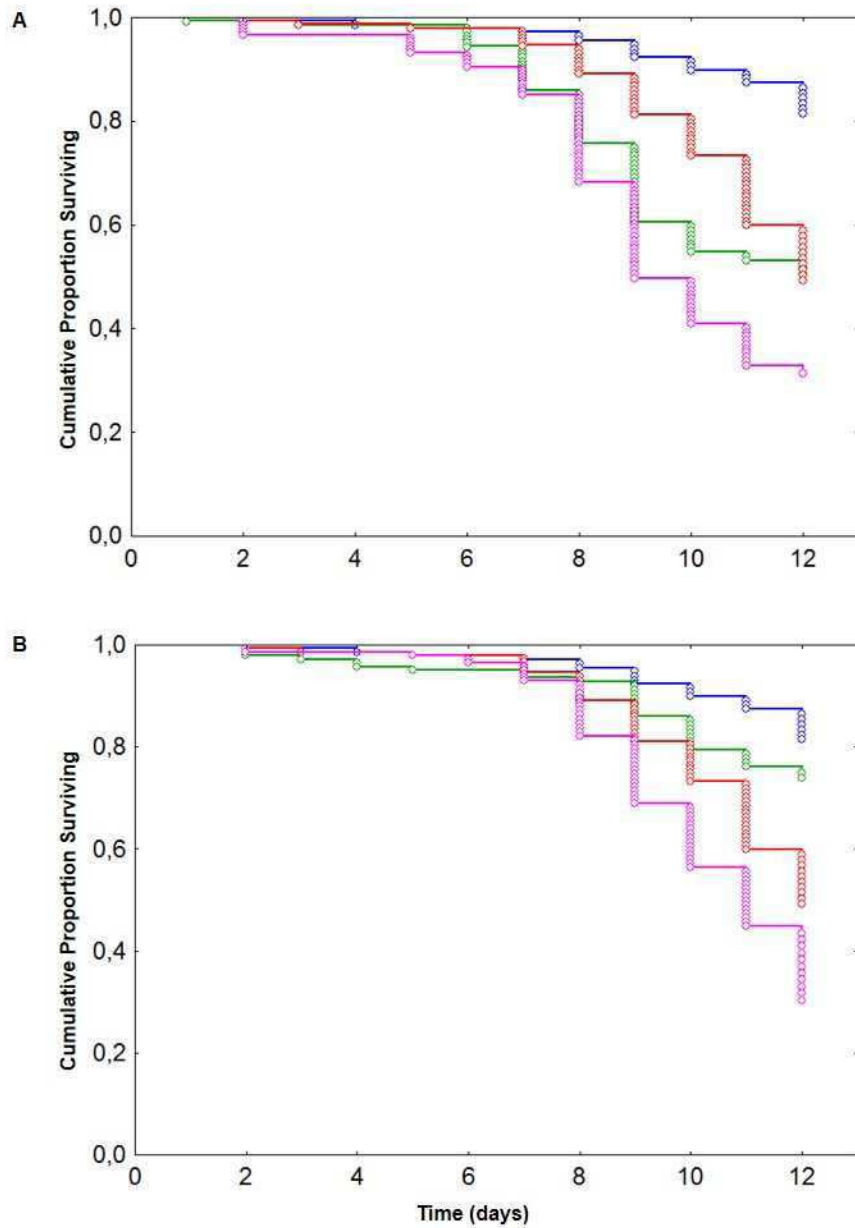


Figure S2. Effect of *N. ceranae* and insecticide, acting alone or in combination, on honeybee survival. Data give the cumulative proportion of surviving honeybees exposed to no treatment (—), *N. ceranae* (—), insecticide (—), or a *N. ceranae*-insecticide combination (—). *N. ceranae*-treated honeybees were individually infected at their emergence (day 0) and insecticide-treated ones were chronically and orally exposed to (A) fipronil (2 µg/L) or (B) imidacloprid (2 µg/L) from day 0 to day 7. Data from 140 honeybees were analysed with the Kaplan-Meier method.

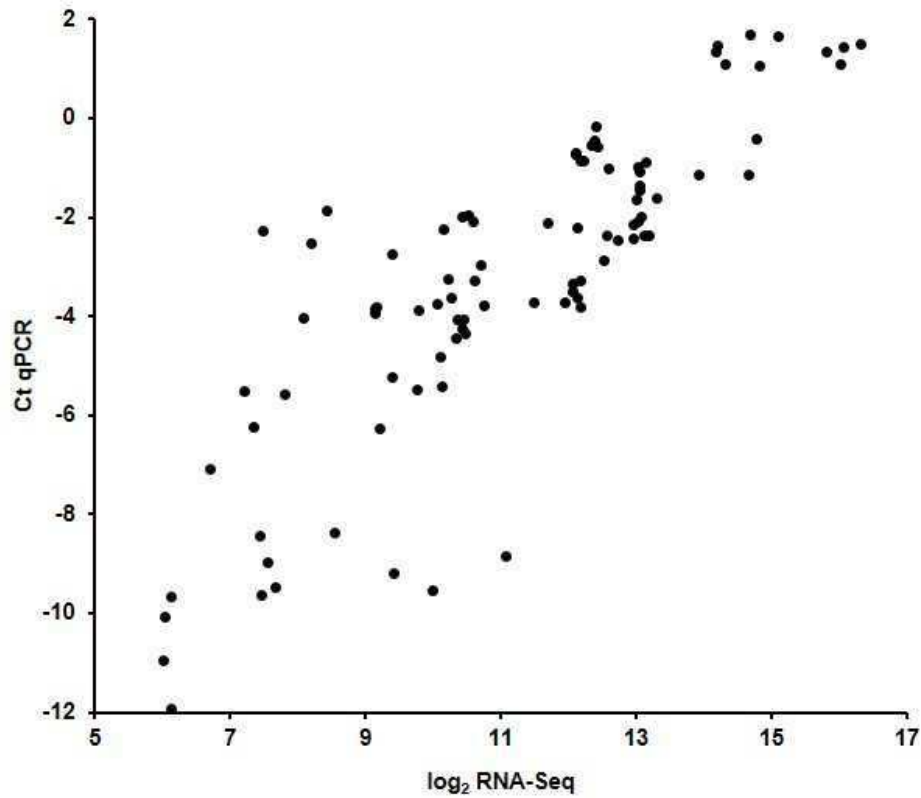


Figure S3. Comparison between transcripts abundance of the same set of 24 genes determined in Exp. 1 (RNA-Seq) and Exp. 2 (qRT-PCR) at day 7.

The log₂ of mean between replicates transcripts counts is given for each gene and each experimental group (*i.e.* control, *N. ceranae*, fipronil, *N. ceranae*-fipronil). Ct determined by qRT-PCR in Exp. 2 was normalized using gene RpS5a as the reference. The Spearman rho correlation coefficient of 0.84 ($p = 1.42 \times 10^{-25}$) reflects the statistical dependence between both datasets.

Table S1. List of primer sequences and conditions used for quantitative RT-PCR analysis in this study.

Nucleotide sequences for both forward (F) and reverse (R) primers are given together with the amplicon size, the primer final concentration and hybridization temperature used for amplification, the linearity and efficiency of the qPCR.

Product	Gene (locus)	Primer sequences	Reference	Size (pb)	Conc. (nM)	T _{hyb} (°C)	Linearity (r ²)	Efficiency (%)
actin related protein 1	406122	β-actin-F : ATGCCAACACTGTCCTTTCTGG β-actin-R : GACCCACCAATCCATACGGA	Yang and Cox-Foster, 2005	151	300	56	0,998	0.90
carboxylesterase	726134	CaE2-F2 : CGACGAGGTAGCAGAGAATCC CaE2-R2 : ATTATGACCGGGACATCGGC	this work	81	300	58	0.998	0.93
carboxylesterase clade I, member 1	413247	CaE1-F : TGTGTCATTGGTCCAGAGCC CaE1-R : ACACCTTGATCCTTGCTCGG	this work	117	300	58	0.999	0.91
catalase (1)	411758	CAT1-F2 : CATTCCAGATGGCGTTGGC CAT1-R2 : TGCACCTCCAGCATCACCAA	this work	80	300	58	0.999	0.98
catalase (2)	443552	CAT2-F : AAGCCAGTTTGACGGTAGGG CAT2-R : AGCATGGACTACACGTTCCG	this work	113	300	58	0.999	0.92
chitinase 5	551600	Endochiti-F : TATCGAAAGGACGTGCGGCAG Endochiti-R : TCACGCCGATGAACGAGTAG	this work	85	300	58	0,998	0.99
defensin 1	406143	Defensin-F1 : TGCGGTGCTAACTGTCTCAG Defensin-R1 : CGTTTCGGTTAAGTCCATT	Evans, 2006	119	400	54	0,999	0.97
endoplasmic-like	412150	HSP90-F : TTCTCCATGTGCTTTGGTTG HSP90-R : TTTTCTGGGGATCATCAGTC	this work	102	300	55	0,999	1.05
glucose dehydrogenase 2	551044	GLD3-F : GAACGAGAAAAAGCCTGTC GLD3-R : CCCAATCGTCGTAATCCTTG	this work	131	300	57	0,997	1.01
glucosinolate sulphatase	551758	GLSS-F2 : ATTGAGAAAAGGAGCCCGTG GLSS-R2 : CTTCAGATCTCCACGACCGC	this work	91	300	58	0.999	1.01
glutathione peroxidase-like 1	494523	Gtpx1-F2 : AGATTCGCGCATCCTTTATGG Gtpx1-R2 : CGTCCACCACTTTGCCTTC	this work	120	300	58	0,999	0.91
glutathione peroxidase-like 2	726269	Gtpx2-F : GGAAGTGGTTGAAGACACAAGC Gtpx2-R : ACAGTTGGTGCAAATCGAGA	this work	115	300	58	0.999	0.92
glutathione S-transferase S1	552304	GSTS1-F : ATTCCTGGTCTTGCCGAACC GSTS1-R : TGGGCCATTCTCGATATCAATTC	this work	91	300	56	0.999	0.94
GMC oxidoreductase 3	410747	GlucDSH-F2 : GATGGTCGCGAAAAAGCAG GlucDSH-R2 : AACAGCCCTCTCATTTCC	this work	96	300	58	0,999	0.94
hydrocephalus-inducing protein-like	100578512	HydIP-F : ATTTGTGCAACGTGGAGAGC HydIP-R : GGCGCCAAGCACAATTCAC	this work	91	300	58	0.998	1.05
hymenoptaecin	406142	Hymenoptaecin-F : CTCTTGTGCGCTTGCCATA Hymenoptaecin-R : GCGTCTCTGTTCATTCCATT	Evans, 2006	200	400	54	0,996	1.05
Lim3 homeobox	410658	Lim3-F : AGAGTCTCAAAACGTCCGGC Lim3-R : GATCCAGAGGGTGCATCTCG	this work	101	300	58	0.998	0.95
lysozyme 1	725110	LYS-F : ACACGGTTGGTCACTGGTCC LYS-R : GTCCCACGCTTTGAATCCCT	Yang and Cox-Foster, 2005	201	300	60	0,998	0.94
POU domain, class 2, transcription factor 3-like	727092	POU-F2 : TCGTGCAAAATCCAAAGCCC POU-R2 : ACCACTCGAAGGACTTCC	this work	87	300	58	0.999	1.02
ribosomal protein S5a	409728	RPS5-F : AATTATTTGGTCGCTGGAATTG RPS5-R : TAACGTCCAGCAGAATGTGGTA	Evans, 2006	115	300	56	0,997	0.86
serine protease 14	725154	SP14-F : CGAAAAACACTACGTGGGGC SP14-R : TGTCTCCTTGACAAGCGTCC	this work	110	300	58	0.997	1.01
serine protease 40	409626	SP40-F : TTTCTCCGTCCTCTTCCA SP40-R : CTAAGTCTGCCCCAGCCAG	this work	82	300	58	0.999	0.97
trehalase	410484	Trehalase-F2 : GTTCGGATGGACTAACGGGG Trehalase-R2 : CGTCTCGTATCCAACCTCC	this work	83	300	58	0,999	1.02
vanin-like protein 1-like (1)	100578995	Vanin1-F2 : ACGTTTGATCTTCATAACAAACCAG Vanin1-R2 : TGGTCATCGAATCATTGAGCAG	this work	109	300	58	0,999	0.96
vanin-like protein 1-like (2)	724312	Vanin2-F2 : CGAAGGAGCGGCTTTAGTC Vanin2-R2 : TCGATGTCGGATGTATGCAG	this work	118	300	56	0,998	0.97

CHAPITRE 4

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Tableau 5. Variabilité de l'impact de *N. ceranae* et du fipronil, appliqués indépendamment selon le même protocole, sur la mortalité des abeilles.

Les valeurs en gras indiquent un impact significatif (χ^2 test) du facteur de stress sur la mortalité des abeilles.

	<i>N. ceranae</i>		Fipronil			
	mortalité (%)	jour	mortalité (%)	jour	conc. testée ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	ratio DL50/quantité de fip. consommé
Aufauvre <i>et al.</i> , 2012	39	22	31	22	1	DL50/42
Aufauvre <i>et al.</i> , <i>in prep.</i> Exp. 1	45	25	37	25	1,3	DL50/30
Aufauvre <i>et al.</i> , <i>in prep.</i> Exp. 2	51	12	51	12	2	DL50/13

1. Surmortalité des abeilles exposées à une combinaison *N. ceranae*-insecticides

Les travaux de cette thèse ont montré que l'infection par *N. ceranae* associée à l'exposition chronique à de faibles concentrations d'insecticides entraîne une surmortalité des abeilles (Vidau *et al.*, 2011a; Aufauvre *et al.*, 2012) (→ **Chapitre 3**). Toutefois, une variabilité dans l'impact de la combinaison *N. ceranae*-insecticide sur la mortalité des abeilles a été observée. Alors que nos premières études ont mis en évidence un effet synergique de cette association sur la mortalité des abeilles (Vidau *et al.*, 2011a; Aufauvre *et al.*, 2012), la synergie n'a plus été observée par la suite (→ **Chapitre 3**). De nombreuses autres expérimentations, non décrites ici, que nous avons réalisées en appliquant les facteurs de stress selon le protocole utilisé précédemment (Aufauvre *et al.*, 2012), ont aussi montré que l'interaction *N. ceranae*-insecticide, bien qu'induisant une surmortalité significative des abeilles, n'induit pas systématiquement un effet synergique au sens strict. Souvent, les taux de mortalité induits par chacun des facteurs de stress pris indépendamment sont trop élevés pour permettre l'observation d'un effet synergique. Les abeilles exposées à *N. ceranae* selon le même protocole présentent ainsi des taux de mortalité très variables allant de 39 % de mortalité à 22 jours post infection (Aufauvre *et al.*, 2012) à 51 % de mortalité après seulement 12 jours d'infection (→ **Chapitre 3**) (Tableau 5). L'exposition orale durant 7 jours à de faibles concentrations de fipronil, comprises entre 1 µg/kg et 2 µg/kg, induit également des taux de mortalité variables allant de 31 % de mortalité 22 jours après le début du traitement (Aufauvre *et al.*, 2012) à 51 % de mortalité après seulement 12 jours (→ **Chapitre 3**). Cet impact variable de l'exposition chronique au fipronil sur la mortalité des abeilles fait que les doses reçues par ces dernières, bien que toujours inférieures à la DL50 de la molécule, doivent être parfois considérées comme létales (→ **Chapitre 3**). Comme l'ont déjà montré de précédentes études (Suchail *et al.*, 2001; Decourtye *et al.*, 2005; Aliouane *et al.*, 2009), ce résultat souligne l'importance d'évaluer la toxicité d'une exposition chronique à de faibles concentrations d'insecticides, telles qu'elles sont observées au sein des colonies d'abeilles. Il est important de noter que les taux de mortalité des abeilles témoins, non exposées à *N. ceranae* ou à l'insecticide, sont également variables en fonction des expérimentations réalisées lors de ce travail de thèse. Lors de l'analyse de l'expression de gènes de l'abeille par qRT-PCR (→ **Chapitre 3, Exp. 2**), le taux de mortalité des abeilles témoins a atteint 19 % 12 jours seulement après le début de l'expérimentation alors qu'il était systématiquement inférieur à 10 % au même moment lors des études précédentes (Vidau *et al.*, 2011a; Aufauvre *et al.*, 2012) (→ **Chapitre 3, Exp. 1**). Cette hétérogénéité observée dans les groupes d'abeilles témoins peut expliquer en partie les résultats variables obtenus pour les groupes d'abeilles exposées à un seul facteur ou à une combinaison des

deux. Une variabilité a également été constatée pour l'impact de *N. ceranae* sur la consommation de son hôte et celui de l'exposition au fipronil sur le succès de développement du parasite.

L'hétérogénéité des résultats obtenus peut être due à de multiples facteurs, notamment à des facteurs techniques inhérents aux protocoles expérimentaux. Pour des raisons pratiques, les abeilles sont couramment anesthésiées par inhalation de CO₂ avant de procéder aux infections individuelles, aux tests comportementaux ou aux prélèvements pour dissection. L'anesthésie au CO₂ a par exemple été utilisée à plusieurs reprises pour réaliser des prélèvements lors de l'analyse du transcriptome de l'abeille (→ **Chapitre 3**). Or, des travaux suggèrent que l'anesthésie au CO₂ pouvait significativement réduire la survie des abeilles au cours d'une expérimentation (Woyciechowski & Moroń, 2009; Milbrath *et al.*, 2013). Une expérimentation conduite très récemment au laboratoire a confirmé l'impact de l'anesthésie au CO₂ sur la longévité des abeilles. Cependant, même en absence d'anesthésie, les abeilles exposées à *N. ceranae* ou au fipronil présentaient encore de forts taux de mortalité à la fin de l'expérimentation et aucun effet synergique n'a été observé.

La variabilité dans les résultats obtenus peut également être liée au matériel biologique, c'est-à-dire à l'abeille *per se*. En effet, les traits historiques et biologiques de la colonie d'origine peuvent avoir une influence importante sur la santé des abeilles qui en sont issues. Des travaux menés au laboratoire ont ainsi montré que le facteur colonie influence significativement la sensibilité des abeilles à l'infection par *N. ceranae* (Fontbonne *et al.*, 2013). Cette variabilité, probablement liée au fond génétique de chaque colonie, semble se traduire par des phénomènes de résistance et/ou tolérance à l'infection par le parasite. Pour s'affranchir de l'impact éventuel du « facteur colonie » sur la sensibilité des abeilles à *N. ceranae*, les abeilles émergentes provenant de différentes colonies d'un même rucher ont été soigneusement mélangées avant distribution en différents groupes expérimentaux. Les expérimentations ont donc été conduites sur des cohortes d'abeilles provenant de différentes colonies d'un même rucher.

Avant leur émergence en laboratoire, les abeilles collectées pour les expérimentations effectuent leur développement au sein de colonies disposées en milieu extérieur ouvert et donc soumises à de multiples facteurs pouvant influencer leur état sanitaire. La qualité des ressources alimentaires stockées dans la colonie, avec lesquelles les larves sont nourries durant leur développement, peut par exemple influencer la sensibilité des abeilles adultes aux infections et aux intoxications. Il a été montré que la qualité nutritionnelle du pollen ainsi que sa diversité florale peuvent en effet modifier la survie des abeilles infectées par *N. ceranae* (Porrini *et al.*, 2011; Di Pasquale *et al.*, 2013). La quantité et la qualité du pollen peuvent également réduire la sensibilité des abeilles adultes à d'autres agents pathogènes, comme certaines bactéries (Rinderer *et al.*, 1974) ou certains virus (DeGrandi-Hoffman *et al.*, 2010), et participer à l'induction d'effecteurs impliqués dans la réponse immunitaire (Alaux *et al.*, 2010b) ou la détoxification (Mao *et al.*, 2011, 2013).

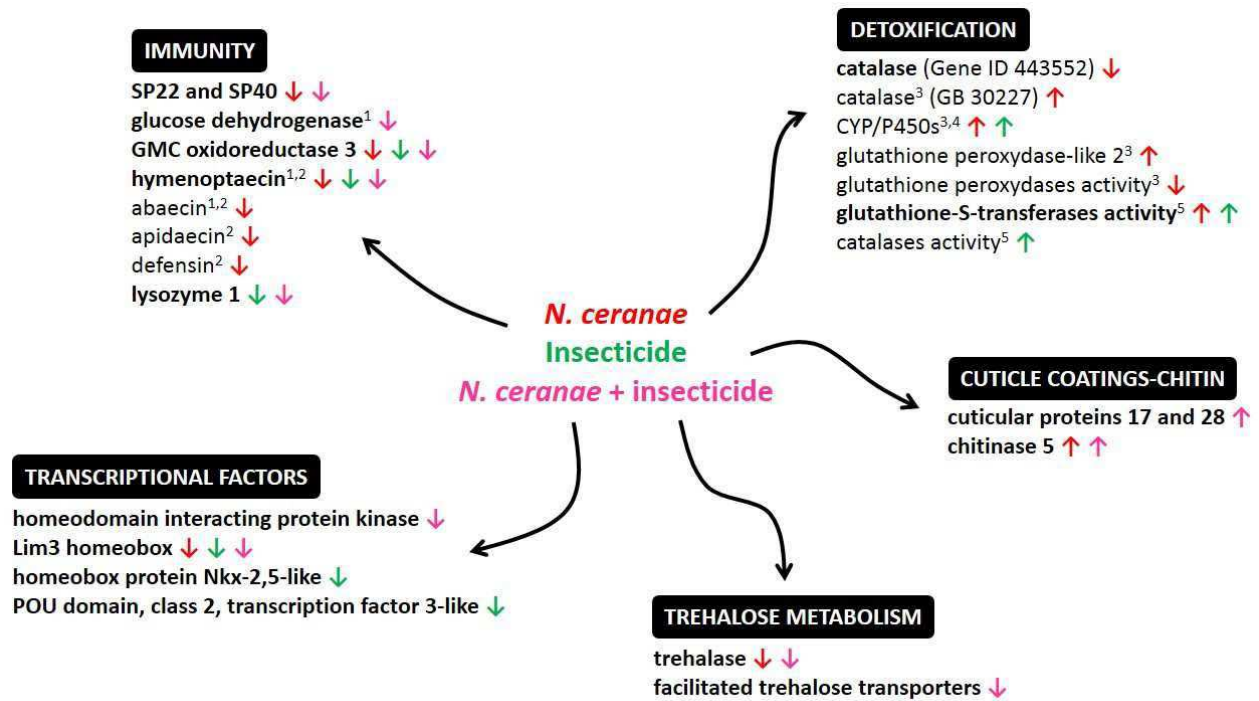


Figure 23. Impact de l'exposition à *N. ceranae* ou à de faibles doses d'insecticides (fipronil ou imidaclopride), appliqués seuls ou en combinaison, sur l'expression des gènes ou l'activité d'enzymes de l'abeille.

Les gènes ou enzymes de l'abeille dont l'expression ou l'activité est significativement augmentée (↑) ou diminuée (↓) en réponse à *N. ceranae* (—), à de faibles doses d'insecticide (—), ou à une combinaison *N. ceranae*-insecticide (—) sont regroupés par groupes fonctionnels. Les résultats issus de ces travaux de thèse sont indiqués en gras et ont été comparés aux données disponibles dans la littérature : ¹Antunez *et al.*, 2009 ; ²Chaimanee *et al.*, 2012 ; ³Dussaubat *et al.*, 2012 ; ⁴Derecka *et al.*, 2013 ; ⁵Badiou-Bénéteau *et al.*, 2012.

Durant leur développement, les larves sont potentiellement exposées à de nombreuses molécules chimiques, présentes dans les différentes matrices de la colonie (→ **Chapitre 1 : 2.2.2.**). Les larves en développement peuvent également être infectées par différents pathogènes, principalement véhiculés par leurs congénères (→ **Chapitre 1 : 1.3.3.**). Au cours de l'analyse du transcriptome de l'abeille par la méthode RNA-Seq (→ **Chapitre 3**), l'identification de trois virus de l'abeille a permis d'avérer la présence d'autres agents pathogènes dans les abeilles expérimentalement exposées à *N. ceranae* ou au fipronil. La présence inopportune de facteurs de stress dans les expérimentations d'abeilles a déjà été rapportée auparavant (McDonnell *et al.*, 2013). Tous ces contaminants et agents pathogènes pourraient avoir une influence sur la santé et la sensibilité de l'abeille adulte et jouer un rôle important dans la variabilité des résultats observée.

Malheureusement, si l'influence de l'environnement de la colonie sur les larves en développement ne semble pas négligeable, il apparaît très difficile de s'affranchir de l'influence des traits de vie de la colonie lors des expérimentations. L'absence de protocole de développement contrôlé de l'abeille, comme cela peut être fait pour la drosophile, en fait un modèle biologique bien moins adapté pour des approches de laboratoire, rendant importantes les approches faites *in situ* dont il sera question plus loin.

2. Réponse de l'abeille à *N. ceranae* et aux insecticides

Dans le cadre de cette thèse, la réponse de l'abeille à *N. ceranae* et aux insecticides, appliqués seuls ou en combinaison, a été évaluée en mesurant l'activité de certaines enzymes d'intérêt (Vidau *et al.*, 2011a) et le niveau de transcription des gènes (→ **Chapitre 3**) (Figure 23). Certains résultats obtenus font écho à des données issues de la littérature. Ainsi, l'infection par *N. ceranae* semble fortement influencer les capacités de défense de l'abeille, en termes d'immunité et de détoxification. L'analyse du transcriptome de l'abeille par RNA-Seq et qRT-PCR a en outre permis d'identifier de nombreux gènes dont l'expression est modifiée en réponse à l'exposition à *N. ceranae* et aux insecticides. Or, la fonction précise de ces gènes est souvent méconnue et le caractère pléiotropique de certains gènes rend l'interprétation des résultats difficile. De nombreuses perspectives à ce travail sont donc envisageables, tout d'abord en se concentrant sur l'intestin de l'abeille, site d'exposition au parasite et à l'insecticide.

Afin de mieux appréhender l'effet de ces facteurs de stress sur l'abeille, il est possible de s'appuyer sur plusieurs méthodes d'analyse complémentaires, telles que proposées dans le projet ANR BEELOSS ("Analyse de la synergie parasite/insecticide dans la perte des colonies d'abeilles à

l'aide d'approches complémentaires chez *Apis mellifera* et l'organisme modèle *Drosophila melanogaster*"- 2013-2017) porté par le LMGE et qui constitue une poursuite de ce travail de thèse. L'étude combinée du transcriptome et du protéome de l'intestin de l'abeille permettrait de confirmer les données obtenues lors de cette étude et de déterminer les modifications moléculaires globales dues aux facteurs de stress. L'activité de certaines enzymes d'intérêt, impliquées par exemple dans l'immunité et la détoxification, n'a été que rarement étudiée chez des abeilles soumises à une combinaison de facteurs. Ce type d'analyse permet d'évaluer l'activité enzymatique résultante d'une expression différentielle de plusieurs gènes codant différentes isoformes, comme la glutathione-S-transférase (Figure 23), et donc de la relier aux données transcriptomiques. En revanche, le rôle précis des effecteurs impliqués dans la réponse de l'abeille, surtout si leur fonction est inconnue, ne pourra être déterminé que par des approches fonctionnelles. Par exemple, la méthode d'ARN interférence (RNAi) permet d'inhiber l'expression d'un gène cible grâce à l'administration de petits ARN non-codants puis de relier le phénotype résultant à la fonction du gène (Scott *et al.*, 2013). Quelques études ont déjà pu montrer que la méthode RNAi était efficace chez *A. mellifera* grâce à une administration par voie orale ou par injection (Hunter *et al.*, 2010; Jarosch & Moritz, 2011; Nunes *et al.*, 2013). L'administration par voie orale permet notamment d'étudier la fonction d'un gène d'intérêt dans le tractus digestif de l'abeille. Grâce à cette méthode, il semble également possible d'inhiber des gènes de *N. ceranae* chez les abeilles infectées dans le but d'identifier la fonction de protéines parasites (Paldi *et al.*, 2010).

L'association *N. ceranae*-insecticide pourrait induire de fortes modifications de l'épithélium intestinal chez l'abeille. Des analyses histologiques ont précédemment mis en évidence une dégénérescence des cellules épithéliales et une dégradation de la membrane péritrophique chez les abeilles parasitées par *N. ceranae* (Higes *et al.*, 2007; García-Palencia *et al.*, 2010; Dussaubat *et al.*, 2012). Une étude récente a également mis en évidence une plus faible induction de l'apoptose dans l'intestin des abeilles infectées par *N. ceranae* comparé aux individus contrôles (Higes *et al.*, 2013a). Cette observation suggère une action inhibitrice de l'infection sur la capacité de l'hôte à induire la mort cellulaire, ce qui pourrait favoriser le développement intracellulaire du parasite. Quelques données obtenues *in vitro* suggèrent que l'insecticide fipronil peut aussi agir sur le métabolisme mitochondrial des cellules et potentiellement induire l'apoptose (Vidau *et al.*, 2009, 2011b). Cependant, aucune donnée n'est disponible à ce jour quant à l'impact de l'association *N. ceranae*-fipronil sur l'épithélium intestinal. Il apparaît donc important d'évaluer précisément l'impact de cette combinaison sur la structure, l'intégrité et la capacité de régénération de l'épithélium intestinal (homéostasie), mais aussi sur l'induction de l'apoptose dans les cellules intestinales. Certains aspects peuvent être appréhendés *in vivo* au travers d'études histologiques et immunocytochimiques. Les approches de culture cellulaire permettraient en outre une évaluation plus aisée de l'impact de ces

facteurs de stress sur les cellules. Or, les lignées cellulaires d'abeilles ne sont actuellement pas maintenues *in vitro* (Genersch *et al.*, 2013). De plus, la mise en culture et le maintien du parasite *N. ceranae* sont très difficiles sur des lignées cellulaires provenant d'autres insectes, une seule étude ayant réussi à ce jour à maintenir le parasite dans des cellules de lépidoptères (Gisder *et al.*, 2011). Le maintien de *N. ceranae* dans des cellules épithéliales d'insectes, notamment d'abeilles, est l'un des objectifs du laboratoire.

L'association *N. ceranae*-insecticide pourrait en outre avoir un impact sur d'autres tissus de l'abeille. Il a été montré que l'infection par *N. ceranae* peut entraîner de fortes modifications transcriptionnelles au niveau du cerveau (McDonnell *et al.*, 2013). L'impact systémique des deux facteurs de stress, seuls ou en combinaison, pourrait également être évalué en analysant le métabolome c'est-à-dire l'ensemble des effecteurs circulants produits par l'abeille en réponse aux stress.

L'ensemble de ces analyses, réalisées au niveau de l'intestin ou au niveau systémique pourrait être effectué à différents temps au cours de l'expérimentation dans le but de déterminer la cinétique de réponse de l'abeille aux facteurs de stress. De plus, l'impact de l'association *N. ceranae*-insecticide doit être évalué chez les autres castes d'abeilles. Les reines et les bourdons sont eux aussi naturellement exposés à une large gamme d'insecticides via les matrices contaminées de la colonie. De plus, l'infection naturelle par *N. ceranae* a été récemment confirmée chez ces deux castes (Traver & Fell, 2011, 2012).

Enfin, ce travail de thèse ouvre d'autres perspectives d'étude à l'échelle cette fois de la colonie. L'ensemble des approches citées ici est réalisé au laboratoire sur des abeilles maintenues en cagettes. Il est primordial d'évaluer l'impact de l'association *N. ceranae*-insecticide à l'échelle de la colonie. Ces études peuvent être réalisées avec des colonies maintenues (études de semi-terrain) ou non (études de terrain) au sein d'un enclos de type tunnel. Or, l'infection expérimentale des abeilles par un agent pathogène comme *N. ceranae* impose de faire le choix d'une étude de semi-terrain afin d'éviter que les abeilles étudiées ne dispersent le parasite dans l'environnement. Pour mettre en place ces études de semi-terrain, il est possible de collecter des abeilles émergentes, de les exposer à *N. ceranae* et à l'insecticide à des doses contrôlées en laboratoire, de les marquer sélectivement en fonction du traitement reçu puis de les replacer au sein de colonies en tunnel. L'utilisation du marquage peut par exemple permettre de suivre la mortalité et les comportements sociaux des abeilles à l'échelle de la colonie en fonction du traitement reçu. Plusieurs colonies peuvent être placées au sein d'un même enclos, de même que des ressources alimentaires naturelles. Au cours de ces études, il est donc possible de suivre de nombreux paramètres comme par exemple la quantité de couvain mâle ou femelle, la production de miel et la récolte de pollen. L'activité de vol des abeilles de la

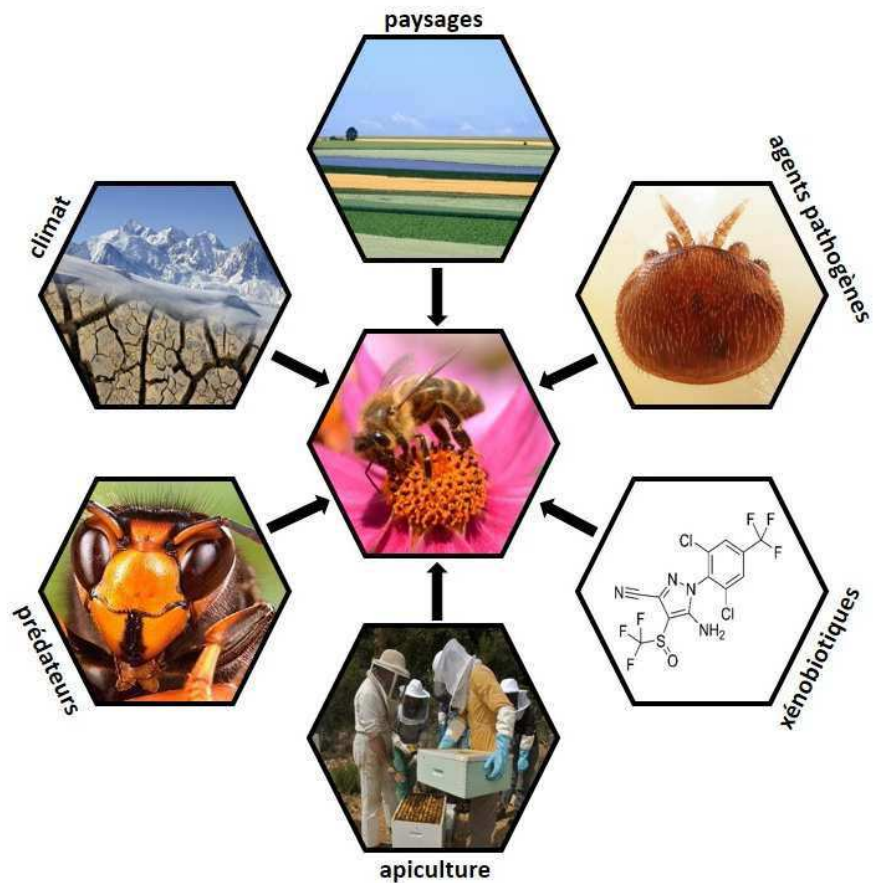


Figure 24. Multiplicité des facteurs pouvant affecter la santé de l'abeille mellifère.

Les modifications du paysage et du climat peuvent avoir un impact sur les colonies d'abeilles, notamment en altérant les ressources disponibles. Certaines pratiques apicoles comme l'addition de molécules chimiques ou le déplacement de colonies sur différents sites de pollinisation peuvent également conduire à l'affaiblissement des colonies. Enfin, l'abeille est exposée à de nombreux agents pathogènes et xénobiotiques et doit faire face à un nouveau prédateur redoutable, le frelon à pattes jaunes *Vespa velutina*.

colonie jusqu'à une ressource alimentaire peut également être évaluée grâce aux puces RFID (Streit *et al.*, 2003). Les études de semi-terrain pour évaluer l'impact d'un facteur de stress à l'échelle de la colonie d'abeilles sont plus réalistes mais lourdes et coûteuses, ce qui explique pourquoi les études en conditions de laboratoire restent encore privilégiées.

3. La multiplicité des facteurs de stress accroît les possibilités d'interactions

L'originalité de ce travail de thèse, proposé il y a trois ans, était de considérer l'action combinée de deux facteurs de stress d'origines biotique et abiotique. Cette problématique était d'autant plus importante que les pertes massives de colonies ont très probablement pour origine l'interaction entre différents facteurs affectant la santé de l'abeille (vanEngelsdorp *et al.*, 2009, 2010; Neumann & Carreck, 2010; Potts *et al.*, 2010). Depuis trois ans, un nombre croissant d'études se focalisent désormais sur l'interaction entre plusieurs facteurs de stress (Alaux *et al.*, 2010a; Bromenshenk *et al.*, 2010; Locke *et al.*, 2012; Pettis *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2012; Ravoet *et al.*, 2013) et il est important de poursuivre l'étude de ces interactions en conditions de laboratoire mais aussi à l'échelle de la colonie. Il est également envisageable d'initier des expérimentations visant à analyser les interactions possibles entre trois facteurs de stress ou plus, même si celles-ci sont difficiles à mettre en place étant donnée la multiplicité des conditions testées. Des travaux très récents et présentés lors du dernier congrès Apimondia (Kiev, Ukraine) visent d'ailleurs à évaluer l'impact de deux pathogènes, *N. ceranae* et le BQCV (black queen cell virus), et de deux molécules chimiques, le thiaclopride et le τ -fluvalinate, seuls ou en combinaison sur la santé de colonies d'abeilles (Williams *et al.*, 2013).

Toutefois, dans son environnement, l'abeille est soumise à de bien plus nombreux facteurs de stress que ceux testés en laboratoire (Figure 24). Au-delà de l'exposition combinée à un parasite et à un insecticide, telle qu'étudiée lors de cette thèse, l'abeille est très probablement simultanément exposée à une multitude de pesticides (Chauzat *et al.*, 2006, 2009; Mullin *et al.*, 2010; Lambert *et al.*, 2013) et d'agents pathogènes (Genersch, 2010a; Evans & Schwarz, 2011). La santé de l'abeille dépend également de nombreux autres facteurs parmi lesquels la prédation par le frelon *Vespa velutina*, la gestion des colonies par les apiculteurs ou encore les modifications climatiques et paysagères ayant des conséquences sur la qualité et la quantité des ressources. Ces facteurs de stress peuvent agir les uns sur les autres mais surtout les uns avec les autres et ainsi entraîner la perte de colonies. Bien que de nombreux facteurs de stress affectant l'abeille soient aujourd'hui clairement identifiés, il est impossible de tester expérimentalement l'impact de toutes les interactions qu'ils

peuvent entraîner. En effet, chaque facteur de stress induit une multiplicité d'interactions possibles et de contrôles à tester.

Outre les approches expérimentales décrites jusqu'ici, des études de terrain, de nature plus descriptive, peuvent permettre de mieux appréhender l'impact de multiples facteurs de stress agissant ensemble sur l'état sanitaire des colonies d'abeilles. Des études épidémiologiques pourraient permettre de relier la détection de facteurs de stress biotiques ou abiotiques dans l'environnement et au sein des colonies à l'état sanitaire de ces dernières. Si des surveillances de colonies ont été effectuées dans plusieurs pays, les résultats obtenus avec différents protocoles sont difficilement comparables et l'ampleur des études peut paraître insuffisante. En effet, une surveillance épidémiologique à grande échelle nécessite des moyens organisationnels et financiers importants, notamment pour les analyses. La Commission Européenne a récemment initié un programme de surveillance des pertes de colonies d'abeilles, piloté par l'ANSES (agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail) (Chauzat *et al.*, 2013). Avec 17 pays participants, le projet a pour but d'effectuer des visites régulières dans des milliers de ruchers, d'identifier les agents pathogènes affectant les colonies et d'évaluer les pertes hivernales en utilisant des méthodes standardisées. Ceci permettra d'obtenir des données comparables pour les états membres de l'Union Européenne dans le but de relier la présence de maladies à l'état sanitaire des colonies. Il serait important de compléter ces données par des analyses toxicologiques décrivant à quelles molécules chimiques et à quelles doses les abeilles de ces mêmes colonies sont exposées. Malheureusement, cet objectif nécessite plus de moyens puisque le coût de telles analyses est très élevé, notamment pour une étude à si grande échelle.

RÉFÉRENCES

- Aajoud A, Raveton M, Aouadi H, Tissut M & Ravanel P (2006). Uptake and Xylem Transport of Fipronil in Sunflower. *J Agric Food Chem* 54, 5055–5060.
- Aajoud A, Raveton M, Azrou-Isghi D, Tissut M & Ravanel P (2008). How Can the Fipronil Insecticide Access Phloem? *J Agric Food Chem* 56, 3732–3737.
- Abbott VA, Nadeau JL, Higo HA & Winston ML (2008). Lethal and sublethal effects of imidacloprid on *Osmia lignaria* and clothianidin on *Megachile rotundata* (Hymenoptera: Megachilidae). *J Econ Entomol* 101, 784–796.
- Abrol DP & Shankar U (2012). *Integrated Pest Management: Principles and Practice*. CABI International, Wallingford.
- Agnew P, Berticat C, Bedhomme S, Sidobre C & Michalakakis Y (2004). Parasitism increases and decreases the costs of insecticide resistance in mosquitoes. *Evolution* 58, 579–586.
- Del Aguila C, Izquierdo F, Granja AG, Hurtado C, Fenoy S, Fresno M & Revilla Y (2006). Encephalitozoon microsporidia modulates p53-mediated apoptosis in infected cells. *Int J Parasitol* 36, 869–876.
- Aizen MA & Harder LD (2009). Geographic variation in the growth of domesticated honey bee stocks: disease or economics? *Commun Integr Biol* 2, 464–466.
- Alaux C, Brunet J-L, Dussaubat C, Mondet F, Tchamitchan S, Cousin M, Brillard J, Baldy A, Belzunces LP & Le Conte Y (2010a). Interactions between *Nosema* microspores and a neonicotinoid weaken honeybees (*Apis mellifera*). *Environ Microbiol* 12, 774–782.
- Alaux C, Ducloz F, Crauser D & Le Conte Y (2010b). Diet effects on honeybee immunocompetence. *Biol Lett* 6, 562–565.
- Alaux C, Folschweiller M, McDonnell C, Beslay D, Cousin M, Dussaubat C, Brunet J-L & Le Conte Y (2011). Pathological effects of the microsporidium *Nosema ceranae* on honey bee queen physiology (*Apis mellifera*). *J Invertebr Pathol* 106, 380–385.
- Aliferis KA, Copley T & Jabaji S (2012). Gas chromatography-mass spectrometry metabolite profiling of worker honey bee (*Apis mellifera* L.) hemolymph for the study of *Nosema ceranae* infection. *J Insect Physiol* 58, 1349–1359.
- Aliouane Y, El Hassani AK, Gary V, Armengaud C, Lambin M & Gauthier M (2009). Subchronic exposure of honeybees to sublethal doses of pesticides: effects on behavior. *Environ Toxicol Chem* 28, 113–122.
- Allen-Wardell G, Bernhardt P, Bitner R, Burquez A, Buchmann S, Cane J, Cox PA, Dalton V, Feinsinger P, Ingram M, Inouye DW, Jones EC, Kennedy K, Kevan P, Koopowitz H, Medellin R, Medellin-Morales S & Nabhan GP (1998). The potential consequences of pollinator declines on the conservation of biodiversity and stability of food crop Yields. *Conserv Biol* 12, 8–17.
- Amdam GV & Omholt SW (2003). The hive bee to forager transition in honeybee colonies: the double repressor hypothesis. *J Theor Biol* 223, 451–464.
- Amigó JM, Gracia MP, Rius M, Salvadó H, Maillo PA & Vivarés CP (1996). Longevity and effects of temperature on the viability and polar-tube extrusion of spores of *Glugea stephani*, a microsporidian parasite of commercial flatfish. *Parasitol Res* 82, 211–214.
- Andreadis TG, Simakova AV, Vossbrinck CR, Shepard JJ & Yurchenko YA (2012). Ultrastructural characterization and comparative phylogenetic analysis of new microsporidia from Siberian mosquitoes: evidence for coevolution and host switching. *J Invertebr Pathol* 109, 59–75.

- Antúnez K, Martín-Hernández R, Prieto L, Meana A, Zunino P & Higes M (2009). Immune suppression in the honey bee (*Apis mellifera*) following infection by *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Environ Microbiol* 11, 2284–2290.
- Ares AM, Nozal MJ, Bernal JL, Martín-Hernández R, Higes M & Bernal J (2012). Liquid chromatography coupled to ion trap-tandem mass spectrometry to evaluate juvenile hormone III levels in bee hemolymph from *Nosema* spp. infected colonies. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 899, 146–153.
- Aufauvre J, Biron DG, Vidau C, Fontbonne R, Roudel M, Diogon M, Viguès B, Belzunces LP, Delbac F & Blot N (2012). Parasite-insecticide interactions: a case study of *Nosema ceranae* and fipronil synergy on honeybee. *Sci Reports* 2, 326.
- Badiou-Bénéteau A, Carvalho SM, Brunet J-L, Carvalho GA, Buleté A, Giroud B & Belzunces LP (2012). Development of biomarkers of exposure to xenobiotics in the honey bee *Apis mellifera*: application to the systemic insecticide thiamethoxam. *Ecotoxicol Environ Saf* 82, 22–31.
- Balayiannis G & Balayiannis P (2008). Bee honey as an environmental bioindicator of pesticides' occurrence in six agricultural areas of Greece. *Arch Environ Contam Toxicol* 55, 462–470.
- Barnett EA, Charlton AJ & Fletcher MR (2007). Incidents of bee poisoning with pesticides in the United Kingdom, 1994–2003. *Pest Manag Sci* 63, 1051–1057.
- Belzunces LP, Tchamitchian S & Brunet J-L (2012). Neural effects of insecticides in the honey bee. *Apidologie* 43, 348–370.
- Bernadou A, Démares F, Couret-Fauvel T, Sandoz JC & Gauthier M (2009). Effect of fipronil on side-specific antennal tactile learning in the honeybee. *J Insect Physiol* 55, 1099–1106.
- Bernal J, Garrido-Bailón E, Del Nozal MJ, González-Porto AV, Martín-Hernández R, Diego JC, Jiménez JJ, Bernal JL & Higes M (2010). Overview of pesticide residues in stored pollen and their potential effect on bee colony (*Apis mellifera*) losses in Spain. *J Econ Entomol* 103, 1964–1971.
- Bicker G (1999). Histochemistry of classical neurotransmitters in antennal lobes and mushroom bodies of the honeybee. *Microsc Res Tech* 45, 174–183.
- Biesmeijer JC, Roberts SPM, Reemer M, Ohlemüller R, Edwards M, Peeters T, Schaffers AP, Potts SG, Kleukers R, Thomas CD, Settele J & Kunin WE (2006). Parallel declines in pollinators and insect-pollinated plants in Britain and the Netherlands. *Science* 313, 351–354.
- Blacquièrè T, Smaghe G, van Gestel CAM & Mommaerts V (2012). Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment. *Ecotoxicology* 21, 973–992.
- Boecking O & Genersch E (2008). Varroosis – the Ongoing Crisis in Bee Keeping. *J Für Verbraucherschutz Leb* 3, 221–228.
- Bollan KA, Hothersall JD, Moffat C, Durkacz J, Saranzewa N, Wright GA, Raine NE, Hight F & Connolly CN (2013). The microsporidian parasites *Nosema ceranae* and *Nosema apis* are widespread in honeybee (*Apis mellifera*) colonies across Scotland. *Parasitol Res* 112, 751–759.
- Bommarco R, Marini L & Vaissière BE (2012). Insect pollination enhances seed yield, quality, and market value in oilseed rape. *Oecologia* 169, 1025–1032.

- Boncristiani H, Underwood R, Schwarz R, Evans JD, Pettis J & vanEngelsdorp D (2012). Direct effect of acaricides on pathogen loads and gene expression levels in honey bees *Apis mellifera*. *J Insect Physiol* 58, 613–620.
- Bonmatin JM, Marchand PA, Charvet R, Moineau I, Bengsch ER & Colin ME (2005). Quantification of Imidacloprid Uptake in Maize Crops. *J Agric Food Chem* 53, 5336–5341.
- Bonmatin JM, Moineau I, Charvet R, Fleche C, Colin ME & Bengsch ER (2003). A LC/APCI-MS/MS method for analysis of imidacloprid in soils, in plants, and in pollens. *Anal Chem* 75, 2027–2033.
- Botías C, Anderson DL, Meana A, Garrido-Bailón E, Martín-Hernández R & Higes M (2012a). Further evidence of an oriental origin for *Nosema ceranae* (Microsporidia: Nosematidae). *J Invertebr Pathol* 110, 108–113.
- Botías C, Martín-Hernández R, Días J, García-Palencia P, Matabuena M, Juarranz A, Barrios L, Meana A, Nanetti A & Higes M (2011). The effect of induced queen replacement on *Nosema* spp. infection in honey bee (*Apis mellifera iberiensis*) colonies. *Environ Microbiol* 14, 845–859.
- Botías C, Martín-Hernández R, Garrido-Bailón E, González-Porto A, Martínez-Salvador A, De la Rúa P, Meana A & Higes M (2012b). The growing prevalence of *Nosema ceranae* in honey bees in Spain, an emerging problem for the last decade. *Res Vet Sci* 93, 150–155.
- Broderick NA, Welchman DP & Lemaitre B (2009). Recognition and response to microbial infection in *Drosophila*. In *Insect infection and immunity*, p. 272. Oxford University Press, New York.
- Bromenshenk JJ, Henderson CB, Wick CH, Stanford MF, Zulich AW, Jabbour RE, Deshpande SV, McCubbin PE, Seccomb RA, Welch PM, Williams T, Firth DR, Skowronski E, Lehmann MM, Bilimoria SL, Gress J, Wanner KW & Cramer RA Jr (2010). Iridovirus and microsporidian linked to honey bee colony decline. *PLoS ONE* 5, e13181.
- Brühl CA, Schmidt T, Pieper S & Alscher A (2013). Terrestrial pesticide exposure of amphibians: an underestimated cause of global decline? *Sci Reports* 3, 1135.
- Cameron SA, Lozier JD, Strange JP, Koch JB, Cordes N, Solter LF & Griswold TL (2011). Patterns of widespread decline in North American bumble bees. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 662–667.
- Casida JE & Durkin KA (2013). Neuroactive insecticides: targets, selectivity, resistance, and secondary effects. *Annu Rev Entomol* 58, 99–117.
- Casida JE & Quistad GB (1998). Golden age of insecticide research: past, present, or future? *Annu Rev Entomol* 43, 1–16.
- Chaimanee V, Chantawannakul P, Chen Y, Evans JD & Pettis JS (2012). Differential expression of immune genes of adult honey bee (*Apis mellifera*) after inoculated by *Nosema ceranae*. *J Insect Physiol* 58, 1090–1095.
- Chaimanee V, Pettis JS, Chen Y, Evans JD, Khongphinitbunjong K & Chantawannakul P (2013). Susceptibility of four different honey bee species to *Nosema ceranae*. *Vet Parasitol* 193, 260–265.
- Chaimanee V, Warrit N & Chantawannakul P (2010). Infections of *Nosema ceranae* in four different honeybee species. *J Invertebr Pathol* 105, 207–210.
- Chang C-C, Lee P-P, Liu CH & Cheng W (2006). Trichlorfon, an organophosphorus insecticide, depresses the immune responses and resistance to *Lactococcus garvieae* of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Fish Shellfish Immunol* 20, 574–585.

- Charvet R, Katouzian-Safadi M, Colin ME, Marchand PA & Bonmatin JM (2004). Insecticides systémiques : de nouveaux risques pour les insectes pollinisateurs. *Ann Pharm Françaises* 62, 29–35.
- Chaton PF, Ravanel P, Tissut M & Meyran JC (2002). Toxicity and bioaccumulation of fipronil in the nontarget arthropodan fauna associated with subalpine mosquito breeding sites. *Ecotoxicol Environ Saf* 52, 8–12.
- Chauzat M-P, Carpentier P, Martel A-C, Bougeard S, Cougoule N, Porta P, Lachaize J, Madec F, Aubert M & Faucon J-P (2009). Influence of pesticide residues on honey bee (Hymenoptera: Apidae) colony health in France. *Environ Entomol* 38, 514–523.
- Chauzat M-P, Faucon J-P, Martel A-C, Lachaize J, Cougoule N & Aubert M (2006). A survey of pesticides residues in pollen loads collected by honey bees in France. *J Econ Entomol* 99, 253–262.
- Chauzat M-P, Yefimenko T & Antonovich O (2013). The Pan-European epidemiological programme for the surveillance of honeybee colony losses. Oral presentation at XXXXIII International Apimondia Congress.
- Chen Y, Evans JD, Smith IB & Pettis JS (2008). Nosema ceranae is a long-present and wide-spread microsporidian infection of the European honey bee (*Apis mellifera*) in the United States. *J Invertebr Pathol* 97, 186–188.
- Chen Y, Evans JD, Zhou L, Boncristiani H, Kimura K, Xiao T, Litkowski AM & Pettis JS (2009). Asymmetrical coexistence of Nosema ceranae and Nosema apis in honey bees. *J Invertebr Pathol* 101, 204–209.
- Chen Y-W, Chung W-P, Wang C-H, Solter LF & Huang W-F (2012). Nosema ceranae infection intensity highly correlates with temperature. *J Invertebr Pathol* 111, 264–267.
- Christophides GK *et al.* (2002). Immunity-related genes and gene families in *Anopheles gambiae*. *Science* 298, 159–165.
- Christophides GK, Vlachou D & Kafatos FC (2004). Comparative and functional genomics of the innate immune system in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Immunol Rev* 198, 127–148.
- Claudianos C, Ranson H, Johnson RM, Biswas S, Schuler MA, Berenbaum MR, Feyereisen R & Oakeshott JG (2006). A deficit of detoxification enzymes: pesticide sensitivity and environmental response in the honeybee. *Insect Mol Biol* 15, 615–636.
- Cole LM, Nicholson RA & Casida JE (1993). Action of phenylpyrazole insecticides at the GABA-gated chloride channel. *Pestic Biochem Physiol* 46, 47–54.
- Colin M-E & Belzunces LP (1992). Evidence of synergy between prochloraz and deltamethrin in *Apis mellifera* L.: a convenient biological approach. *Pestic Sci* 36, 115–119.
- Colin ME, Bonmatin JM, Moineau I, Gaimon C, Brun S & Vermandere JP (2004). A method to quantify and analyze the foraging activity of honey bees: relevance to the sublethal effects induced by systemic insecticides. *Arch Environ Contam Toxicol* 47, 387–395.
- Le Conte Y (2002). L'abeille dans la classification des insectes. *Abeilles Fleurs* 15–16.
- Le Conte Y & Navajas M (2008). Climate change: impact on honey bee populations and diseases. *Rev Sci Tech - Off Int Epizooties* 27, 485–497, 499–510.
- Coors A, Decaestecker E, Jansen M & De Meester L (2008). Pesticide exposure strongly enhances parasite virulence in an invertebrate host model. *Oikos* 117, 1840–1846.

- Copley TR & Jabaji SH (2012). Honeybee glands as possible infection reservoirs of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in naturally infected forager bees. *J Appl Microbiol* 112, 15–24.
- Cornman RS, Chen YP, Schatz MC, Street C, Zhao Y, Desany B, Egholm M, Hutchison S, Pettis JS, Lipkin WI & Evans JD (2009). Genomic analyses of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of honey bees. *PLoS Pathog* 5, e1000466.
- Cornman RS, Tarpy DR, Chen Y, Jeffreys L, Lopez D, Pettis JS, vanEngelsdorp D & Evans JD (2012). Pathogen webs in collapsing honey bee colonies. *PLoS ONE* 7, e43562.
- Corona M, Velarde RA, Remolina S, Moran-Lauter A, Wang Y, Hughes KA & Robinson GE (2007). Vitellogenin, juvenile hormone, insulin signaling, and queen honey bee longevity. *Proc Natl Acad Sci* 104, 7128–7133.
- Corradi N, Haag KL, Pombert J-F, Ebert D & Keeling PJ (2009). Draft genome sequence of the *Daphnia* pathogen *Octospora bayeri*: insights into the gene content of a large microsporidian genome and a model for host-parasite interactions. *Genome Biol* 10, R106.
- Cox-Foster DL *et al.* (2007). A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science* 318, 283–287.
- Croom E (2012). Metabolism of xenobiotics of human environments. *Prog Mol Biol Transl Sci* 112, 31–88.
- Cuomo CA, Desjardins CA, Bakowski MA, Goldberg J, Ma AT, Becnel JJ, Didier ES, Fan L, Heiman DI, Levin JZ, Young S, Zeng Q & Troemel ER (2012). Microsporidian genome analysis reveals evolutionary strategies for obligate intracellular growth. *Genome Res* 22, 2478–2488.
- Dade HA (2009). *Anatomy and dissection of the honey bee (Revised edition)*. International Bee Research Association, Cardiff, UK.
- Dainat B, Evans JD, Chen YP, Gauthier L & Neumann P (2012). Predictive markers of honey bee colony collapse. *PLoS ONE* 7, e32151.
- Damalas CA & Eleftherohorinos IG (2011). Pesticide exposure, safety issues, and risk assessment indicators. *Int J Environ Res Public Health* 8, 1402–1419.
- Decourtye A, Armengaud C, Renou M, Devillers J, Cluzeau S, Gauthier M & Pham-Delègue M-H (2004a). Imidacloprid impairs memory and brain metabolism in the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Pestic Biochem Physiol* 78, 83–92.
- Decourtye A & Devillers J (2010). Ecotoxicity of neonicotinoid insecticides to bees. In *Insect Nicotinic Acetylcholine Receptors*, Advances in Experimental Medicine and Biology, pp. 85–95. Springer, New York.
- Decourtye A, Devillers J, Aupinel P, Brun F, Bagnis C, Fourrier J & Gauthier M (2011). Honeybee tracking with microchips: a new methodology to measure the effects of pesticides. *Ecotoxicology* 20, 429–437.
- Decourtye A, Devillers J, Cluzeau S, Charreton M & Pham-Delègue M-H (2004b). Effects of imidacloprid and deltamethrin on associative learning in honeybees under semi-field and laboratory conditions. *Ecotoxicol Environ Saf* 57, 410–419.
- Decourtye A, Devillers J, Genecque E, Le Menach K, Budzinski H, Cluzeau S & Pham-Delègue MH (2005). Comparative sublethal toxicity of nine pesticides on olfactory learning performances of the honeybee *Apis mellifera*. *Arch Environ Contam Toxicol* 48, 242–250.

- Decourtye A, Lacassie E & Pham-Delègue M-H (2003). Learning performances of honeybees (*Apis mellifera* L) are differentially affected by imidacloprid according to the season. *Pest Manag Sci* 59, 269–278.
- Decourtye A, Lefort S, Devillers J, Gauthier M, Aupinel P & Tisseur M (2009). Sublethal effects of fipronil on the ability of honeybees (*Apis mellifera* L.) to orientate on a complex maze. Hazards of pesticides to bees - 10th International Symposium of the ICP-Bee Protection Group.
- DeGrandi-Hoffman G, Chen Y, Huang E & Huang MH (2010). The effect of diet on protein concentration, hypopharyngeal gland development and virus load in worker honey bees (*Apis mellifera* L.). *J Insect Physiol* 56, 1184–1191.
- Delbac F & Polonais V (2008). The Microsporidian Polar Tube and Its Role in Invasion. In *Molecular Mechanisms of Parasite Invasion*, ed. Burleigh BA & Soldati-Favre D, Subcellular Biochemistry, pp. 208–220. Springer, New York.
- Derecka K, Blythe MJ, Malla S, Genereux DP, Guffanti A, Pavan P, Moles A, Snart C, Ryder T, Ortori CA, Barrett DA, Schuster E & Stöger R (2013). Transient exposure to low levels of insecticide affects metabolic networks of honeybee larvae. *PLoS ONE* 8, e68191.
- Desneux N, Decourtye A & Delpuech J-M (2007). The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annu Rev Entomol* 52, 81–106.
- Didier ES (2005). Microsporidiosis: an emerging and opportunistic infection in humans and animals. *Acta Trop* 94, 61–76.
- Didier ES & Weiss LM (2006). Microsporidiosis: current status. *Curr Opin Infect Dis* 19, 485–492.
- Didier ES & Weiss LM (2008). Overview of microsporidia and microsporidiosis. *Protistology* 5, 243–255.
- Didier PJ, Phillips JN, Kuebler DJ, Nasr M, Brindley PJ, Stovall ME, Bowers LC & Didier ES (2006). Antimicrosporidial activities of fumagillin, TNP-470, ovalicin, and ovalicin derivatives in vitro and in vivo. *Antimicrob Agents Chemother* 50, 2146–2155.
- Duay P, De Jong D & Engels W (2003). Weight loss in drone pupae (*Apis mellifera*) multiply infested by *Varroa destructor* mites. *Apidologie* 34, 61–65.
- Dussaubat C, Brunet J-L, Higes M, Colbourne JK, Lopez J, Choi J-H, Martín-Hernández R, Botías C, Cousin M, McDonnell C, Bonnet M, Belzunces LP, Moritz RFA, Le Conte Y & Alaux C (2012). Gut pathology and responses to the microsporidium *Nosema ceranae* in the honey bee *Apis mellifera*. *PLoS ONE* 7, e37017.
- Dussaubat C, Maisonnasse A, Alaux C, Tchamitchan S, Brunet J-L, Plettner E, Belzunces LP & Le Conte Y (2010). *Nosema* spp. infection alters pheromone production in honey bees (*Apis mellifera*). *J Chem Ecol* 36, 522–525.
- Dussaubat C, Maisonnasse A, Crauser D, Beslay D, Costagliola G, Soubeyrand S, Kretzchmar A & Le Conte Y (2013a). Flight behavior and pheromone changes associated to *Nosema ceranae* infection of honey bee workers (*Apis mellifera*) in field conditions. *J Invertebr Pathol* 113, 42–51.
- Dussaubat C, Sagastume S, Gómez-Moracho T, Botías C, García-Palencia P, Martín-Hernández R, Le Conte Y & Higes M (2013b). Comparative study of *Nosema ceranae* (Microsporidia) isolates from two different geographic origins. *Vet Microbiol* 162, 670–678.

- Eder KJ, Clifford MA, Hedrick RP, Köhler H-R & Werner I (2008). Expression of immune-regulatory genes in juvenile Chinook salmon following exposure to pesticides and infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV). *Fish Shellfish Immunol* 25, 508–516.
- Eder KJ, Köhler HR & Werner I (2007). Pesticide and pathogen: heat shock protein expression and acetylcholinesterase inhibition in juvenile Chinook salmon in response to multiple stressors. *Environ Toxicol Chem* 26, 1233–1242.
- Eiri DM & Nieh JC (2012). A nicotinic acetylcholine receptor agonist affects honey bee sucrose responsiveness and decreases waggle dancing. *J Exp Biol* 215, 2022–2029.
- El Hassani AK, Dacher M, Gauthier M & Armengaud C (2005). Effects of sublethal doses of fipronil on the behavior of the honeybee (*Apis mellifera*). *Pharmacol Biochem Behav* 82, 30–39.
- Elbert A, Haas M, Springer B, Thielert W & Nauen R (2008). Applied aspects of neonicotinoid uses in crop protection. *Pest Manag Sci* 64, 1099–1105.
- Ellis JD, Evans JD & Pettis J (2010). Colony losses, managed colony population decline, and Colony Collapse Disorder in the United States. *J Apic Res* 49, 134–136.
- European and Mediterranean Plant Protection Organization (2010a). Environmental risk assessment scheme for plant protection products - Chapter 10: Honeybees. *EPPO Bull* 40, 323–331.
- European and Mediterranean Plant Protection Organization (2010b). Efficacy evaluation of plant protection products: Side-effects on honeybees. *EPPO Bull* 40, 313–319.
- European Food Safety Authority (2013a). Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment for bees for the active substance clothianidin. *EFSA J* 11, 3066.
- European Food Safety Authority (2013b). Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment for bees for the active substance imidacloprid. *EFSA J* 11, 3068.
- European Food Safety Authority (2013c). Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment for bees for the active substance thiamethoxam. *EFSA J* 11, 3067.
- European Food Safety Authority (2013d). Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment for bees for the active substance fipronil. *EFSA J* 11, 3158.
- Evans JD, Aronstein K, Chen YP, Hetru C, Imler J-L, Jiang H, Kanost M, Thompson GJ, Zou Z & Hultmark D (2006). Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. *Insect Mol Biol* 15, 645–656.
- Evans JD & Schwarz RS (2011). Bees brought to their knees: microbes affecting honey bee health. *Trends Microbiol* 19, 614–620.
- Evans JD & Spivak M (2010). Socialized medicine: individual and communal disease barriers in honey bees. *J Invertebr Pathol* 103, S62–S72.
- Farenhorst M, Knols BGJ, Thomas MB, Howard AFV, Takken W, Rowland M & N'Guessan R (2010). Synergy in efficacy of fungal entomopathogens and permethrin against West African insecticide-resistant *Anopheles gambiae* mosquitoes. *PLoS ONE* 5, e12081.
- Farenhorst M, Mouatcho JC, Kikankie CK, Brooke BD, Hunt RH, Thomas MB, Koekemoer LL, Knols BGJ & Coetzee M (2009). Fungal infection counters insecticide resistance in African malaria mosquitoes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 17443–17447.

- Fayer R (2004). Infectivity of Microsporidia Spores Stored in Seawater at Environmental Temperatures. *J Parasitol* 90, 654–657.
- Fenoy S, Rueda C, Higes M, Martín-Hernández R & del Aguila C (2009). High-level resistance of *Nosema ceranae*, a parasite of the honeybee, to temperature and desiccation. *Appl Environ Microbiol* 75, 6886–6889.
- Ferrandon D (2012). The complementary facets of epithelial host defenses in the genetic model organism *Drosophila melanogaster*: from resistance to resilience. *Curr Opin Immunol* 25, 59–70.
- Ferrandon D, Imler J-L, Hetru C & Hoffmann JA (2007). The *Drosophila* systemic immune response: sensing and signalling during bacterial and fungal infections. *Nat Rev Immunol* 7, 862–874.
- Fontbonne R, Garnery L, Vidau C, Aufauvre J, Texier C, Tchamitchian S, El Alaoui H, Brunet J-L, Delbac F & Biron DG (2013). Comparative susceptibility of three Western honeybee taxa to the microsporidian parasite *Nosema ceranae*. *Infect Genet Evol* 17, 188–194.
- Forsgren E (2010). European foulbrood in honey bees. *J Invertebr Pathol* 103 Suppl 1, S5–9.
- Forsgren E & Fries I (2012). Temporal study of *Nosema* spp. in a cold climate. *Environ Microbiol Reports* 5, 78–82.
- Franzen C (2005). How do microsporidia invade cells? *Folia Parasitol (Praha)* 52, 36–40.
- Fries I (2010). *Nosema ceranae* in European honey bees (*Apis mellifera*). *J Invertebr Pathol* 103, S73–79.
- Fries I, Feng F, da Silva A, Slemenda SB & Pieniazek NJ (1996). *Nosema ceranae* n. sp. (Microspora, Nosematidae), morphological and molecular characterization of a microsporidian parasite of the Asian honey bee *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae). *Eur J Protistol* 32, 356–365.
- Frost EH, Shutler D & Hillier NK (2012). The proboscis extension reflex to evaluate learning and memory in honeybees (*Apis mellifera*): some caveats. *Naturwissenschaften* 99, 677–686.
- Gallai N, Salles J-M, Settele J & Vaissière BE (2009). Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecol Econ* 68, 810–821.
- Galloway T & Handy R (2003). Immunotoxicity of organophosphorous pesticides. *Ecotoxicology* 12, 345–363.
- Galloway TS & Depledge MH (2001). Immunotoxicity in invertebrates: measurement and ecotoxicological relevance. *Ecotoxicology* 10, 5–23.
- García-Palencia P, Martín-Hernández R, González-Porto A, Marin P, Meana A & Higes M (2010). Natural infection by *Nosema ceranae* causes similar lesions as in experimentally infected caged-workers honey bees (*Apis mellifera*). *J Apic Res* 49, 278–283.
- Garrido PM, Antúnez K, Martín M, Porrini MP, Zunino P & Eguaras MJ (2013). Immune-related gene expression in nurse honey bees (*Apis mellifera*) exposed to synthetic acaricides. *J Insect Physiol* 59, 113–119.
- Gauthier M (2010). State of the art on insect nicotinic acetylcholine receptor function in learning and memory. In *Insect Nicotinic Acetylcholine Receptors*, Advances in Experimental Medicine and Biology, pp. 97–115. Springer, New York.
- Genersch E (2010a). Honey bee pathology: current threats to honey bees and beekeeping. *Appl Microbiol Biotechnol* 87, 87–97.

- Genersch E (2010b). American Foulbrood in honeybees and its causative agent, *Paenibacillus larvae*. *J Invertebr Pathol* 103 Suppl 1, S10–19.
- Genersch E, Gisder S, Hedtke K, Hunter WB, Möckel N & Müller U (2013). Standard methods for cell cultures in *Apis mellifera*. *J Apic Res*.
- Ghazoul J (2005). Buzziness as usual? Questioning the global pollination crisis. *Trends Ecol Evol* 20, 367–373.
- Giray T, Kence M, Oskay D, Döke MA & Kence A (2010). Scientific note: colony losses survey in Turkey and causes of bee deaths. *Apidologie* 41, 451–453.
- Girolami V, Mazzon L, Squartini A, Mori N, Marzaro M, Di Bernardo A, Greatti M, Giorio C & Tapparo A (2009). Translocation of neonicotinoid insecticides from coated seeds to seedling guttation drops: a novel way of intoxication for bees. *J Econ Entomol* 102, 1808–1815.
- Gisder S, Hedtke K, Möckel N, Frielitz M-C, Linde A & Genersch E (2010). Five-year cohort study of *Nosema* spp. in Germany: does climate shape virulence and assertiveness of *Nosema ceranae*? *Appl Environ Microbiol* 76, 3032–3038.
- Gisder S, Möckel N, Linde A & Genersch E (2011). A cell culture model for *Nosema ceranae* and *Nosema apis* allows new insights into the life cycle of these important honey bee-pathogenic microsporidia. *Environ Microbiol* 13, 404–413.
- Goblirsch M, Huang ZY & Spivak M (2013). Physiological and behavioral changes in honey bees (*Apis mellifera*) induced by *Nosema ceranae* infection. *PLoS ONE* 8, e58165.
- González-Varo JP, Biesmeijer JC, Bommarco R, Potts SG, Schweiger O, Smith HG, Steffan-Dewenter I, Szentgyörgyi H, Woyciechowski M & Vilà M (2013). Combined effects of global change pressures on animal-mediated pollination. *Trends Ecol Evol* 28, 524–530.
- Goulson D, Lye GC & Darvill B (2008). Decline and conservation of bumble bees. *Annu Rev Entomol* 53, 191–208.
- Graystock P, Yates K, Darvill B, Goulson D & Hughes WOH (2013). Emerging dangers: Deadly effects of an emergent parasite in a new pollinator host. *J Invertebr Pathol* 114, 114–119.
- Gregorc A & Ellis JD (2011). Cell death localization in situ in laboratory reared honey bee (*Apis mellifera* L.) larvae treated with pesticides. *Pestic Biochem Physiol* 99, 200–207.
- Gregorc A, Evans JD, Scharf M & Ellis JD (2012). Gene expression in honey bee (*Apis mellifera*) larvae exposed to pesticides and *Varroa* mites (*Varroa destructor*). *J Insect Physiol* 58, 1042–1049.
- Guez D, Belzunces LP & Maleszka R (2003). Effects of imidacloprid metabolites on habituation in honeybees suggest the existence of two subtypes of nicotinic receptors differentially expressed during adult development. *Pharmacol Biochem Behav* 75, 217–222.
- Guez D, Suchail S, Gauthier M, Maleszka R & Belzunces LP (2001). Contrasting effects of imidacloprid on habituation in 7- and 8-day-old honeybees (*Apis mellifera*). *Neurobiol Learn Mem* 76, 183–191.
- Gunasekara AS, Truong T, Goh KS, Spurlock F & Tjeerdema RS (2007). Environmental fate and toxicology of fipronil. *J Pestic Sci* 32, 189–199.
- Hadley AS & Betts MG (2012). The effects of landscape fragmentation on pollination dynamics: absence of evidence not evidence of absence. *Biol Rev Camb Philos Soc* 87, 526–544.

- Halm M-P, Rortais A, Arnold G, Taséi JN & Rault S (2006). New risk assessment approach for systemic insecticides: the case of honey bees and imidacloprid (Gaucho). *Environ Sci Technol* 40, 2448–2454.
- Harrison JB, Chen HH, Sattelle E, Barker PJ, Huskisson NS, Rauh JJ, Bai D & Sattelle DB (1996). Immunocytochemical mapping of a C-terminus anti-peptide antibody to the GABA receptor subunit, RDL in the nervous system of *Drosophila melanogaster*. *Cell Tissue Res* 284, 269–278.
- Hedtke K, Jensen PM, Jensen AB & Genersch E (2011). Evidence for emerging parasites and pathogens influencing outbreaks of stress-related diseases like chalkbrood. *J Invertebr Pathol* 108, 167–173.
- Hemingway J, Hawkes NJ, McCarroll L & Ranson H (2004). The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochem Mol Biol* 34, 653–665.
- Henry M, Béguin M, Requier F, Rollin O, Odoux J-F, Aupinel P, Aptel J, Tchamitchian S & Decourtye A (2012). A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. *Science* 336, 348–350.
- Higes M, García-Palencia P, Martín-Hernández R & Meana A (2007). Experimental infection of *Apis mellifera* honeybees with *Nosema ceranae* (Microsporidia). *J Invertebr Pathol* 94, 211–217.
- Higes M, Juarranz A, Dias-Almeida J, Lucena S, Botías C, Meana A, García-Palencia P & Martín-Hernández R (2013a). Apoptosis in the pathogenesis of *Nosema ceranae* (Microsporidia: Nosematidae) in honey bees (*Apis mellifera*). *Environ Microbiol Reports* 5, 530–536.
- Higes M, Martín R & Meana A (2006). *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe. *J Invertebr Pathol* 92, 93–95.
- Higes M, Martín-Hernández R, Botías C, Bailón EG, González-Porto AV, Barrios L, Del Nozal MJ, Bernal JL, Jiménez JJ, Palencia PG & Meana A (2008a). How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Environ Microbiol* 10, 2659–2669.
- Higes M, Martín-Hernández R, Garrido-Bailón E, García-Palencia P & Meana A (2008b). Detection of infective *Nosema ceranae* (Microsporidia) spores in corbicular pollen of forager honeybees. *J Invertebr Pathol* 97, 76–78.
- Higes M, Martín-Hernández R, Garrido-Bailón E, González-Porto AV, García-Palencia P, Meana A, Del Nozal MJ, Mayo R & Bernal JL (2009). Honeybee colony collapse due to *Nosema ceranae* in professional apiaries. *Environ Microbiol Reports* 1, 110–113.
- Higes M, Martín-Hernández R & Meana A (2010). *Nosema ceranae* in Europe: an emergent type C nosemosis. *Apidologie* 41, 375–392.
- Higes M, Meana A, Bartolomé C, Botías C & Martín-Hernández R (2013b). *Nosema ceranae* (Microsporidia), a controversial 21st century honey bee pathogen. *Environ Microbiol Reports* 5, 17–29.
- Hilmi M, Bradbear N & Mejia D (2012). Beekeeping and sustainable livelihoods - Food and Agriculture Organization of the United States.
- Hojo M, Kagami T, Sasaki T, Nakamura J & Sasaki M (2010). Reduced expression of major royal jelly protein 1 gene in the mushroom bodies of worker honeybees with reduced learning ability. *Apidologie* 41, 194–202.
- Holmstrup M, Bindesbøl A-M, Oostingh GJ, Duschl A, Scheil V, Köhler H-R, Loureiro S, Soares AMVM, Ferreira ALG, Kienle C, Gerhardt A, Laskowski R, Kramarz PE, Bayley M, Svendsen C & Spurgeon DJ (2010). Interactions between effects of environmental chemicals and natural stressors: a review. *Sci Total Environ* 408, 3746–3762.

- Holzschuh A, Steffan-Dewenter I, Kleijn D & Tscharntke T (2007). Diversity of flower-visiting bees in cereal fields: effects of farming system, landscape composition and regional context. *J Appl Ecol* 44, 41–49.
- Hong I-P, Woo S-O, Choi Y-S, Han S-M, Kim N-S, Kim H-K, Han S-H, Lee M-Y, Lee M-L & Byeon K-H (2011). Prevalence of Nosema and Virus in Honey Bee (*Apis mellifera* L.) Colonies on Flowering Period of Acacia in Korea. *Mycobiology* 39, 317.
- Huang W-F, Bocquet M, Lee K-C, Sung I-H, Jiang J-H, Chen Y-W & Wang C-H (2008). The comparison of rDNA spacer regions of Nosema ceranae isolates from different hosts and locations. *J Invertebr Pathol* 97, 9–13.
- Huang W-F, Jiang J-H, Chen Y-W & Wang C-H (2007). A Nosema ceranae isolate from the honeybee *Apis mellifera*. *Apidologie* 38, 30–37.
- Huang W-F & Solter LF (2013). Comparative development and tissue tropism of Nosema apis and Nosema ceranae. *J Invertebr Pathol* 113, 35–41.
- Huang W-F, Solter LF, Yau PM & Imai BS (2013). Nosema ceranae escapes fumagillin control in honey bees. *PLoS Pathog* 9, e1003185.
- Huang ZY, Robinson GE & Borst DW (1994). Physiological correlates of division of labor among similarly aged honey bees. *J Comp Physiol [A]* 174, 731–739.
- Hunter W, Ellis J, vanEngelsdorp D, Hayes J, Westervelt D, Glick E, Williams M, Sela I, Maori E, Pettis J, Cox-Foster D & Paldi N (2010). Large-scale field application of RNAi technology reducing Israeli Acute Paralysis Virus disease in honey bees (*Apis mellifera*, Hymenoptera: Apidae). *PLoS Pathog* 6, e1001160.
- Invernizzi C, Abud C, Tomasco IH, Harriet J, Ramallo G, Campá J, Katz H, Gardiol G & Mendoza Y (2009). Presence of Nosema ceranae in honeybees (*Apis mellifera*) in Uruguay. *J Invertebr Pathol* 101, 150–153.
- Iwasa T, Motoyama N, Ambrose JT & Roe RM (2004). Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, *Apis mellifera*. *Crop Prot* 23, 371–378.
- Jancova P, Anzenbacher P & Anzenbacherova E (2010). Phase II drug metabolizing enzymes. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacký Olomouc Czechoslov* 154, 103–116.
- Jansen M, Coors A, Stoks R & De Meester L (2011a). Evolutionary ecotoxicology of pesticide resistance: a case study in *Daphnia*. *Ecotoxicology* 20, 543–551.
- Jansen M, Stoks R, Coors A, van Doorslaer W & de Meester L (2011b). Collateral damage: rapid exposure-induced evolution of pesticide resistance leads to increased susceptibility to parasites. *Evolution* 65, 2681–2691.
- Jarosch A & Moritz RFA (2011). Systemic RNA-interference in the honeybee *Apis mellifera*: Tissue dependent uptake of fluorescent siRNA after intra-abdominal application observed by laser-scanning microscopy. *J Insect Physiol* 57, 851–857.
- Jeffery E (2007). Detoxification basics - The proceedings from the 13th International Symposium of the Institute for Functional Medicine.
- Jeschke P, Nauen R, Schindler M & Elbert A (2011). Overview of the status and global strategy for neonicotinoids. *J Agric Food Chem* 59, 2897–2908.

- Johnson RM, Ellis MD, Mullin CA & Frazier M (2010). Pesticides and honey bee toxicity – USA. *Apidologie* 41, 312–331.
- Johnson RM, Pollock HS & Berenbaum MR (2009). Synergistic interactions between in-hive miticides in *Apis mellifera*. *J Econ Entomol* 102, 474–479.
- Katinka MD, Duprat S, Cornillot E, Méténier G, Thomarat F, Prensier G, Barbe V, Peyretailade E, Brottier P, Wincker P, Delbac F, El Alaoui H, Peyret P, Saurin W, Gouy M, Weissenbach J & Vivarès CP (2001). Genome sequence and gene compaction of the eukaryote parasite *Encephalitozoon cuniculi*. *Nature* 414, 450–453.
- Kearns CA, Inouye DW & Waser NM (n.d.). Endangered mutualisms: the conservation of plant-pollinator interactions. *Annu Rev Ecol Syst* 29, 83–112.
- Keeling P (2009). Five questions about microsporidia. *PLoS Pathog* 5, e1000489.
- Keeling PJ & Corradi N (2011). Shrink it or lose it: balancing loss of function with shrinking genomes in the microsporidia. *Virulence* 2, 67–70.
- Keeling PJ & Fast NM (2002). Microsporidia: biology and evolution of highly reduced intracellular parasites. *Annu Rev Microbiol* 56, 93–116.
- Keller CF (2007). Global warming 2007. An update to global warming: the balance of evidence and its policy implications. *ScientificWorldJournal* 7, 381–399.
- Kiesecker JM (2002). Synergism between trematode infection and pesticide exposure: a link to amphibian limb deformities in nature? *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 9900–9904.
- Kievits J & Bruneau E (2007). Neurotoxiques systémiques, un risque pour les abeilles ? *Abeilles Cie* 118, 12–17.
- Klee J, Besana AM, Genersch E, Gisder S, Nanetti A, Tam DQ, Chinh TX, Puerta F, Ruz JM, Kryger P, Message D, Hatjina F, Korpela S, Fries I & Paxton RJ (2007). Widespread dispersal of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of the western honey bee, *Apis mellifera*. *J Invertebr Pathol* 96, 1–10.
- Klein A-M, Vaissière BE, Cane JH, Steffan-Dewenter I, Cunningham SA, Kremen C & Tscharntke T (2007). Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proc R Soc - Biol Sci* 274, 303–313.
- Koppenhöfer AM, Cowles RS, Cowles EA, Fuzy EM & Baumgartner L (2002). Comparison of neonicotinoid insecticides as synergists for entomopathogenic nematodes. *Biol Control* 24, 90–97.
- Koppenhöfer AM, Grewal PS & Kaya HK (2000a). Synergism of imidacloprid and entomopathogenic nematodes against white grubs: the mechanism. *Entomol Exp Appl* 94, 283–293.
- Koppenhöfer AM, Wilson M, Brown I, Kaya HK & Gaugler R (2000b). Biological control agents for white grubs (Coleoptera: Scarabaeidae) in anticipation of the establishment of the Japanese beetle in California. *J Econ Entomol* 93, 71–80.
- Kralj J & Fuchs S (2010). *Nosema* sp. influences flight behavior of infected honey bee (*Apis mellifera*) foragers. *Apidologie* 41, 21–28.
- Krupke CH, Hunt GJ, Eitzer BD, Andino G & Given K (2012). Multiple routes of pesticide exposure for honey bees living near agricultural fields. *PLoS ONE* 7, e29268.

- Lambert O, Piroux M, Puyo S, Thorin C, L'hostis M, Wiest L, Buleté A, Delbac F & Pouliquen H (2013). Widespread occurrence of chemical residues in beehive matrices from apiaries located in different landscapes of Western France. *PLoS ONE* 8, e67007.
- Lambert O, Piroux M, Puyo S, Thorin C, Larhantec M, Delbac F & Pouliquen H (2012a). Bees, honey and pollen as sentinels for lead environmental contamination. *Environ Pollut* 170, 254–259.
- Lambert O, Veyrand B, Durand S, Marchand P, Le Bizet B, Piroux M, Puyo S, Thorin C, Delbac F & Pouliquen H (2012b). Polycyclic aromatic hydrocarbons: bees, honey and pollen as sentinels for environmental chemical contaminants. *Chemosphere* 86, 98–104.
- Leoncini I, Le Conte Y, Costagliola G, Plettner E, Toth AL, Wang M, Huang Z, Bécard J-M, Crauser D, Slessor KN & Robinson GE (2004). Regulation of behavioral maturation by a primer pheromone produced by adult worker honey bees. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 17559–17564.
- Levy S (2011). The pollinator crisis: What's best for bees. *Nature* 479, 164–165.
- Locke B, Forsgren E, Fries I & de Miranda JR (2012). Acaricide treatment affects viral dynamics in Varroa destructor-infested honey bee colonies via both host physiology and mite control. *Appl Environ Microbiol* 78, 227–235.
- Malone LA & Stefanovic D (1999). Comparison of the responses of two races of honeybees to infection with *Nosema apis* Zander. *Apidologie* 30, 375–382.
- Mao W, Schuler MA & Berenbaum MR (2011). CYP9Q-mediated detoxification of acaricides in the honey bee (*Apis mellifera*). *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 12657–12662.
- Mao W, Schuler MA & Berenbaum MR (2013). Honey constituents up-regulate detoxification and immunity genes in the western honey bee *Apis mellifera*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 8842–8846.
- Marmaras VJ & Lampropoulou M (2009). Regulators and signalling in insect haemocyte immunity. *Cell Signal* 21, 186–195.
- Martel A-C, Zeggane S, Aurières C, Drajnudel P, Faucon J-P & Aubert M (2007). Acaricide residues in honey and wax after treatment of honey bee colonies with Apivar® or Asuntol®50. *Apidologie* 38, 534–544.
- Martínez J, Leal G & Conget P (2012). *Nosema ceranae* an emergent pathogen of *Apis mellifera* in Chile. *Parasitol Res* 111, 601–607.
- Martínez-Jerónimo F, Arzate-Cárdenas M & Ortiz-Butrón R (2013). Linking sub-individual and population level toxicity effects in *Daphnia schoedleri* (Cladocera: Anomopoda) exposed to sublethal concentrations of the pesticide α -cypermethrin. *Ecotoxicology* 22, 985–995.
- Martín-Hernández R, Botías C, Bailón EG, Martínez-Salvador A, Prieto L, Meana A & Higes M (2011a). Microsporidia infecting *Apis mellifera*: coexistence or competition. Is *Nosema ceranae* replacing *Nosema apis*? *Environ Microbiol* 14, 2127–2138.
- Martín-Hernández R, Botías C, Barrios L, Martínez-Salvador A, Meana A, Mayack C & Higes M (2011b). Comparison of the energetic stress associated with experimental *Nosema ceranae* and *Nosema apis* infection of honeybees (*Apis mellifera*). *Parasitol Res* 109, 605–612.
- Martín-Hernández R, Meana A, Prieto L, Salvador AM, Garrido-Bailón E & Higes M (2007). Outcome of colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*. *Appl Environ Microbiol* 73, 6331–6338.

- Mayack C & Naug D (2009). Energetic stress in the honeybee *Apis mellifera* from *Nosema ceranae* infection. *J Invertebr Pathol* 100, 185–188.
- Mayack C & Naug D (2010). Parasitic infection leads to decline in hemolymph sugar levels in honeybee foragers. *J Insect Physiol* 56, 1572–1575.
- McDonnell CM, Alaux C, Parrinello H, Desvignes J-P, Crauser D, Durbesson E, Beslay D & Le Conte Y (2013). Ecto- and endoparasite induce similar chemical and brain neurogenomic responses in the honey bee (*Apis mellifera*). *BMC Ecol* 13, 25.
- McGettigan PA (2013). Transcriptomics in the RNA-seq era. *Curr Opin Chem Biol* 17, 4–11.
- McLaughlin A & Mineau P (1995). The impact of agricultural practices on biodiversity. *Agric Ecosyst Environ* 55, 201–212.
- Milbrath MO, Xie X & Huang ZY (2013). *Nosema ceranae* induced mortality in honey bees (*Apis mellifera*) depends on infection methods. *J Invertebr Pathol* 114, 42–44.
- De Miranda JR & Genersch E (2010). Deformed wing virus. *J Invertebr Pathol* 103 Suppl 1, S48–61.
- Morales-Rodriguez A & Peck DC (2009). Synergies between biological and neonicotinoid insecticides for the curative control of the white grubs *Amphimallon majale* and *Popillia japonica*. *Biol Control* 51, 169–180.
- Morimoto T, Kojima Y, Yoshiyama M, Kimura K, Yang B, Peng G & Kadowaki T (2013). Molecular detection of protozoan parasites infecting *Apis mellifera* colonies in Japan. *Environ Microbiol Reports* 5, 74–77.
- Morley NJ (2010). Interactive effects of infectious diseases and pollution in aquatic molluscs. *Aquat Toxicol* 96, 27–36.
- Mulholland G, Traver B, Johnson N & Fell R (2012). Individual Variability of *Nosema ceranae* Infections in *Apis mellifera* Colonies. *Insects* 3, 1143–1155.
- Mullin CA, Frazier M, Frazier JL, Ashcraft S, Simonds R, Vanengelsdorp D & Pettis JS (2010). High levels of miticides and agrochemicals in North American apiaries: implications for honey bee health. *PLoS ONE* 5, e9754.
- Nabian S, Ahmadi K, Nazem Shirazi M & Gerami Sadeghian A (2011). First detection of *Nosema ceranae*, a microsporidian protozoa of European honeybees (*Apis mellifera*) in Iran. *Iran J Parasitol* 6, 89–95.
- Nathan C & Cunningham-Bussel A (2013). Beyond oxidative stress: an immunologist's guide to reactive oxygen species. *Nat Rev Immunol* 13, 349–361.
- Nauen R & Bretschneider T (2002). New modes of action of insecticides. *Pestic Outlook* 13, 241–245.
- Nauen R, Ebbinghaus-Kintscher U & Schmuck R (2001). Toxicity and nicotinic acetylcholine receptor interaction of imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Pest Manag Sci* 57, 577–586.
- Naug D & Gibbs A (2009). Behavioral changes mediated by hunger in honeybees infected with *Nosema ceranae*. *Apidologie* 40, 595–599.
- Nazzi F, Brown SP, Annoscia D, Del Piccolo F, Di Prisco G, Varricchio P, Della Vedova G, Cattonaro F, Caprio E & Pennacchio F (2012). Synergistic parasite-pathogen interactions mediated by host immunity can drive the collapse of honeybee colonies. *PLoS Pathog* 8, e1002735.

- Neumann P & Carreck NL (2010). Honey bee colony losses. *J Apic Res* 49, 1–6.
- Nunes FMF, Ihle KE, Mutti NS, Simões ZLP & Amdam GV (2013). The gene vitellogenin affects microRNA regulation in honey bee (*Apis mellifera*) fat body and brain. *J Exp Biol* 216, 3724–3732.
- Ollerton J, Winfree R & Tarrant S (2011). How many flowering plants are pollinated by animals? *Oikos* 120, 321–326.
- Paldi N, Glick E, Oliva M, Zilberberg Y, Aubin L, Pettis J, Chen Y & Evans JD (2010). Effective gene silencing in a microsporidian parasite associated with honeybee (*Apis mellifera*) colony declines. *Appl Environ Microbiol* 76, 5960–5964.
- Pan G *et al.* (2013). Comparative genomics of parasitic silkworm microsporidia reveal an association between genome expansion and host adaptation. *BMC Genomics* 14, 186.
- Papaefthmiou C & Theophilidis G (2001). An in vitro method for recording the electrical activity of the isolated heart of the adult *Drosophila melanogaster*. *Vitro Cell Dev Biol - Anim* 37, 445–449.
- Pareja L, Colazzo M, Pérez-Parada A, Niell S, Carrasco-Letelier L, Besil N, Cesio MV & Heinzen H (2011). Detection of pesticides in active and depopulated beehives in Uruguay. *Int J Environ Res Public Health* 8, 3844–3858.
- Di Pasquale G, Salignon M, Le Conte Y, Belzunces LP, Decourtye A, Kretzschmar A, Suchail S, Brunet J-L & Alaux C (2013). Influence of pollen nutrition on honey bee health: do pollen quality and diversity matter? *PLoS ONE* 8, e72016.
- Paxton RJ, Klee J, Korpela S & Fries I (2007). *Nosema ceranae* has infected *Apis mellifera* in Europe since at least 1998 and may be more virulent than *Nosema apis*. *Apidologie* 38, 558–565.
- Perugini M, Manera M, Grotta L, Abete MC, Tarasco R & Amorena M (2011). Heavy metal (Hg, Cr, Cd, and Pb) contamination in urban areas and wildlife reserves: honeybees as bioindicators. *Biol Trace Elem Res* 140, 170–176.
- Pettis JS, vanEngelsdorp D, Johnson J & Dively G (2012). Pesticide exposure in honey bees results in increased levels of the gut pathogen *Nosema*. *Naturwissenschaften* 99, 153–158.
- Peyretilade E *et al.* (2012). Annotation of microsporidian genomes using transcriptional signals. *Nat Commun* 3, 1137.
- Plischuk S, Martín-Hernández R, Prieto L, Lucía M, Botías C, Meana A, Abrahamovich AH, Lange C & Higes M (2009). South American native bumblebees (Hymenoptera: Apidae) infected by *Nosema ceranae* (Microsporidia), an emerging pathogen of honeybees (*Apis mellifera*). *Environ Microbiol Reports* 1, 131–135.
- Porrini MP, Sarlo EG, Medici SK, Garrido PM, Porrini DP, Damiani N & Eguaras MJ (2011). *Nosema ceranae* development in *Apis mellifera*: influence of diet and infective inoculum. *J Apic Res* 50, 35–41.
- Potts SG, Biesmeijer JC, Kremen C, Neumann P, Schweiger O & Kunin WE (2010). Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends Ecol Evol* 25, 345–353.
- Ratnieks FLW & Carreck NL (2010). Clarity on honey bee collapse? *Science* 327, 152–153.
- Ravoet J, Maharramov J, Meeus I, De Smet L, Wenseleers T, Smagghe G & de Graaf DC (2013). Comprehensive bee pathogen screening in Belgium reveals *Crithidia mellificae* as a new contributory factor to winter mortality. *PLoS ONE* 8, e72443.

- Regnault-Roger C, Fabres G & Philogène BJR (2005). *Enjeux phytosanitaires pour l'agriculture et l'environnement*. Tec & Doc Lavoisier, Paris.
- Rinderer TE, Rothenbuhler WC & Gochnauer TA (1974). The influence of pollen on the susceptibility of honey-bee larvae to *Bacillus* larvae. *J Invertebr Pathol* 23, 347–350.
- Robinet C & Roques A (2010). Direct impacts of recent climate warming on insect populations. *Integr Zool* 5, 132–142.
- Robinson RA & Sutherland WJ (2002). Post-war changes in arable farming and biodiversity in Great Britain. *J Appl Ecol* 39, 157–176.
- Rodrigues V, Cordeiro-da-Silva A, Laforge M, Ouaiissi A, Silvestre R & Estaquier J (2012). Modulation of mammalian apoptotic pathways by intracellular protozoan parasites. *Cell Microbiol* 14, 325–333.
- Rortais A, Villemant C, Gargominy O, Rome Q, Haxaire J, Papachristoforou A & Arnold G (2010). A new enemy of honeybees in Europe: the Asian hornet *Vespa velutina*. In *Atlas of biodiversity risk*, p. 300. Pensoft Publishers, Sofia, Bulgaria.
- Roudel M, Aufauvre J, Corbara B, Delbac F & Blot N (2013). New insights on the genetic diversity of the honeybee parasite *Nosema ceranae* based on multilocus sequence analysis. *Parasitology* 1–11.
- Rueppell O, Hayworth MK & Ross NP (2010). Altruistic self-removal of health-compromised honey bee workers from their hive. *J Evol Biol* 23, 1538–1546.
- Runckel C, Flenniken ML, Engel JC, Ruby JG, Ganem D, Andino R & DeRisi JL (2011). Temporal analysis of the honey bee microbiome reveals four novel viruses and seasonal prevalence of known viruses, *Nosema*, and *Crithidia*. *PLoS ONE* 6, e20656.
- Sahai-Hernandez P, Castanieta A & Nystul TG (2012). *Drosophila* models of epithelial stem cells and their niches. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 1, 447–457.
- Satta A, Verdinelli M, Ruiu L, Buffa F, Salis S, Sassu A & Floris I (2012). Combination of beehive matrices analysis and ant biodiversity to study heavy metal pollution impact in a post-mining area (Sardinia, Italy). *Environ Sci Pollut Res Int* 19, 3977–3988.
- Scanlon M, Leitch GJ, Shaw AP, Moura H & Visvesvara GS (1999). Susceptibility to apoptosis is reduced in the Microsporidia-infected host cell. *J Eukaryot Microbiol* 46, 34S–35S.
- Schmuck R, Schöning R, Stork A & Schramel O (2001). Risk posed to honeybees (*Apis mellifera* L, Hymenoptera) by an imidacloprid seed dressing of sunflowers. *Pest Manag Sci* 57, 225–238.
- Schneider CW, Tautz J, Grünwald B & Fuchs S (2012). RFID tracking of sublethal effects of two neonicotinoid insecticides on the foraging behavior of *Apis mellifera*. *PLoS ONE* 7, e30023.
- Scott JG, Michel K, Bartholomay L, Siegfried BD, Hunter WB, Smagghe G, Zhu KY & Douglas AE (2013). Towards the elements of successful insect RNAi. *J Insect Physiol* 1910, 185–186.
- Shapiro-Ilan DI, Cottrell TE & Wood BW (2011). Effects of combining microbial and chemical insecticides on mortality of the Pecan Weevil (Coleoptera: Curculionidae). *J Econ Entomol* 104, 14–20.
- Shelley LK, Balfry SK, Ross PS & Kennedy CJ (2009). Immunotoxicological effects of a sub-chronic exposure to selected current-use pesticides in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat Toxicol* 92, 95–103.

- Da Silva Cruz A, da Silva-Zacarin ECM, Bueno OC & Malaspina O (2010). Morphological alterations induced by boric acid and fipronil in the midgut of worker honeybee (*Apis mellifera* L.) larvae : Morphological alterations in the midgut of *A. mellifera*. *Cell Biol Toxicol* 26, 165–176.
- Smart MD & Sheppard WS (2012). *Nosema ceranae* in age cohorts of the western honey bee (*Apis mellifera*). *J Invertebr Pathol* 109, 148–151.
- Smith ML (2012). The honey bee parasite *Nosema ceranae*: transmissible via food exchange? *PLoS ONE* 7, e43319.
- Solter LF (2010). Microsporidia: friend, foe (and intriguing creatures). *Am Bee J* 1147–1149.
- Stefani Margarido TC, Felício AA, de Cerqueira Rossa-Feres D & Alves de Almeida E (2013). Biochemical biomarkers in *Scinax fuscovarius* tadpoles exposed to a commercial formulation of the pesticide fipronil. *Mar Environ Res* 141-1136, 15–19.
- Stevanovic J, Stanimirovic Z, Genersch E, Kovacevic SR, Ljubenkovic J, Radakovic M & Aleksic N (2010). Dominance of *Nosema ceranae* in honey bees in the Balkan countries in the absence of symptoms of colony collapse disorder. *Apidologie* 42, 49–58.
- Streit S, Bock F, Pirk CWW & Tautz J (2003). Automatic life-long monitoring of individual insect behaviour now possible. *Zoology* 106, 169–171.
- Suchail S, Debrauwer L & Belzunces LP (2004). Metabolism of imidacloprid in *Apis mellifera*. *Pest Manag Sci* 60, 291–296.
- Suchail S, Guez D & Belzunces LP (2001). Discrepancy between acute and chronic toxicity induced by imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera*. *Environ Toxicol Chem* 20, 2482–2486.
- Sures B (2008). Interactions between parasites and pollutants in the aquatic environment. *Parasite* 15, 434–438.
- Suwannapong G, Maksong S, Seanbualuang P & Benbow ME (2010). Experimental infection of red dwarf honeybee, *Apis florea*, with *Nosema ceranae*. *J Asia - Pac Entomol* 13, 361–364.
- Tang H (2009). Regulation and function of the melanization reaction in *Drosophila*. *Fly (Austin)* 3, 105–111.
- Tapparo A, Giorio C, Marzaro M, Marton D, Soldà L & Girolami V (2011). Rapid analysis of neonicotinoid insecticides in guttation drops of corn seedlings obtained from coated seeds. *J Environ Monit* 13, 1564–1568.
- Tasei JN, Ripault G & Rivault E (2001). Hazards of imidacloprid seed coating to *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae) when applied to sunflower. *J Econ Entomol* 94, 623–627.
- Tautz J (2009). *L'étonnante abeille*. De Boeck Supérieur, Bruxelles.
- Terriere LC (1984). Induction of Detoxication Enzymes in Insects. *Annu Rev Entomol* 29, 71–88.
- Texier C, Vidau C, Viguès B, El Alaoui H & Delbac F (2010). Microsporidia: a model for minimal parasite-host interactions. *Curr Opin Microbiol* 13, 443–449.
- The European Commission (2013). Commission implementing regulation (EU) No 485/2013 of 24 May 2013. *Off J Eur Union*.
- Thompson HM (2010). Risk assessment for honey bees and pesticides--recent developments and “new issues.” *Pest Manag Sci* 66, 1157–1162.

- Traver BE & Fell RD (2011). *Nosema ceranae* in drone honey bees (*Apis mellifera*). *J Invertebr Pathol* 107, 234–236.
- Traver BE & Fell RD (2012). Low natural levels of *Nosema ceranae* in *Apis mellifera* queens. *J Invertebr Pathol* 110, 408–410.
- Traver BE, Williams MR & Fell RD (2012). Comparison of within hive sampling and seasonal activity of *Nosema ceranae* in honey bee colonies. *J Invertebr Pathol* 109, 187–193.
- Tumburu L, Shepard EF, Strand AE & Browdy CL (2012). Effects of endosulfan exposure and Taura Syndrome Virus infection on the survival and molting of the marine penaeid shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Chemosphere* 86, 912–918.
- Vandame R & Belzunces LP (1998). Joint actions of deltamethrin and azole fungicides on honey bee thermoregulation. *Neurosci Lett* 251, 57–60.
- vanEngelsdorp D, Evans JD, Saegerman C, Mullin C, Haubruge E, Nguyen BK, Frazier M, Frazier J, Cox-Foster D, Chen Y, Underwood R, Tapy DR & Pettis JS (2009). Colony collapse disorder: a descriptive study. *PLoS ONE* 4, e6481.
- vanEngelsdorp D, Hayes JJ, Underwood RM & Pettis J (2008). A survey of honey bee colony losses in the U.S., fall 2007 to spring 2008. *PLoS ONE* 3, e4071.
- vanEngelsdorp D & Meixner MD (2010). A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. *J Invertebr Pathol* 103 Suppl 1, S80–95.
- vanEngelsdorp D, Speybroeck N, Evans JD, Nguyen BK, Mullin C, Frazier M, Frazier J, Cox-Foster D, Chen Y, Tapy DR, Haubruge E, Pettis JS & Saegerman C (2010). Weighing risk factors associated with bee colony collapse disorder by classification and regression tree analysis. *J Econ Entomol* 103, 1517–1523.
- Vávra J & Lukeš J (2013). Microsporidia and “The Art of Living Together.” In *Advances in Parasitology*, pp. 253–319. Elsevier.
- Velki M & Hackenberger BK (2013). Biomarker responses in earthworm *Eisenia andrei* exposed to pirimiphos-methyl and deltamethrin using different toxicity tests. *Chemosphere* 90, 1216–1226.
- Vidau C, Brunet J-L, Badiou A & Belzunces LP (2009). Phenylpyrazole insecticides induce cytotoxicity by altering mechanisms involved in cellular energy supply in the human epithelial cell model Caco-2. *Toxicol In Vitro* 23, 589–597.
- Vidau C, Diogon M, Aufauvre J, Fontbonne R, Viguès B, Brunet J-L, Texier C, Biron DG, Blot N, El Alaoui H, Belzunces LP & Delbac F (2011a). Exposure to sublethal doses of fipronil and thiacloprid highly increases mortality of honeybees previously infected by *Nosema ceranae*. *PLoS ONE* 6, e21550.
- Vidau C, González-Polo RA, Niso-Santano M, Gómez-Sánchez R, Bravo-San Pedro JM, Pizarro-Estrella E, Blasco R, Brunet J-L, Belzunces LP & Fuentes JM (2011b). Fipronil is a powerful uncoupler of oxidative phosphorylation that triggers apoptosis in human neuronal cell line SHSY5Y. *Neurotoxicology* 32, 935–943.
- Villemant C, Haxaire J & Streito J-C (2006). La découverte du frelon asiatique *Vespa velutina*, en France. *Insectes* 3–7.
- Williams BAP (2009). Unique physiology of host-parasite interactions in microsporidia infections. *Cell Microbiol* 11, 1551–1560.

- Williams GR, Odemer R, Tanner G, Boltin J, di Poto C, Mehmman M, Retschnig P, Winiger P, Neumann P & Rosenkranz P (2013). Influence of pathogens and agro-chemicals on honey bee longevity and social behaviour. Oral presentation at XXXXIII International Apimondia Congress.
- Williams GR, Sampson MA, Shutler D & Rogers REL (2008). Does fumagillin control the recently detected invasive parasite *Nosema ceranae* in western honey bees (*Apis mellifera*)? *J Invertebr Pathol* 99, 342–344.
- Wilson-Rich N, Spivak M, Fefferman NH & Starks PT (2009). Genetic, individual, and group facilitation of disease resistance in insect societies. *Annu Rev Entomol* 54, 405–423.
- Winston ML (1987). *The Biology of the Honey Bee*. Harvard University Press, Etats-Unis.
- Woyciechowski M & Morón D (2009). Life expectancy and onset of foraging in the honeybee (*Apis mellifera*). *Insect Soc* 56, 193–201.
- Wu JY, Smart MD, Anelli CM & Sheppard WS (2012). Honey bees (*Apis mellifera*) reared in brood combs containing high levels of pesticide residues exhibit increased susceptibility to *Nosema* (Microsporidia) infection. *J Invertebr Pathol* 109, 326–329.
- Yang B, Peng G, Li T & Kadowaki T (2013). Molecular and phylogenetic characterization of honey bee viruses, *Nosema* microsporidia, protozoan parasites, and parasitic mites in China. *Ecol Evol* 3, 298–311.
- Yang EC, Chuang YC, Chen YL & Chang LH (2008). Abnormal foraging behavior induced by sublethal dosage of imidacloprid in the honey bee (Hymenoptera: Apidae). *J Econ Entomol* 101, 1743–1748.
- Yang X & Cox-Foster DL (2005). Impact of an ectoparasite on the immunity and pathology of an invertebrate: evidence for host immunosuppression and viral amplification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 7470–7475.
- Zander E (1909). Tierische parasiten als krankheitserreger bei der biene. *Münchener Bienenztg* 31, 196–204.

ANNEXE

Annexe 1. Liste des amorces, ciblant des gènes de l'abeille, testées pour utilisation en qRT-PCR (→ Chapitre 3).

Les séquences des couples d'amorces ont été dessinées au cours de cette étude, sauf celles pour lesquelles une référence bibliographique est indiquée. Les couples en bleu correspondent aux amorces validées et utilisées par la suite pour l'approche par qRT-PCR.

Gene product	Gene locus	Primer sequences	Specif PCR	Amplicon (pb)	[primer] (nM)	Thyb (°C)	Ct range	Linearity (r ²)	Efficiency (%)	Valid
actin related protein 1	406122	Actine F : ATGCCAACACTGTCCTTTCTGG ¹ Actine R : GACCCACCAATCCATACGGA	+	151	300	56	12-25	0,998	90	+
catalase (1)	411758	CAT1 F : GCTCAGCACCTTCATCCTCA CAT1 R : TGCTGTGTAGCAGCTAATGC	-	117	-	-	-	-	-	-
		CAT1 F2 : CATTTCCAGATGGCGTTGGC CAT1 R2 : TGCACCTCCAGCATCACAA	+	80	300	58	20-31	0.999	98	+
catalase (2)	443552	CAT2 F : AAGCCAGTTTGACGGTAGGG CAT2 R : AGCATGGACTACACGTTCCG	+	113	300	58	17-29	0.999	92	+
		CAT2 F2 : AATCCTTCCGCTGACCAGTT CAT2 R2 : CGAAATCGGTGTTCCACTTCC	-	90	-	-	-	-	-	-
carboxylesterase clade I, member 1	413247	CaE1 F : TGTGTCATTGGTCCAGAGCC CaE1 R : ACACCTTGATCCTTGCTCGG	+	117	300	58	19-27	0.999	91	+
		CaE1 F2 : TGTTTTTCGCGTTGTTCCCG CaE1 R2 : CCCTGCTCGGAGATCTTGAC	+	118	300	58	-	0.998	98	-
chitinase 5	551600	Endochiti F : TATCGAAAGGACGTCGGCAG Endochiti R : TCACGCCGATGAACGAGTAG	+	85	300	58	16-29	0,998	99	+
		Endochiti F2 : GCAGGTTTTCCGACAAGGAC Endochiti R2 : AGCGATCGTCAGTCCCATC	+	95	300	58	16-29	0,998	95	+
cytochrome P450 4G11	409469	Cyp4g11 F : CAAAATGGTGTCTCCTTACCG ² Cyp4g11 R : ATGGCAACCCATCACTGC	+	120	300	52	-	0,978	135	-
defensin 1	406143	Defensin F1 : TGCGCTGCTAACTGTCTCAG ³ Defensin R1 : CGTTTTCGGTTAAGTGCCATT	+	119	400	54	20-33	0,999	97	+
dual oxidase	551970	Du F1 : CAGATTACAACACAGCCAGG Du R1 : CGAATGGATTTTCGACTAACG	+	122	300	54	-	0,999	92	-
		Du F2 : TCTCTACTGTGATAAAGGAG Du R2 : AATATCTGCTATCTCGCTTC	+	107	300	54	-	0,999	108	-
glucose dehydrogenase 2	551044	GLD3 F : GAACGAGAAAAACGCCTGTG GLD3 R : CCCAATCGTCGTAATCCTTG	+	131	300	57	23-36	0,997	101	+
GMC oxidoreductase 3	410747	GlucDSH F : ACGAGATTTTGAAGCGGCGG GlucDSH R : TCTTACACCGTTGTCGGTCCG	+	110	300	58	19-30	0,999	87	+
		GlucDSH F2 : GATGGTCGCGGAAAAAGCAG GlucDSH R2 : AACAGCGCCCTCTACATTCC	+	96	300	58	16-27	0,999	94	+
glutathione S-transferase S1	552304	GSTS1 F : ATTCCTGGTCTTGCCGAACC GSTS1 R : TGGGCCATTCTTCGATATCAATTC	+	91	300	56	14-25	0,999	94	+
		GSTS1 F2 : GGCAGATCTTTCTACGCAGC GSTF1 R2 : TCAGACAACCTTCTTCAGTTCAGG	+	96	300	56	14-26	0,998	87	+

Gene product	Gene locus	Primer sequences	Specif PCR	Amplicon (pb)	[primer] (nM)	Thyb (°C)	Ct range	Linearity (r ²)	Efficiency (%)	Valid
glutathione S-transferase S4	411045	GSTS4 F : TCAACGGCAAAGTTTACTCGC GSTS4 R : GCGTCGATCTGCAACGTATC	+	103	300	56	-	0,975	116	-
		GSTS4 F2 : GCTGATCTGTTTTTCGTCGGC GSTS4 R2 : AGATAGGGCTTGTCGTTCGTG	+	80	300	56	-	0,878	-	-
glutathione peroxidase-like 1	494523	Gtpx1 F : TGC GAAATCCATCAAAGGCG Gtpx1 R : ATTTGTTGCTGTAAGGCCGC	-	103	-	-	-	-	-	-
		Gtpx1 F2 : AGATTCTGCGCATCCTTTATGG Gtpx1 R2 : CGTTCCACCCTTTGCCTTC	+	120	300	58	15-29	0,999	91	+
glutathione peroxidase-like 2	726269	Gtpx2 F : GGAAGTGGTTGAAGACACAAGC Gtpx2 R : ACAGTTGGTGCAAATCGAGA	+	115	300	58	18-27	0,999	92	+
Lim3 homeobox	410658	Lim3 F : AGAGTCTCAAACGTCCGGC Lim3 R : GATCCAGAGGGTGCACTCTCG	+	101	300	58	22-32	0,998	95	+
		Lim3 F2 : AGGATTGGCACCGTCTCAAG Lim3 R2 : AGATAGAACTCGTCCCCCGT	+	114	300	58	-	0,98	126	-
hydrocephalus-inducing protein-like	100578512	HydIP F : ATTTGTGCAACGTGGAGACG HydIP R : GGCGCCAAGCACAAATTCAC	+	91	300	58	24-34	0,998	105	+
		HydIP F2 : AGATCAAGCCGTCGACCAAC HydIP R2 : CGAGAACGGTCTCATCCTGG	+	95	300	58	23-30	0,999	85	+
vanin-like protein 1-like (1)	100578995	Vanin1 F : CCTGTAAATTCTTCCACAACTTTCG Vanin1 R : CGAATATTCTACTACGGCTGCG	-	88	-	-	-	-	-	-
		Vanin1 F2 : ACGTTTGATCTTCATAACAAACCAG Vanin1 R2 : TGGTCATCGAATCATTGAGCAG	+	109	300	58	19-32	0,999	96	+
hymenoptaecin	406142	Hymenoptaecin F : CTCTTCTGTGCCGTTGCATA ³ Hymenoptaecin R : GCGTCTCCTGTCTATTCCATT	+	200	400	54	21-33	0,996	105	+
trehalase	410484	Trehalase F : CTGCCAGATTGGACGGAGAG Trehalase R : CGTTCAGATGTTTCGCCAC	+	82	300	58	18-26	0,999	97	+
		Trehalase F2 : GTTCGGATGGACTAACGGGG Trehalase R2 : CGTCTCGTATCCAACCTCC	+	83	300	58	18-29	0,999	102	+
glucosinolate sulphatase	551758	GLSS F : GCAGGGACGAGATCGTACAG GLSS R : CTCGCCAACCGGTGAACATA	-	107	-	-	-	-	-	-
		GLSS F2 : ATTGGAGAAAGGAGCCCGTG GLSS R2 : CTTAGATCTCCACCAGCCG	+	91	300	58	20-27	0,999	101	+
vanin-like protein 1-like (2)	724312	Vanin2 F : CTCTCGAGTGCCAAAAACGC Vanin2 R : CGAATCGATGTCCGATGTATGC	+	103	300	56	16-20	0,999	99	-
		Vanin2 F2 : CGAAGGAGCGGCTTTTAGTC Vanin2 R2 : TCGATGTCCGATGTATGCAG	+	118	300	56	16-27	0,998	97	+
multidrug resistance-associated protein lethal(2)-like	725051	MD F : AGGAGGAACAATCGCCAGTC MD R : TTGCACAATGTTGGTGGCAG	+	85	300	58	-	0,997	97	-
		MD F2 : ATCGTAGGCAGAACTGGTGC MD R2 : AGCCCAACGTTCTGGTATCTC	+	118	300	58	23-26	0,999	97	-
homeobox protein Nkx-2.5-like	725671	Homeobox F : GAGAGCTTCAAGATGCCAG Homeobox R : GAACCACGAGTGCAAAGAGG	+	92	300	58	-	0,999	114	-
		Homeobox F2 : TGCACTTCCGTTTCTCCTCTG Homeobox R2 : CTTGGAGAACAACACTCGCC	+	118	300	58	-	0,999	92	-

Gene product	Gene locus	Primer sequences	Specif PCR	Amplicon (pb)	[primer] (nM)	Thyb (°C)	Ct range	Linearity (r ²)	Efficiency (%)	Valid
carboxylesterase	726134	CaE2 F : TCGATACGATGCTCTTGGGC CaE2 R : CACCACCTCTTCAGGATCGC	+	102	300	58	16-27	0.999	93	+
		CaE2 F2 : CGACGAGGTAGCAGAGAATCC CaE2 R2 : ATTATGACCGGGACATCGGC	+	81	300	58	16-25	0.998	93	+
POU domain, class 2, transcription factor 3-like	727092	POU F : GCAATTCCTCAAGCTGCACTG POU R : GTTGCTGCTGAAACGTGGAG	+	120	300	58	-	0.992	94	-
		POU F2 : TCGTGCAAAATCCAAAGCCC POU R2 : ACCACACTCGAACGACTTCC	+	87	300	58	20-32	0.999	102	+
endoplasmic-like	412150	HSP90 F : TTCTCCATGTGCTTTGGTTG HSP90 R : TTTTCTGGGGATCATCAGTC	+	102	300	55	21-29	0.999	105	+
lysozyme 1	725110	Lysozyme F : ACACGGTTGGTCACTGGTCC ¹ Lysozyme R : GTCCACGCTTTGAATCCCT	+	201	300	60	13-24	0.998	94	+
lysozyme 2	724899	Lys2 F : CCAAATTAACAGCGCCAAGT ³ Lys2 R : GCAATTCCTCACCCAACCAT	+	166	300	60	20-29	0.999	83	+
major royal jelly protein 1	406090	MRJP1 F : ACCAAAATGACGATCGATGGAG MRJP1 R : ACTGGTGGGAAAGCTACAGGAC	+	111	300	58	-	0.996	107	-
		MRJP1 F2 : AACGCGAATGTAAACGAATTGA ⁴ MRJP1 R2 : AAATTTGAAAGGTGTTCTGA	-	76	-	-	-	-	-	-
		AmNOS F : TCCACTCGCAGGTAATTCC ⁵ AmNOS R : TCTGGAGGATCACCAATTCC	+	106	300	56	28-30	0.933	123	-
nitric oxide synthase	503861	AmNOS2 F : AAGCGAAACGGTAACAGGTG AmNOS2 R : CTTTTGGCAGGTTCTGTTG	+	103	300	56	-	0.997	82	-
		RPS5 F : AATTATTTGGTTCGCTGGAATTG ³ RPS5 R : TAACGTCCAGCAGAATGTGGTA	+	115	300	56	14-28	0.997	86	+
ribosomal protein S5a	409728	RPS5 F : AATTATTTGGTTCGCTGGAATTG ³ RPS5 R : TAACGTCCAGCAGAATGTGGTA	+	115	300	56	14-28	0.997	86	+
serine protease 14	725154	SP14 F : CGAAAAACACTACGTGGGGC SP14 R : TGTCTCCTTGACAAGCGTCC	+	110	300	58	24-35	0.997	101	+
		SP14 F2 : TGGAATCACAGCTTTCGGCA SP14 R2 : TCGTCCAAACGTGTTCTCTCG	+	101	300	58	25-35	0.999	88	+
serine protease 40	409626	SP40 F : TTTCTCCGTCCCTCTTCCA SP40 R : CTAAGTCTGCCCCAGCCAG	+	82	300	58	14-27	0.999	97	+
		SP40 F2 : GGGGAGGATGCCAAAGAAGG SP40 R2 : CGCAATGCGCTGCAGTAATC	-	124	-	-	-	-	-	-
thioredoxin reductase 1	410032	Thiored F : GCAAGTACTGTTGCCAGGA Thiored R : AGAAGTCGGCCATCAGCTTG	+	98	300	58	-	0.998	100	-
		Thiored F2 : AGCTGATGGCCGACTTCTTG Thiored R2 : AGAAGTCGGCCATCAGCTTG	-	101	-	-	-	-	-	-
vitellogenin	406088	Vitellogenin F : AGTTCCGACCGACGACGA ⁶ Vitellogenin R : TTCCCTCCACGGAGTCC	+	63	300	58	-	0.992	103	-

¹Yang et Cox-Foster, 2005 ; ²Gregorc *et al.*, 2012 ; ³Evans *et al.*, 2006 ; ⁴Hojo *et al.*, 2010 ; ⁵Boncristiani *et al.*, 2011 ; ⁶Corona *et al.*, 2007

RÉSUMÉ

Apis mellifera est un insecte pollinisateur jouant un rôle économique et écologique majeur. Depuis plus d'une vingtaine d'années, d'importantes pertes de colonies d'abeilles ont été recensées à l'échelle mondiale. L'origine de ce phénomène impliquerait de nombreux facteurs de stress qui pourraient en outre interagir entre eux. Ce travail de thèse a eu pour but d'évaluer l'impact sur la santé de l'abeille de l'association entre un facteur biotique, le parasite microsporidien *Nosema ceranae*, et un facteur abiotique, des insecticides neurotoxiques à faibles doses. Des études en laboratoire ont montré que l'association *N. ceranae*-insecticide entraîne une surmortalité significative, et plus précisément un effet synergique sur la mortalité des abeilles. Cet effet synergique semble indépendant de l'ordre d'exposition des abeilles aux deux facteurs de stress. De plus, lorsqu'ils ont été appliqués dès l'émergence des abeilles, ces facteurs ont eu un impact plus fort sur la mortalité. La réponse de l'abeille à *N. ceranae* et aux insecticides a ensuite été analysée à l'échelle transcriptomique. L'analyse du transcriptome de l'intestin a été réalisée en combinant une approche globale de séquençage à haut débit (RNA-Seq) et un suivi de l'expression d'une sélection de gènes par qRT-PCR. L'exposition à *N. ceranae* et aux insecticides a entraîné des modifications de l'expression de gènes impliqués dans les défenses de l'abeille (immunité, détoxification) et dans les métabolismes du tréhalose et de la chitine. De nombreuses perspectives à ce travail sont envisageables dans le but de mieux appréhender la réponse de l'abeille à différents facteurs de stress, notamment en combinant des expérimentations en laboratoire avec des études de terrain.

Mots-clés : *Apis mellifera*, *Nosema ceranae*, insecticides, interaction, synergie, transcriptome.

ABSTRACT

Apis mellifera is a pollinator insect playing of major economical and ecological importance. For more than two decades, severe honeybee colony losses have been reported worldwide. The origin of this phenomenon is thought to involve numerous stressors that could interact with each other. The objective of this work was to evaluate the impact on honeybee health of the association between a biotic stressor, namely the microsporidian parasite *Nosema ceranae*, and an abiotic stressor, here low doses of neurotoxic insecticides. Laboratory studies showed that the *N. ceranae*-insecticide association leads to a higher mortality in honeybees, and more precisely to a synergistic effect. This effect seemed to be independent of the exposure sequence to stressors. Moreover, when applied at the emergence of honeybees, these stressors had a higher impact on individuals' mortality. The honeybee response to *N. ceranae* and to insecticides has also been analysed at a transcriptional level. A midgut transcriptome analysis has been performed combining a global approach, using high-throughput sequencing (RNA-Seq), and a quantitative RT-PCR monitoring of the expression of selected genes. The exposure to *N. ceranae* and to insecticides led to modifications in the expression of genes involved in honeybee defenses (immunity, detoxification) and in trehalose and chitin metabolisms. Following this work, several prospects can be initiated in order to improve our understanding regarding the honeybee response to various stressors, combining laboratory experiments with field studies.

Key-words : *Apis mellifera*, *Nosema ceranae*, insecticides, interaction, synergy, transcriptome.